



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 360 155**

51 Int. Cl.:

C12N 15/12 (2006.01)	C07K 14/47 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)	A01K 67/027 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)	C12Q 1/68 (2006.01)
C12N 5/16 (2006.01)	G01N 33/574 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)	A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08154530 .3**

96 Fecha de presentación : **26.01.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1967586**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Una proteína específica de próstata y testículos altamente expresada en el cáncer de próstata.**

30 Prioridad: **26.01.2000 US 178560 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.06.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.06.2011

73 Titular/es: **AGENSYS, Inc.**
2225 Colorado Avenue
Santa Monica, California 90404, US

72 Inventor/es: **Jakobovits, Aya;**
Afar, Daniel E.H.;
Challita-Eid, Pia M.;
Levin, Elana;
Mitchell, Steve Chappell y
Hubert, Rene S.

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 360 155 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Una proteína específica de próstata y testículos altamente expresada en el cáncer de próstata

La presente solicitud reivindica los beneficios de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos número 60/178.560, depositada el 26 de enero del 2000.

Campo de la invención

- 5 La presente invención aquí descrita está relacionada con un nuevo gen y la proteína que codifica, denominada 84P2A9, y con los métodos diagnósticos y terapéuticos y las composiciones útiles en el manejo de diferentes cánceres que expresan la 84P2A9, en particular los cánceres de próstata.

Antecedentes de la invención

- 10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte en humanos después de las enfermedades coronarias. En todo el mundo, millones de personas mueren de cáncer cada año. Sólo en los Estados Unidos, el cáncer causa la muerte de más de medio millón de personas anualmente, con alrededor de 1,4 millones de nuevos casos diagnosticados por año. Mientras las muertes por enfermedades coronarias se han reducido significativamente, las derivadas del cáncer en general están aumentando. En la primera parte del próximo siglo, se prevé que el cáncer se convertirá en la principal causa de muerte.

- 15 En todo el mundo, varios cánceres sobresalen como los más mortales. En particular, los carcinomas de pulmón, próstata, mama, colon, páncreas y ovario representan los principales causantes de muerte por cáncer. Éstos y virtualmente todos los demás carcinomas comparten la característica de letalidad común. Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica a partir de un carcinoma es fatal. Además, incluso en aquellos pacientes de cáncer que inicialmente sobreviven a los tumores primarios, la experiencia común demuestra que sus vidas se ven dramáticamente alteradas. Muchos pacientes de cáncer experimentan una gran ansiedad producida por la conciencia del potencial de recidiva o de fallo del tratamiento. Muchos pacientes de cáncer experimentan debilidad física tras el tratamiento. Además, muchos pacientes de cáncer experimentan una recidiva.

- 25 En todo el mundo, el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más prevalente en hombres. En Norteamérica y Europa del norte, es con ventaja el más común de los cánceres en hombres y es el segundo agente causante de muerte por cáncer en hombres. Sólo en los Estados Unidos, más de 40.000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad, sólo tras el cáncer de pulmón. A pesar de la magnitud de estas cifras, aún no existe un tratamiento efectivo para el cáncer de próstata metastático. La prostatectomía quirúrgica, la terapia de radiación, terapia de ablación hormonal, la castración quirúrgica y la quimioterapia continúan siendo las principales modalidades de tratamiento. Desafortunadamente, estos tratamientos no son efectivos para muchos y a menudo se asocian con consecuencias no deseadas.

- 30 En el marco diagnóstico, la falta de un marcador tumoral de próstata que pueda detectar de forma precisa los tumores en fase inicial localizados sigue siendo una limitación significativa en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad. Aunque el ensayo del antígeno específico de próstata (PSA) en suero ha sido una herramienta muy útil, su especificidad y utilidad general tienen carencias ampliamente conocidas en varias cuestiones importantes.

- 35 El progreso en la identificación de marcadores específicos adicionales del cáncer de próstata ha mejorado mediante la generación de xenoinjertos de cáncer de próstata que pueden recapitular diferentes fases de la enfermedad en ratones. Los xenoinjertos LAPC (Cáncer de Próstata de Los Angeles) son xenoinjertos de cáncer de próstata que han sobrevivido al paso por ratones con deficiencia inmune combinada severa (SCID) y muestran la capacidad de mimetizar la transición de la dependencia de andrógenos a la independencia de andrógenos (Klein et al., 1997, Nat. Med. 3:402). Otros marcadores de cáncer de próstata más recientemente identificados incluyen PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), antígeno de la membrana específico de próstata (PSM) (Pinto et al., Clin Cancer Res 1996 Sep; 2(9):1445-51), STEAP (Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Dic 7; 96(25):14523-8) y antígeno de células madre de próstata (PSCA) (Reiter et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1735).

- 45 Aunque los marcadores identificados previamente, como el PSA, PSM, PCTA y PSCA, han facilitado los esfuerzos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer de próstata, existe la necesidad de identificar marcadores adicionales y dianas terapéuticas del cáncer de próstata y otros relacionados para mejorar su diagnóstico y terapia.

Resumen de la invención

- 50 La presente invención está relacionada con un nuevo gen, principalmente relacionado con próstata y testículos, denominado 84P2A9, que está sobreexpresado en muchos cánceres, como los cánceres de próstata, testículos, riñones, cerebro, hueso, piel, ovario, mama, páncreas, colon, linfocíticos y de pulmón. Un análisis por Northern blot de la expresión del gen 84P2A9 en tejidos normales muestra un patrón de expresión elevada relacionada con próstata y testículos en tejidos adultos. El análisis de la expresión de 84P2A9 en próstata normal y en xenoinjertos de tumor de próstata muestra una sobreexpresión en los xenoinjertos de tumor de próstata LAPC-4 y LAPC-9, con la expresión más elevada en LAPC-9. Las secuencias de nucleótidos (Id. de Sec. N°: 1) y aminoácidos (Id. de Sec. N°:

2) de 84P2A9 se muestran en la Fig. 2. Porciones de la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 muestran algunas homologías con EST en la base de datos dbEST. El patrón de expresión relacionado con próstata y testículos de 84P2A9 en tejidos normales adultos, combinado con la sobreexpresión observada en xenoinjertos de tumor de próstata, indica que 84P2A9 está sobreexpresado de forma aberrante en al menos algunos cánceres, y por lo tanto sirve como diana diagnóstica y/o terapéutica útil para estos cánceres, como el cáncer de próstata, testículos, riñones, cerebro, hueso, piel, ovario, mama, páncreas, colon, linfocitos y de pulmón (véanse, por ejemplo, las Fig. 4-8).

La invención proporciona los polinucleótidos que corresponden o son complementarios a la totalidad o parte de los genes, los mRNA y/o las secuencias codificantes 84P2A9, preferiblemente de forma aislada, como los polinucleótidos que codifican las proteínas 84P2A9 y fragmentos de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos, DNA, RNA, híbridos DNA/RNA y moléculas relacionadas, polinucleótidos u oligonucleótidos complementarios o con al menos un 90% de homología con los genes 84P2A9, o secuencias de mRNA o partes de las mismas, y polinucleótidos u oligonucleótidos que hibridan con los genes o mRNAs 84P2A9 o con polinucleótidos que codifican los 84P2A9. También se proporcionan los medios para el aislamiento de los cDNA y genes que codifican los 84P2A9. También se proporcionan moléculas de DNA recombinante que contienen polinucleótidos 84P2A9, las células transformadas o transducidas con tales moléculas, y los sistemas de huésped-vector para la expresión de productos del gen 84P2A9. La invención también proporciona anticuerpos que se unen a las proteínas 84P2A9 y a fragmentos polipeptídicos de las mismas, como anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos murinos y de otros mamíferos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y totalmente humanos, y anticuerpos marcados con un marcador detectable.

La invención además proporciona los métodos para la detección de la presencia y el estado de los polinucleótidos y proteínas 84P2A9 en diferentes muestras biológicas, así como métodos para la identificación de células que expresan 84P2A9. Una realización típica de esta invención proporciona los métodos para monitorizar los productos del gen 84P2A9 en una muestra de tejido o hematológica que muestra o se sospecha que tiene algún tipo de desregulación del crecimiento como el cáncer.

La invención además proporciona varias composiciones inmunogénicas o terapéuticas y estrategias para el tratamiento de cánceres que expresan 84P2A9 como los cánceres de próstata, como terapias dirigidas a inhibir la transcripción, traducción, procesamiento o función de 84P2A9 así como vacunas para el cáncer.

Breve descripción de las figuras

La Fig. 1. muestra la secuencia de DNA de 84P2A9 de hibridación substractiva bajo supresión (SSH) de alrededor de 425 nucleótidos de longitud (Id. de Sec. N°: 3). Esta secuencia se identificó en comparaciones entre los cDNA de varios xenoinjertos LAPC dependientes de andrógenos e independientes de andrógenos.

La Fig. 2. muestra las secuencias de nucleótidos (Id. de Sec. N°: 1) y aminoácidos (Id. de Sec. N°: 2) de 84P2A9. Véase el Ejemplo 2, a continuación. La secuencia que flanquea el ATG inicial (AAC ATG G) (Id. de Sec. N°: 4) muestra una secuencia Kozak (A en posición -3 y G en posición +1). La metionina inicial con secuencia Kozak se indica en negrita, las señales de localización nuclear están enmarcadas.

Las Fig. 3A y 3B. muestran el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 (Id. de Sec. N°: 2) con KIAA1552 (Id. de Sec. N°: 5) y LUCA15 (Id. de Sec. N°: 6). La Fig. 3A muestra que la secuencia de la proteína 84P2A9 (última línea) posee cierta homología con la proteína de cerebro humana KIAA152 (39,5% de identidad en una región de 337 aminoácidos, Puntuación: 407,0; Frecuencia de huecos: 5,9%). La Fig. 3B muestra que la secuencia de la proteína 84P2A9 (última línea) contiene un dominio que es homólogo a una porción de la proteína supresora de tumores LUCA15 (64,3% de identidad en una región de 42 aminoácidos, Puntuación: 138,0; Frecuencia de huecos: 0,0%).

Las Fig. 4A-4C muestran el análisis de Northern blot de la expresión restringida de 84P2A9 en varios tejidos normales humanos (utilizando el fragmento de SSH de 84P2A9 como sonda) y en xenoinjertos LAPC. Dos Northern Blot de múltiples tejidos (Clontech) (Fig. 4A y 4B) y un Northern Blot en xenoinjerto (Fig. 4C) se hibridaron con el fragmento de SSH de 84P2A9. Los carriles 1-8 en la Fig. 4A consisten en mRNA de corazón, cerebro, placenta, pulmón, hígado, músculo esquelético, riñones y páncreas respectivamente. Los carriles 1-8 en la Fig. 4B consisten en RNA total de bazo, timo, próstata, testículos, ovarios, intestino delgado, colon y leucocitos respectivamente. Los carriles 1-5 en la Fig. 4C consisten en mRNA de próstata, LAPC-4 AD, LAPC-4 AI, LAPC-9 AD y LAPC-9 AI respectivamente. Los marcadores de tamaño se indican en un lado en kilobases (kb). Cada carril contiene 2 µg de mRNA para los tejidos normales y 10 µg de RNA total para los tejidos de xenoinjerto. Los resultados muestran la expresión de 84P2A9 en testículos y próstata y los xenoinjertos LAPC.

La Fig. 5. muestra el análisis de Northern blot de la expresión de 84P2A9 en próstata y en múltiples líneas celulares de cáncer. Los carriles 1-56 muestran la expresión en LAPC-4 AD, LAPC-4 AI, LAPC-9 AD, LAPC-9 AI, LNCaP, PC-3, DU145, TsuPr1, LAPC-4 CL, HT1197, SCaBER, UM-UC-3, TCCSUP, J82, 5637, 293T, RD-ES, PANC-1, BxPC-3, HPAC, Capan-1, SK-CO-1, CaCo-2, LoVo, T84, Colo-205, KCL 22, Push-1, T98G, SK-ES-1, HOS, U2-OS, RD-ES, CALU-1, A427, NCI-H82, NCI-H146, 769-P, A498, CAKI-1, SW839, BT20, CAMA-1, DU4475, MCF-7, MDA-MB-435s, NTERRA-2, NCCIT, TERA-1, TERA-2, A431, HeLa, OV-1063, PA-1, SW626 y CAO-V-3 respectivamente. Se

detectaron niveles elevados de expresión de 84P2A9 en las líneas celulares cancerosas de cerebro (PFSK-1, T98G), hueso (HOS, U2-OS), pulmón (CALU-1, NCI-H82, NCI-H146), y riñones (769-P, A498, CAKI-1, SW839). Se detectaron niveles moderados de expresión en varias líneas celulares cancerosas pancreáticas (PANC-1, BxPC-3, HPAC, CAPAN-1), de colon (SK-CO-1, CACO-2, LOVO, COLO-205), hueso (SK-ES-1, RD-ES), mama (MCF-7, MDA-MB-435s) y testículos (NCCIT).

La Fig. 6. muestra el análisis de Northern blot de la expresión de 84P2A9 en cáncer de muestras de próstata de pacientes. Las muestras de pacientes de cáncer de próstata muestran la expresión de 84P2A9 tanto en la parte normal como en la tumoral de los tejidos de próstata. Los carriles 1-7 muestran próstata normal, tejido adyacente normal del paciente 1, tumor del paciente 1 Gleason 9, tejido adyacente normal del paciente 2, tumor del paciente 2 Gleason 7 y tumor del paciente 3 Gleason 7 respectivamente. Estos resultados proporcionan evidencia de que el 84P2A9 es un gen muy específico de testículos que está regulado positivamente en cáncer de próstata y potencialmente otros cánceres. De forma similar a los antígenos MAGE, 84P2A9 puede así calificarse como un antígeno de testículos y cáncer (Van den Eynde y Boon, *Int J Clin Lab Res.* 27:81-86, 1997).

La Fig. 7. muestra RNA aislado a partir de cánceres de riñón (T) y sus tejidos normales adyacentes (N) obtenidos de pacientes de cáncer de riñón. Los carriles 1-15 muestran el tipo de células claras 769-P; tipo de células claras A498; tipo de células claras SW839; riñón normal; Paciente 1, N; Paciente 1, tumor; Paciente 2, N; Paciente 2, tumor, tipo de células claras, grado III; Paciente 3, N; Paciente 3, tumor, tipo de células claras, grado II/IV; Paciente 4, N; Paciente 4, tumor, tipo de células claras, grado II/IV; Paciente 5, N; Paciente 5, tumor, tipo de células claras, grado II; y Paciente 6, tumor, metástasis a la pared torácica, respectivamente (N = tejido normal adyacente y CL = línea celular). El análisis Northern se realizó utilizando 10 µg de RNA total de cada muestra. La expresión de 84P2A9 se detectó en las seis muestras de tumor testadas así como en las tres líneas celulares de riñón, 769-P, A498 y SW839.

La Fig. 8. muestra RNA aislado a partir de cánceres de colon (T) y sus tejidos normales adyacentes (N) obtenidos de pacientes de cáncer de colon. Los carriles 1-11 muestran Colo 205; LoVo; T84; Caco-2; Paciente 1, N; Paciente 1, tumor, grado 2, T3N1Mx (positivo para metástasis en nódulos linfáticos); Paciente 2, N; Paciente 2, tumor, grado 1, T2N0Mx; Paciente 3, N; Paciente 3, tumor, grado 1, T2N1Mx (positivo para metástasis en nódulos linfáticos); y Paciente 4, tumor, grado 2, T3N1MX (positivo para metástasis en nódulos linfáticos); respectivamente (N = tejido normal adyacente y CL = línea celular). El análisis Northern se realizó utilizando 10 µg de RNA total de cada muestra. La expresión de 84P2A9 se detectó en las cuatro muestras de tumor testadas así como en las cuatro líneas celulares de cáncer de colon líneas Colo 205, LoVo, T84 y Caco-2.

La Fig. 9. muestra la expresión de 84P2A9 ensayada en un panel de cánceres humanos (T) y sus respectivos tejidos normales emparejados (N) en dot blot de RNA. Las líneas celulares tumorales de izquierda a derecha son HeLa (carcinoma cervical), Daudi (linfoma de Burkitt), K562 (LMC), HL-60 (LPM), G361 (melanoma), A549 (carcinoma de pulmón), MOLT-4 (leucemia linfoblástica), SW480 (carcinoma colorectal) y Raji (linfoma de Burkitt). La expresión de 84P2A9 se observó en cánceres de riñón, cánceres de mama, cánceres de próstata, cánceres de pulmón, cánceres de estómago, cánceres de colon, cánceres cervicales y cánceres de recto. También se detectó una expresión elevada de 84P2A9 en un panel de líneas celulares tumorales, especialmente en las líneas celulares de leucemia linfoblástica MOLT-4 y de carcinoma de pulmón A549. La expresión detectada en tejidos normales adyacentes (aislados a partir de los tejidos enfermos) pero no en tejidos normales, aislados a partir de donantes sanos, puede indicar que estos tejidos no son completamente normales y que 84P2A9 puede expresarse en las fases tempranas de los tumores.

La Fig. 10 muestra la expresión de 84P2A9 en especímenes de pacientes con cáncer de vejiga. Se observó expresión de 84P2A9 en cuatro especímenes de pacientes con cáncer de vejiga testados y en tres líneas celulares de vejiga (CL), UM-UC-3 (carril 1), J82 (carril 2) y SCABER (carril 3). Se aisló RNA a partir de vejiga normal (VN), tumores de vejiga (T) y sus tejidos normales adyacentes (N) obtenidos a partir de seis pacientes con cáncer de vejiga (P). El tumor de P1 es carcinoma transicional, grado 4; P2 es carcinoma escamoso invasivo; P3 es carcinoma transicional, grado 3; P4 es carcinoma papilar no invasivo, grado 1/3; P5 es carcinoma papilar, grado 3/3; y P6 es carcinoma transicional, grado 3/2. El análisis Northern se realizó utilizando 10 µg de RNA total de cada muestra.

La Fig. 11 muestra la expresión de la proteína 84P2A9 en células 293T. Las células 293T se transfectaron de forma transitoria con el plásmido de 84P2A9 marcado con el epítipo V5-HIS pCDNA3.1 o con un vector control vacío, y se recogieron 2 días después. Las células se lisaron en tampón de muestras de SDS-PAGE y los lisados se separaron en un gel al 10-20% de SDS-PAGE, y luego se transfirieron a nitrocelulosa. La transferencia se bloqueó en salino tamponado con Tris (TBS) con leche desnatada al 2% y luego se hibridó con una dilución 1:3.000 del anticuerpo monoclonal murino anti-V5 (Invitrogen) en TBS + Tween-20 al 0,15% + leche al 1%. La transferencia se lavó y luego se incubó con una dilución 1:4.000 del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con HRP. Tras el lavado, se revelaron las bandas inmunorreactivas con el epítipo anti-V5 mediante quimioluminiscencia mejorada y se visualizaron mediante la exposición a película autorradiográfica. Mediante una flecha se indica una banda inmunorreactiva específica anti-V5 de aproximadamente 87 Kd que corresponde con la expresión de la proteína 84P2A9 marcada con el epítipo en las células transfectadas.

Descripción detallada de la invención

A no ser que se definan de otro modo, todos los términos de la materia, las notaciones y otros términos científicos o terminología utilizada aquí, se pretende que tengan el significado que normalmente se entiende entre los expertos en la materia a los que va dirigida esta invención. En algunos casos, los términos con un significado normalmente claro se definen aquí para una mayor claridad y/o como una rápida referencia, y la inclusión de tales definiciones aquí no representa necesariamente una diferencia sustancial sobre lo que generalmente se entiende en la materia. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o referenciados aquí son en general bien entendidos y comúnmente utilizados en la metodología convencional por los expertos en la materia, como, por ejemplo, las metodologías ampliamente utilizadas de clonaje molecular descritas en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Según sea apropiado, los procedimientos que involucran la utilización de equipos y reactivos comercialmente disponibles generalmente se realizaron de acuerdo con los protocolos definidos por el fabricante y/o parámetros, a menos que se indique de otro modo.

Definiciones:

Tal y como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "cáncer de próstata avanzado", "cáncer de próstata localmente avanzado", "enfermedad avanzada" y "enfermedad localmente avanzada" se refieren a cánceres de próstata que se han extendido a través de la cápsula de la próstata, y que incluyen enfermedad en fase C según el sistema de la Asociación Urológica Americana (AUA), enfermedad en fase C1-C2 según el sistema Whitmore-Jewett, y enfermedad en fase T3-T4 y N+ según el sistema TNM (tumor, nodo, metástasis). En general, la cirugía no está recomendada para los pacientes con enfermedad localmente avanzada, y estos pacientes tienen pronósticos sustancialmente menos favorables comparados con los pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado (confinado al órgano). La enfermedad localmente avanzada se identifica clínicamente mediante la evidencia palpable de endurecimiento tras el borde lateral de la próstata, o asimetría o endurecimiento sobre la base de la próstata. El cáncer de próstata localmente avanzado actualmente se diagnostica patológicamente tras una prostatectomía radical si el tumor invade o penetra la cápsula prostática, se extiende al margen quirúrgico o invade las vesículas seminales.

El término "anticuerpo" se utiliza en su sentido más amplio. Por lo tanto un "anticuerpo" puede ser de aparición natural o sintético, como los anticuerpos monoclonales producidos mediante la tecnología convencional de hibridoma. Los anticuerpos anti-84P2A9 comprenden los anticuerpos monoclonales y policlonales así como los fragmentos que contienen el dominio de unión al antígeno y/o uno o más regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos. Como se utiliza aquí, un fragmento de anticuerpo se define como al menos una porción de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une a su diana, es decir, la región de unión al antígeno. En una realización se incluye específicamente un único anticuerpo anti-84P2A9 (como anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes) y composiciones de anticuerpos anti-84P2A9 con especificidad poliepitópica. El término "anticuerpo monoclonal" como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que comprenden la población son idénticos excepto por las posibles mutaciones que aparecen de forma natural y que están presentes en pequeñas cantidades.

El término "agente citotóxico" como se utiliza en la presente memoria se refiere a una sustancia que inhibe o evita la funcionalidad de las células y/o causa la destrucción de las células. El término pretende incluir los isótopos radioactivos (por ejemplo At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , B^{212} , P^{32} y los isótopos radioactivos del Lu), agentes quimioterápicos y toxinas como las toxinas de molécula pequeña o toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, como los fragmentos y/o variantes de las mismas.

Como se utilizan en la presente memoria, las expresiones "hibridar", "que hibrida", "hibrida" y similares, utilizados en el contexto de los polinucleótidos, se refieren a las condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente como la hibridación en formamida al 50%/ 6 X SSC/ SDS al 0,1%/ ssDNA 100 µg/ml, en la que las temperaturas de hibridación son superiores a 37 grados C y las temperaturas de lavado en 0,1 X SSC/ SDS 0,1% son superiores a 55 grados C.

Como se utiliza en la presente memoria, un polinucleótido se dice está "aislado" cuando se encuentra sustancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que corresponden o son complementarios de otros genes diferentes del gen 84P2A9 o que codifican otros polipéptidos diferentes del producto del gen 84P2A9 o fragmentos de los mismos. Un experto en la materia puede utilizar fácilmente los procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos para obtener un polinucleótido de 84P2A9 aislado.

Como se utiliza en la presente memoria, se dice que una proteína está "aislada" cuando se han utilizado métodos físicos, mecánicos o químicos para recoger la proteína 84P2A9 a partir de los constituyentes celulares que normalmente están asociados con la proteína. Un experto en la materia puede utilizar fácilmente los métodos estándar de purificación para obtener una proteína aislada de 84P2A9.

La expresión "mamífero" como se utiliza en la presente memoria se refiere a cualquier mamífero que se clasifica como mamífero, como ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, caballos y humanos. En una realización preferida de la invención, el mamífero es un ratón. En otra realización preferida de la invención, el mamífero es un humano.

Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "cáncer de próstata metastático" y "enfermedad metastática" significan cánceres de próstata que se han extendido a los nódulos linfáticos de la región o a puntos distantes, e incluyen enfermedad en fase D según el sistema AUA, enfermedad en fase TxNxM+ según el sistema TNM. Como en el caso del cáncer de próstata localmente avanzado, la cirugía generalmente no está indicada en pacientes con enfermedad metastática, y la terapia hormonal (ablación de andrógenos) es la modalidad de tratamiento preferida. Los pacientes con cáncer de próstata metastático acaban desarrollando un estado refractario a los andrógenos entre los 12 y 18 meses del inicio del tratamiento, y aproximadamente la mitad de estos pacientes mueren en los siguientes 6 meses tras el desarrollo del estado refractario a los andrógenos. El lugar más común de metástasis del cáncer de próstata es el hueso. Las metástasis en hueso del cáncer de próstata a menudo y de forma característica son osteoblásticas en lugar de osteolíticas (es decir, resultan en una formación neta de hueso). Las metástasis en hueso se encuentran más frecuentemente en la espina dorsal, seguido de fémur, pelvis, caja torácica, cráneo y húmero. Otros puntos comunes de metástasis incluyen nódulos linfáticos, pulmón, hígado y cerebro. El cáncer de próstata metastático es típicamente diagnosticado mediante una linfadenectomía pélvica abierta o laparoscópica, escaneos con radionúclidos de cuerpo entero, radiografías esqueléticas y/o biopsias de lesiones óseas.

Las "condiciones moderadamente estrictas" se describen se identifican pero no se limitan a éstas, mediante las que aparecen en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen la utilización de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % SDS) menos restrictivas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente restrictivas es la incubación a 37°C toda la noche en una solución que comprende: formamida al 20%, 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, dextran sulfato al 10%, y DNA de esperma de salmón fragmentado desnaturalizado 20 mg/mL, seguido de un lavado de los filtros en 1 x SSC a alrededor de 37-50°C. El experto en la materia reconocerá como ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para acomodarlos a factores como la longitud de la sonda y similares.

Como se utiliza en la presente memoria, un "motivo" como en motivo biológico de una proteína relacionada con 84P2A9, se refiere a cualquier serie de aminoácidos que forman parte de la secuencia primaria de una proteína, tanto contiguos como capaces de alinearse con ciertas posiciones que son generalmente invariables o conservadas, que están asociadas con una función o modificación particular (por ejemplo que están fosforiladas, glucosiladas o amidadas).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases o pares de bases de longitud, tanto ribonucleótidos como desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquiera de los tipos de nucleótido, e incluye formas de cadena sencilla y doble de DNA y/o RNA. En la materia, este término a menudo se utiliza de forma intercambiable con "oligonucleótido". Como se discute aquí, un polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos descrita aquí en la que la timidina (T) (como se muestra por ejemplo en el Id. de Sec. N°: 1) puede ser también uracilo (U). Esta descripción hace referencia a la diferencia entre las estructuras químicas entre DNA y RNA, en particular la observación de que una de las cuatro bases principales del RNA es uracilo (U) en lugar de timidina (T).

Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "polipéptido" significa un polímero de al menos alrededor de 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos. A lo largo de la especificación, se utilizan las designaciones estándar para los aminoácidos de tres letras o de una sola letra. En la materia, este término se utiliza frecuentemente de forma intercambiable con "péptido".

La "restricción" de las reacciones de hibridación puede determinarse fácilmente por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, las sondas de mayor longitud requieren temperaturas más elevadas para una hibridación adecuada, mientras las sondas de menor longitud necesitan temperaturas menores. La hibridación generalmente depende de la capacidad de las secuencias de ácido nucleico desnaturalizadas de rehibridar cuando están presentes cadenas complementarias en un ambiente inferior a su temperatura de fusión. Cuanto mayor es el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia a hibridar, mayor es la temperatura relativa que puede utilizarse. Como resultado deriva que las temperaturas relativas mayores tenderán a dar condiciones de reacción más restrictivas, mientras las temperaturas inferiores lo serán menos. Para más detalles y explicaciones de la restricción de las reacciones de hibridación, véase Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las "condiciones restrictivas" o "condiciones de restricción elevada", como se definen aquí, se identifican pero no se limitan a, aquellas que: (1) utilizan una baja fuerza iónica y elevada temperatura para los lavados, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/ citrato sódico 0,0015 M/ dodecil sulfato sódico al 0,1% a 50°C; (2) utilizan durante la hibridación un agente desnaturalizante, como formamida, por ejemplo, formamida al 50% (v/v) con albúmina sérica bovina al 0,1%/ Ficoll al 0,1%/ polivinilpirrolidona al 0,1%/ tampón fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42°C; o (3) utilizan formamida al 50%, 5 x SSC (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (PH 6,8), pirofosfato sódico al 0,1%, solución de Denhardt 5 x, DNA de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS 0,1% y dextran sulfato al 10% a 42°C, con lavados a 42°C en 0.2 x SSC (cloruro sódico/ citrato sódico) y formamida al 50% a 55°C, seguido por un lavado de astringencia elevada que consiste en 0.1 x SSC que contiene EDTA a 55°C.

Un "animal transgénico" (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal con células que contienen un transgén, cuyo transgén se ha introducido en el animal o un ancestro del animal en una etapa prenatal, por ejemplo embrionaria. Un "transgén" es un DNA que está integrado en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico.

Como se utiliza en la presente memoria, el gen y proteína 84P2A9 incluye los genes y proteínas 84P2A9 específicamente descritos aquí, y los genes y proteínas que corresponden a otras proteínas o péptidos codificados por 84P2A9 y que son variantes estructuralmente similares de los anteriores. Estos otros péptidos y variantes 84P2A9 generalmente tendrán secuencias codificantes que son altamente homólogas a la secuencia codificante de 84P2A9, y preferiblemente comparten al menos alrededor del 50% de homología de aminoácidos (utilizando los criterios de BLAST) y preferiblemente un 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más homología de ácido nucleico, y al menos alrededor del 60% de homología de aminoácidos (utilizando los criterios de BLAST), y más preferiblemente comparten el 70% o más homología (utilizando los criterios de BLAST).

Las proteínas relacionadas con 84P2A9 de la invención incluyen las que se identifican de forma específica aquí, así como las variantes alélicas, variantes con sustituciones conservativas y homólogos que pueden aislarse/ generarse y caracterizarse sin experimentación indebida siguiendo los métodos aquí indicados o fácilmente disponibles en la materia. También se incluyen las proteínas de fusión que combinan partes de diferentes proteínas 84P2A9 o fragmentos de las mismas, así como las proteínas de fusión de una proteína 84P2A9 y un polipéptido heterólogo. Tales proteínas 84P2A9 se denominan colectivamente las proteínas relacionadas con 84P2A9, las proteínas de la invención o 84P2A9. Como se utiliza aquí, el término "polipéptido relacionado con 84P2A9" se refiere a un fragmento de polipéptido o una secuencia proteica de 84P2A9 de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos.

Estructura y expresión de 84P2A9

Como se discute en detalle a continuación, los experimentos con los xenoinjertos LAPC-4 AD en ratones machos SCID han resultado en la identificación de genes que están involucrados en la progresión del cáncer de próstata dependiente de andrógenos (AD) a cáncer independiente de andrógenos (AI). Brevemente, los ratones que eran portadores de los xenoinjertos LAPC-4 AD se castraron cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 1 cm de diámetro. Los tumores experimentaron una regresión en tamaño y temporalmente dejaron de producir la proteína dependiente de andrógenos PSA. Entre siete y catorce días tras la castración, los niveles de PSA eran de nuevo detectables en la sangre de los ratones. Finalmente estos tumores desarrollaron un fenotipo AI y empezaron a crecer de nuevo en los machos castrados. Los tumores se recogieron en diferentes momentos tras la castración para identificar los genes que se activan o inactivan durante la transición a la independencia de andrógenos.

Entonces se utilizó la hibridación sustractiva por supresión (SSH) (Diatchenko et al., 1996, PNAS 93:6025) para identificar nuevos genes, como los que se sobreexpresan en el cáncer de próstata, comparando los cDNA de varios xenoinjertos LAPC dependientes de andrógenos e independientes de andrógenos. Esta estrategia resultó en la identificación de nuevos genes que muestran una expresión específica de tejido y de cáncer. Uno de estos genes, denominado 84P2A9, se identificó a partir de una sustracción en la que cDNA derivado de un tumor LAPC-4 AD, 3 días tras la castración, se sustrajo de cDNA derivado a partir de un tumor LAPC-4 AD generado en un macho intacto. La secuencia de DNA de SSH de alrededor de 425 pb (Fig. 1) es nueva y muestra homología sólo con marcas de secuencia expresada (EST) en la base de datos dbEST.

El 84P2A9, codifica una posible proteína nuclear que muestra expresión relacionada con próstata y testículos. La caracterización inicial de 84P2A9 indica que se expresa de forma aberrante en múltiples cánceres, como los cánceres de próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovarios, mama, páncreas, colon, linfocíticos y pulmón. La expresión de 84P2A9 en cáncer de próstata proporciona evidencia de que esta proteína tiene un papel funcional en la progresión tumoral. Es posible que 84P2A9 funcione como un factor de transcripción involucrado en la activación de genes involucrados en la tumorigénesis o la represión de genes que bloquean la tumorigénesis.

Como se describe en detalle en los Ejemplos que siguen, los genes y proteínas 84P2A9 se han caracterizado utilizando una serie de aproximaciones analíticas. Por ejemplo, se realizó un análisis de los nucleótidos codificantes y secuencias de aminoácidos para identificar moléculas potencialmente relacionadas, así como los dominios estructurales reconocibles, características topológicas y otros elementos en las estructuras del mRNA y proteína 84P2A9. Se realizaron análisis Northern blot de la expresión del mRNA de 84P2A9 para establecer el rango de expresión normal y en tejidos cancerosos del mensajero de 84P2A9.

Se clonó un clon de cDNA con el gen completo 84P2A9 (clon 1) de 2345 pares de bases (Id. de Sec. N°: 1) a partir de una biblioteca de cDNA de LAPC-4 AD (Lambda ZAP Express, Stratagene) (Fig. 2). El cDNA codifica un marco abierto de lectura (ORF) de 504 aminoácidos (Id. de Sec. N°: 2). El análisis de la secuencia reveló la presencia de seis potenciales señales de localización nuclear y se predijo que era nuclear utilizando el programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/form.html>). La secuencia de la proteína tiene cierta homología con la proteína humana de cerebro KIAA1152 (Id. de Sec. N°: 5) (39,5% de identidad en una región de 337 aminoácidos), y contiene un dominio que es homólogo a la proteína supresora de tumores LUCA15 (Id. de Sec. N°: 6) (64,3% de identidad en una región de 42 aminoácidos) (GenBank N° de acceso P52756) (Fig. 3).

La expresión de 84P2A9 está relacionada con la próstata y testículos en tejidos humanos normales de adulto, pero también se expresa en ciertos cánceres, como los cánceres de próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovario, mama, páncreas, colon, linfocíticos y pulmón (véanse, por ejemplo, las Fig. 4-8). Los xenoinjertos de tumor de próstata humanos originalmente derivados a partir de un paciente con cáncer de próstata con un alto grado metastático expresan niveles elevados de 84P2A9 (Fig. 4).

Como se describe en la presente memoria, 84P2A9 muestra propiedades específicas que son análogas a las encontradas en una familia de genes cuyos polinucleótidos, polipéptidos, células T citotóxicas reactivas (LTC), células T ayudantes (LTA) y anticuerpos anti-polipéptido se utilizan en ensayos diagnósticos bien conocidos dirigidos a examinar estados asociados con el crecimiento celular desregulado, como el cáncer, en particular el cáncer de próstata (véase, por ejemplo, tanto su patrón altamente específico de expresión en tejidos así como su sobreexpresión en cánceres de próstata como se describe por ejemplo en el Ejemplo 3). El miembro mejor conocido de esta clase es PSA, el marcador arquetípico que se ha utilizado por parte de los especialistas médicos durante años para identificar y monitorizar la presencia de cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Merrill et al., *J. Urol.* 163 (2):503-5120 (2000); Polascik et al., *J. Urol.* Aug; 162 (2):293-306 (1999) y Fortier et al., *J. Nat. Cancer Inst.* 91 (19):1635-1640 (1999)). También se utilizan una serie de marcadores diagnósticos diferentes en este contexto, como p53 y K-ras (véase, por ejemplo, Tulchinsky et al., *Int J Mol Med* 1999 Jul; 4 (1):99-102 y Minimoto et al., *Cancer Detect Prev* 2000; 24 (1):1-12). Por lo tanto, esta descripción de los polinucleótidos y polipéptidos de 84P2A9 (así como las sondas de polinucleótidos de 84P2A9 y anticuerpos anti-84P2A9 utilizados para identificar la presencia de estas moléculas) y sus propiedades permite a los expertos utilizar estas moléculas en métodos que son análogos a los utilizados, por ejemplo, en una serie de ensayos diagnósticos dirigidos a examinar las afecciones asociadas con el cáncer.

Realizaciones típicas de los métodos diagnósticos que utilizan los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de 84P2A9 descritas aquí son análogas a los métodos que se utilizan en ensayos diagnósticos bien establecidos que utilizan los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos de PSA. Por ejemplo, al igual que se utilizan polinucleótidos de PSA como sondas (por ejemplo en el análisis Northern, véase, por ejemplo, Sharief et al., *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33 (3):567-74 (1994)) y cebadores (por ejemplo en el análisis por PCR, véase, por ejemplo, Okegawa et al., *J. Urol.* 163 (4):1189-1190 (2000)) para detectar la presencia y/o nivel de los mRNA de PSA en los métodos de monitorización de la sobreexpresión de PSA o metástasis de los cánceres de próstata, los polinucleótidos de 84P2A9 descritos aquí pueden utilizarse del mismo modo para detectar la sobreexpresión de 84P2A9 o la metástasis de los cánceres de próstata y otros cánceres que expresan este gen. Alternativamente, al igual que los polipéptidos de PSA se utilizan para generar anticuerpos específicos para PSA que entonces pueden utilizarse para detectar la presencia y/o nivel de las proteínas PSA en métodos de monitorización de la sobreexpresión de la proteína PSA (véase, por ejemplo, Stephan et al., *Urology* 55 (4):560-3 (2000)) o la metástasis de las células de próstata (véase, por ejemplo, Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192 (3):233-7 (1996)), los polipéptidos de 84P2A9 descritos aquí pueden utilizarse para generar anticuerpos para su utilización en la detección de sobreexpresión de 84P2A9 o la metástasis de células de próstata y células de otros cánceres que expresan este gen.

Específicamente, ya que la metástasis implica el movimiento de las células cancerosas de un órgano de origen (como los testículos o la glándula prostática etc.) a un área diferente del cuerpo (como un nódulo linfático), los ensayos que examinan en una muestra biológica la presencia de células que expresan los polinucleótidos y/o polipéptidos de 84P2A9 pueden utilizarse para proporcionar una evidencia de metástasis. Por ejemplo, cuando una muestra biológica de tejido que normalmente no contiene células que expresan 84P2A9 (nódulo linfático) se encuentran células que expresan 84P2A9, como la expresión de 84P2A9 que se observa en LAPC4 y LAPC9, los xenoinjertos aislados a partir de metástasis de nódulo linfático y hueso, respectivamente, este hallazgo es indicativo de metástasis.

Alternativamente los polinucleótidos y/o polipéptidos de 84P2A9 pueden utilizarse para proporcionar evidencia de cáncer, por ejemplo, cuando se detecta que las células en una muestra biológica que normalmente no expresa 84P2A9 o expresa 84P2A9 en un nivel diferente, expresan 84P2A9 o tienen una expresión aumentada de 84P2A9 (véase, por ejemplo, la expresión de 84P2A9 en células de cáncer de riñón, pulmón y colon, y en muestras de pacientes etc. que se muestran en las Figuras 4-10). En tales ensayos, los expertos también podrían querer generar evidencias suplementarias de metástasis analizando la presencia en la muestra biológica de un segundo marcador restringido a tejido (además de 84P2A9) como PSA, PSCA etc. (véase, por ejemplo, Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192 (3):233-237 (1996)).

Así como los fragmentos de polinucleótido y las variantes de polinucleótidos de PSA son utilizados por los expertos en métodos de monitorización de PSA, los fragmentos de polinucleótido y las variantes de polinucleótidos de 84P2A9 se utilizan de forma análoga. En particular, los polinucleótidos de PSA típicos utilizados en los métodos de monitorización de PSA son sondas o cebadores que consisten en fragmentos de la secuencia de cDNA de PSA. Como ilustración de ello, los cebadores utilizados para la amplificación por PCR de un polinucleótido de PSA deben incluir una secuencia menor a la secuencia completa de PSA para que funcionen en la reacción en cadena de la polimerasa. En el contexto de tales reacciones de PCR, los expertos generalmente crean una serie de fragmentos de polinucleótido diferentes que pueden utilizarse como cebadores para amplificar diferentes porciones de un polinucleótido de interés o para optimizar las reacciones de amplificación (véase, por ejemplo, Caetano-Anolles, G. *Biotechniques* 25 (3):472-476, 478-480 (1998); Robertson et al., *Methods Mol. Biol.* 98:121-154 (1998)). Una ilustración adicional del uso de tales fragmentos se proporciona en el Ejemplo 3, en el que un fragmento de polinucleótido de 84P2A9 se utiliza como sonda para demostrar la sobreexpresión de los mRNA de 84P2A9 en células cancerosas.

Además, para facilitar su utilización por los médicos especialistas, las secuencias de polinucleótido variantes se utilizan típicamente como cebadores y sondas de los correspondientes mRNA en los análisis de PCR y Northern (véase, por ejemplo, Sawai et al., *Fetal Diagn. Ther.* 1996 Nov-Dec; 11(6):407-13 y *Current Protocols In Molecular Biology*, Volumen 2, Unidad 2, Frederick M. Ausubul et al. Eds., 1995)). Los fragmentos y variantes de polinucleótido típicamente son útiles en este contexto siempre que tengan el atributo o característica común de ser capaces de unirse a una secuencia de polinucleótido diana (por ejemplo el polinucleótido de 84P2A9 que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1) bajo condiciones de restricción elevada.

Así como los de fragmentos de polipéptido y variantes de polipéptido de PSA son utilizados por los expertos en métodos de monitorización de la molécula PSA, los fragmentos de polipéptido y variantes de polipéptido de 84P2A9 pueden también utilizarse de forma análoga. En particular, los polipéptidos típicos de PSA que se utilizan en los métodos de monitorización de PSA son los fragmentos de proteína PSA que contienen un epítipo de anticuerpo que puede ser reconocido por un anticuerpo o célula T que se une específicamente a la proteína PSA. Esta práctica de utilizar fragmentos de polipéptido o variantes de polipéptido para generar anticuerpos (como anticuerpos o células T anti-PSA) es típica en la materia, con una gran variedad de sistemas como las proteínas de fusión que son utilizadas por los especialistas (véase, por ejemplo, *Current Protocols In Molecular Biology*, Volumen 2, Unidad 16, Frederick M. Ausubul et al. Ed., 1995). En este contexto, cada epítipo(s) de una proteína de interés funciona proporcionando la arquitectura con la que es reactiva un anticuerpo o célula T. Típicamente, los expertos generalmente crean una serie de fragmentos de polipéptido diferentes que pueden utilizarse para generar anticuerpos específicos para diferentes porciones de un polipéptido de interés (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N° 5.840.501 y la patente estadounidense N° 5.939.533). Por ejemplo puede ser preferible utilizar un polipéptido que comprende alguno de los motivos biológicos de 84P2A9 que se discuten aquí o están disponibles en la materia. Los fragmentos y variantes de polipéptido o análogos son típicamente útiles en este contexto siempre que comprendan un epítipo capaz de generar un anticuerpo o célula T específicos para una secuencia de polipéptido diana (por ejemplo el polipéptido de 84P2A9 que se muestra en el Id. de Sec. N°: 2).

Como se muestra en la presente memoria, los polinucleótidos y polipéptidos de 84P2A9 (así como las sondas de polinucleótido de 84P2A9 y anticuerpos o células T anti-84P2A9 utilizados para identificar la presencia de estas moléculas) muestran propiedades específicas que los hacen útiles en el diagnóstico de cánceres de próstata. Los ensayos diagnósticos que miden la presencia de producto del gen 84P2A9, para evaluar la presencia o aparición de los estados de enfermedad concretos que se describen aquí, como el cáncer de próstata, son particularmente útiles para la identificación de pacientes como medida preventiva o posterior seguimiento, como se ha hecho con tanto éxito con PSA. Además, estos materiales satisfacen la necesidad de la materia de moléculas con características similares o complementarias a PSA en situaciones en las que, por ejemplo, un diagnóstico definitivo de metástasis de origen prostático no puede realizarse en base sólo al análisis de PSA (véase, por ejemplo, Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192(3):233-237 (1996)), y en consecuencia, deben utilizarse los materiales como los polinucleótidos y polipéptidos de 84P2A9 (así como las sondas de polinucleótido de 84P2A9 y los anticuerpos anti-84P2A9 utilizados para identificar la presencia de estas moléculas) para confirmar la metástasis de origen prostático.

Finalmente, además de su utilización en los ensayos diagnósticos, los polinucleótidos de 84P2A9 descritos aquí tienen una serie de utilidades específicas distintas, como su utilización en la identificación de alteraciones cromosómicas oncogénicas asociadas en 1q32.3. Es más, además, de su utilización en ensayos diagnósticos, las proteínas y polinucleótidos relacionados con 84P2A9 descritos aquí tienen otras utilidades, como su utilización en el análisis forense de tejidos de origen desconocido (véase, por ejemplo, Takahama K., *Forensic Sci Int* 1996 Jun 28; 80(1-2):63-9).

Polinucleótidos de 84p2a9

Un aspecto de la invención proporciona polinucleótidos que corresponden o son complementarios de todo o parte del gen, mRNA y/o secuencia codificante de 84P2A9, preferiblemente de forma aislada, como los polinucleótidos que codifican una proteína 84P2A9 y fragmentos de la misma, DNA, RNA, híbridos DNA/ RNA y moléculas relacionadas, polinucleótidos u oligonucleótidos complementarios a un gen o secuencia de mRNA de 84P2A9 o una parte de los mismos, y polinucleótidos u oligonucleótidos que hibridan con un gen, mRNA o un polinucleótido que codifica para 84P2A9 (colectivamente, "polinucleótidos de 84P2A9").

Una realización de un polinucleótido de 84P2A9 es un polinucleótido de 84P2A9 con la secuencia que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1. Un polinucleótido de 84P2A9 puede comprender un polinucleótido con la secuencia de nucleótidos del 84P2A9 humano como la que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1, en la que T puede también ser U; un polinucleótido que codifica para la totalidad o parte de la proteína 84P2A9; una secuencia complementaria a la anterior; o un fragmento de polinucleótido de cualquiera de los anteriores. Otra realización comprende un polinucleótido con la secuencia que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1, desde el residuo nucleotídico número 163 hasta el residuo nucleotídico número 1674, o desde el residuo número 718 hasta el residuo número 1390, en la que T puede también ser U. Otra realización comprende un polinucleótido que codifica un polipéptido de 84P2A9 cuya secuencia está codificada por el cDNA contenido en el plásmido depositado en la American Type Culture Collection con el N° de acceso PTA-1151. Otra realización comprende un polinucleótido que es capaz de hibridar bajo condiciones de hibridación restrictivas con el cDNA de 84P2A9 humano que se muestra en el Id. de Sec. N°: 1 o con un fragmento de polinucleótido del mismo.

Las realizaciones típicas de la invención descritas en la presente memoria incluyen los polinucleótidos de 84P2A9 que codifican porciones específicas de la secuencia de mRNA de 84P2A9 (y las que son complementarias de dichas secuencias) como las que codifican la proteína y fragmentos de la misma, por ejemplo de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos contiguos. Por ejemplo, realizaciones representativas de la invención descritas aquí incluyen: polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido en posición 1 a alrededor del aminoácido 10 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2 (Id. de Sec. N°: 2), polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 10 a alrededor del aminoácido 20 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 20 a alrededor del aminoácido 30 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 30 a alrededor del aminoácido 40 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 40 a alrededor del aminoácido 50 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 50 a alrededor del aminoácido 60 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 60 a alrededor del aminoácido 70 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 70 a alrededor del aminoácido 80 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 80 a alrededor del aminoácido 90 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2 y polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 90 a alrededor del aminoácido 100 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, etc. Siguiendo este esquema, los polinucleótidos (de al menos 10 ácidos nucleicos) que codifican porciones de la secuencia aminoácídica de los aminoácidos 100-504 de la proteína 84P2A9 son típicas realizaciones de la invención.

Los polinucleótidos que codifican porciones de mayor longitud de la proteína 84P2A9 también se contemplan. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican de alrededor del aminoácido 1 (o 20, o 30 o 40 etc.) a alrededor del aminoácido 20, (o 30, o 40 o 50 etc.) de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2 pueden generarse mediante una serie de técnicas bien conocidas en la materia. Una realización ilustrativa de tales polinucleótidos consiste en un polinucleótido con la secuencia que se muestra en la Fig. 2, desde el residuo nucleotídico número 718 hasta el residuo nucleotídico número 1390.

Realizaciones ilustrativas adicionales de la invención descrita aquí incluyen los fragmentos de polinucleótido de 84P2A9 que codifican para uno o más de los motivos biológicos que contiene la secuencia de la proteína 84P2A9. En una realización, los fragmentos de polinucleótido típicos de la invención pueden codificar una o más de las secuencias de localización nuclear descritas aquí. En otra realización, los fragmentos de polinucleótido típicos de la invención pueden codificar una o más de las regiones de 84P2A9 que muestran homología con LUCA 15 y/o KIAA1152 y/o antígeno de cáncer de pulmón NY-Lu-12 (AF 042857), que muestra los motivos de dedos de Zinc y de unión a RNA (véase, por ejemplo, Gure et al., Cancer Res. 58(5): 1034-1041 (1998)). En otra realización de la invención, los fragmentos de polinucleótido típicos pueden codificar uno o más de los puntos de N-glucosilación de 84P2A9, puntos de fosforilación por quinasas de proteínas dependientes de cAMP y cGMP, puntos de fosforilación por la quinasa de caseína II o puntos de N-miristilación y puntos de amidación como se describe en más detalle en el texto que aquí discute la proteína y polipéptidos de 84P2A9. En otra realización de la invención, los fragmentos de polinucleótido típicos pueden codificar secuencias que son únicas de una o más variantes alternativas de corte y empalme de 84P2A9, como la variante de corte y empalme que genera el transcrito de 4,5 KB que se sobreexpresa en los cánceres de próstata que se muestra en la Fig. 4.

Los polinucleótidos de los párrafos precedentes tienen un número de utilizaciones específicas diferentes. Por ejemplo, como el gen 84P2A9 humano se mapea en el cromosoma 1q32.3, los polinucleótidos que codifican diferentes regiones de la proteína 84P2A9 pueden utilizarse para caracterizar anomalías citogenéticas en el cromosoma 1, banda q32 que se han identificado como asociadas con varios cánceres. En particular, se han identificado una serie de anomalías cromosómicas en 1q32, como translocaciones y deleciones, como anomalías citogenéticas frecuentes en un número de cánceres diferentes (véase, por ejemplo, Bieche et al., Genes Chromosomes Cancer, 24 (3):255-263 (1999); Gorunova et al., Genes Chromosomes Cancer, 26 (4):312-321 (1999); Reid et al., Cancer Res. (22):5415-5423 (1995)). En consecuencia, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de la proteína 84P2A9 proporcionan nuevas herramientas que pueden utilizarse para delinear con mayor precisión de la que hasta ahora era posible, la naturaleza específica de las anomalías citogenéticas en esta región del cromosoma 1 que pueden contribuir al fenotipo maligno. En este contexto, estos polinucleótidos satisfacen la necesidad en la materia de expandir la sensibilidad del cribado cromosómico para identificar anomalías cromosómicas más sutiles y menos comunes (véase, por ejemplo, Evans et al., Am. J. Obstet. Gynecol 171 (4):1055-1057 (1994)).

Alternativamente, como se ha detectado que 84P2A9 está sobreexpresada en los cánceres de próstata (Fig. 4), estos polinucleótidos pueden utilizarse en métodos de valoración del estado de los productos del gen 84P2A9 en tejidos normales frente a cancerosos. Típicamente, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de la proteína 84P2A9 pueden utilizarse para valorar la presencia de alteraciones (como deleciones, inserciones, mutaciones puntuales o alteraciones que resultan en la pérdida de un antígeno, etc.) en regiones específicas (aquellas regiones que contienen una señal de localización nuclear) de los productos del gen 84P2A9. Ejemplos de ensayos incluyen tanto los ensayos de RT-PCR como el análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla (SSCP) (véase, por ejemplo, Marrogi et al., J. Cutan. Pathol. 26 (8):369-378 (1999)), en los que en ambos se utilizan polinucleótidos que codifican regiones específicas de una proteína para examinar estas regiones de la proteína.

Otras realizaciones de la invención descritas aquí relacionadas con los ácidos nucleicos específicamente contem-

plados son las moléculas de DNA genómico, cDNA, ribozimas y moléculas antisentido, así como moléculas de ácido nucleico basadas en un esqueleto alternativo o que incluye bases alternativas, tanto derivadas de fuentes naturales como sintéticas. Por ejemplo, las moléculas antisentido pueden ser RNA u otras moléculas, como ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o moléculas de ácido no nucleico como los derivados fosforotioato, que se unen específicamente al DNA o RNA de forma dependiente de par de bases. Un experto puede obtener fácilmente estos tipos de moléculas de ácido nucleico utilizando los polinucleótidos de 84P2A9 y las secuencias de polinucleótido descritas aquí.

La tecnología antisentido incluye la administración de oligonucleótidos exógenos que se unen a un polinucleótido diana localizado en las células. El término "antisentido" se refiere al hecho de que tales oligonucleótidos son complementarios a sus dianas intracelulares, por ejemplo, 84P2A9. Véase por ejemplo, Jack Cohen, OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; y Synthesis 1:1-5 (1988). Los 84P2A9 oligonucleótidos antisentido de la presente invención incluyen derivados como los S-oligonucleótidos (derivados fosforotioato o S-oligos, véase, Jack Cohen, más arriba), que muestran una acción inhibidora del crecimiento de las células tumorales mejorada. Los S-oligos (fosforotioatos nucleosídicos) son análogos isoelectrónicos de un oligonucleótido (O-oligo) en el que se reemplaza un átomo de oxígeno no enlazante del grupo fosfato por un átomo de azufre. Los S-oligos de la presente invención pueden obtenerse mediante el tratamiento de los O-oligos correspondientes con 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido, que es un reactivo de transferencia de azufre. Véase Iyer, R. P. et al, J. Org. Chem. 55:4693-4698 (1990); y Iyer, R. P. et al., J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254 (1990). Oligonucleótidos antisentido adicionales de 84P2A9 de la presente invención incluyen los oligonucleótidos antisentido morfolino conocidos en la materia (véase, por ejemplo, Partridge et al., 1996, Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6: 169-175).

Los oligonucleótidos antisentido de 84P2A9 de la presente invención normalmente pueden ser RNA o DNA que es complementario e híbrida de forma estable con los primeros 100 codones en N-terminal o los últimos 100 codones en C-terminal de la secuencia genómica de 84P2A9 o el mRNA correspondiente. La complementariedad absoluta no es necesaria, aunque son preferibles los niveles de complementariedad elevados. La utilización de un oligonucleótido complementario de esta región permite la hibridación selectiva con el mRNA de 84P2A9 y no con mRNA específicos de otras subunidades reguladoras de proteínas quinasa. Preferiblemente, los oligonucleótidos antisentido de 84P2A9 de la presente invención son un fragmento de 15 a 30-mero de la molécula de DNA antisentido con una secuencia que hibrida con el mRNA de 84P2A9. Opcionalmente, el oligonucleótido antisentido de 84P2A9 es un oligonucleótido 30-mero que es complementario a una región en los 10 codones iniciales en N-terminal o los últimos 10 codones en C-terminal de 84P2A9. Alternativamente, las moléculas antisentido se modifican para utilizar ribozimas en la inhibición de la expresión de 84P2A9. L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; Trends Genet 12: 510-515 (1996).

Otras realizaciones específicas de este aspecto de la invención incluyen los cebadores y pares de cebadores, que permiten la amplificación específica de los polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica del mismo, y sondas que hibridan selectivamente o específicamente con moléculas de ácido nucleico de la invención o cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden estar marcadas con un marcador detectable, como por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, compuesto quimioluminiscente, quelante de metales o enzima. Tales sondas y cebadores pueden utilizarse para detectar la presencia de un polinucleótido de 84P2A9 en una muestra y como medio para la detección de una célula que expresan una proteína 84P2A9.

Ejemplos de tales sondas incluyen polipéptidos que comprenden la totalidad o parte de las secuencias del cDNA de 84P2A9 humano que se muestra en la Fig. 2. Ejemplos de pares de cebadores capaces de amplificar específicamente los mRNA de 84P2A9 también se describen en los Ejemplos que siguen. Como los expertos entenderán, pueden obtenerse una gran cantidad de cebadores y sondas diferentes en función de las secuencias que aquí se proporcionan y pueden utilizarse efectivamente para amplificar y/o detectar un mRNA de 84P2A9.

Los polinucleótidos de 84P2A9 de la invención son útiles para una variedad de propósitos, lo que incluye pero no se limita a su utilización como sondas y cebadores para la amplificación y/o detección del (de los) gen(es) 84P2A9, mRNA(s) o fragmentos del(de los) mismo(s); como reactivos para el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de próstata y otros cánceres; como secuencias codificantes capaces de dirigir la expresión de polipéptidos 84P2A9; como herramientas para la modulación o inhibición de la expresión del (de los) gen(es) 84P2A9 (s) y/o traducción de (de los) transcrito(s) de 84P2A9 y como agentes terapéuticos.

Aislamiento de moléculas de ácido nucleico que codifican para 84P2A9

Las secuencias de cDNA de 84P2A9 descritas en la presente memoria permiten el aislamiento de otros polinucleótidos que codifican producto(s) del gen 84P2A9, así como el aislamiento de polinucleótidos que codifican productos homólogos del gen 84P2A9, y alternativamente, las isoformas de corte y empalme, variantes alélicas y formas mutantes del producto del gen 84P2A9. Varios métodos de clonaje molecular que pueden utilizarse para aislar los cDNA completos que codifican un gen 84P2A9 son bien conocidas (véase, por ejemplo, Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel et al., Ed., Wiley y Sons, 1995). Por ejemplo, pueden usarse de forma conveniente las metodologías de clonaje en fago lambda, utilizando los sistemas de clonaje comercialmente disponibles (por ejemplo, Lambda ZAP Express, Stratagene). Los clones fágicos que contienen los cDNA del gen 84P2A9 pueden identificarse

mediante la hibridación con un cDNA de 84P2A9 marcado o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, el cDNA de 84P2A9 (Fig. 2) o una porción del mismo puede sintetizarse y utilizarse como sonda para recuperar cDNA solapados y completos correspondientes a un gen 84P2A9. El gen 84P2A9 en sí mismo puede aislarse mediante el cribado de bibliotecas de DNA genómico, bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), bibliotecas de cromosomas artificiales de levadura (YAC) y similares, con sondas o cebadores del DNA de 84P2A9.

Moléculas de dna recombinante y sistemas huésped-vector

La invención también proporciona moléculas de DNA o RNA recombinante que contienen un polinucleótido de 84P2A9 o un fragmento o análogo u homólogo del mismo, lo que incluye pero no se limita a fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YAC, BAC, así como varios vectores víricos y no víricos bien conocidos en la materia, y células transformadas o transfectadas con tales moléculas de DNA o RNA recombinante. Como se utiliza aquí, una molécula de DNA o RNA recombinante es una molécula de DNA o RNA que se ha sometido a una manipulación molecular in vitro. Los métodos para generar tales moléculas son bien conocidos (véase, por ejemplo, Sambrook et al, 1989, más arriba).

La invención además proporciona un sistema huésped-vector que comprende una molécula de DNA recombinante que contiene un polinucleótido de 84P2A9 o un fragmento o análogo u homólogo del mismo en una célula huésped procariota o eucariota adecuada. Ejemplos de células huésped eucariotas adecuadas incluyen las células de levaduras, células vegetales o células animales, como las células de mamífero o células de insecto (por ejemplo, una célula infectable por baculovirus, como las células Sf9 o HighFive). Los ejemplos de células de mamífero adecuadas incluyen varias líneas celulares de cáncer de próstata como DU145 y TsuPr1, otras líneas celulares de cáncer de próstata transfectables o transducibles, así como un número de células de mamífero que se utilizan de forma rutinaria para la expresión de proteínas recombinantes (por ejemplo, células COS, CHO, 293, 293T). En particular, un polinucleótido que comprende la secuencia codificante de 84P2A9 o un fragmento o análogo u homólogo del mismo puede utilizarse para generar proteínas 84P2A9 o fragmentos de las mismas utilizando cualquier número de sistemas huésped-vector utilizados de forma rutinaria y ampliamente conocidos en la materia.

Hay disponible un amplio rango de sistemas huésped-vector adecuados para la expresión de proteínas 84P2A9 o fragmentos de las mismas, véase por ejemplo, Sambrook et al., 1989, más arriba; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, más arriba). Los vectores preferidos para la expresión en mamíferos incluyen pero no se limitan a pcDNA 3.1 myc-cola de His (Invitrogen) y el vector retroviral pSRatkneo (Muller et al., 1991, MCB 11:1785). Utilizando estos vectores de expresión, 84P2A9 puede expresarse preferiblemente en varias líneas celulares de cáncer de próstata y diferente de próstata, como por ejemplo 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 y TsuPr1. Los sistemas huésped-vector de la invención son útiles para la producción de una proteína 84P2A9 o fragmento de la misma. Tales sistemas huésped-vector pueden utilizarse para estudiar las propiedades funcionales de 84P2A9 y las mutaciones o análogos de 84P2A9.

La proteína 84P2A9 humana recombinante o un análogo u homólogo o fragmento de la misma puede producirse mediante células de mamífero transfectadas con una construcción que codifique 84P2A9. En una realización ilustrativa descrita en los Ejemplos, las células 293T pueden transfectarse con un plásmido de expresión que codifica 84P2A9, o fragmento o análogo u homólogo del mismo, la proteína 84P2A9 o relacionada se expresa en las células 293T, y la proteína 84P2A9 recombinante puede aislarse utilizando métodos de purificación estándar (por ejemplo, purificación por afinidad utilizando anticuerpos anti-84P2A9). En otra realización, también descrita en los Ejemplos aquí, la secuencia codificante de 84P2A9 se subclona en el vector retroviral pSRaMSVtkneo y se utiliza para infectar varias líneas celulares de mamífero, como NIH 3T3, TsuPr1, 293 y rat-1 para establecer líneas celulares que expresan 84P2A9. También pueden utilizarse otros varios sistemas de expresión bien conocidos en la materia. Las construcciones de expresión que codifican un péptido líder unido en marco de lectura con la secuencia codificante de 84P2A9 pueden utilizarse para la generación de una forma secretada de la proteína 84P2A9 recombinante.

Las proteínas codificadas por los genes 84P2A9, o por los análogos u homólogos o fragmentos de las mismas, tendrán una gran variedad de usos, lo que incluye pero no se limita a la generación de anticuerpos y en métodos para la identificación de ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se unen a un producto del gen 84P2A9. Los anticuerpos generados contra una proteína 84P2A9 o fragmento de la misma pueden ser útiles en los ensayos diagnósticos y pronósticos, y las metodologías de imagen en el manejo de los cánceres humanos caracterizados por la expresión de la proteína 84P2A9, lo que incluye pero no se limita a cánceres de próstata y testículos. Tales anticuerpos pueden expresarse de forma intracelular y utilizarse en métodos de tratamiento de los pacientes con tales cánceres. Se contemplan varios ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas 84P2A9, lo que incluye pero no se limita a varios tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunosorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), métodos inmunocitoquímicos y similares. Tales anticuerpos pueden estar marcados y utilizarse como reactivos para la detección inmunológica capaces de detectar las células que expresan 84P2A9 (por ejemplo, en métodos de imagen radioscintigráficos). Las proteínas 84P2A9 también pueden ser particularmente útiles para la generación de vacunas contra el cáncer, como se describe en detalle a continuación.

Polipéptidos 84P2A9

Otro aspecto de la presente invención proporciona proteínas relacionadas con 84P2A9 y fragmentos de polipéptido de las mismas. Las realizaciones específicas de las proteínas 84P2A9 comprenden un polipéptido con la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 humana como la que se muestra en la Fig. 2. Alternativamente, las realizaciones de las proteínas 84P2A9 comprenden variantes de polipéptidos con alteraciones en la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 humana que se muestran en la Fig. 2.

En general, las variantes alélicas que aparecen de forma natural de la 84P2A9 humana comparten un alto grado de identidad estructural y homología (por ejemplo, el 90% o más identidad). Típicamente, las variantes alélicas de las proteínas relacionadas con 84P2A9 contienen sustituciones conservativas de aminoácido en las secuencias de 84P2A9 descritas aquí o contienen una sustitución de un aminoácido en la posición correspondiente en un homólogo de 84P2A9. Un tipo de variantes alélicas de 84P2A9 son las proteínas que comparten un alto grado de homología con al menos una pequeña región de una secuencia de aminoácidos de 84P2A9 particular, pero que además contiene una disparidad radical de la secuencia, como una sustitución no conservativa, truncación, inserción o cambio de marco de lectura. En las comparaciones de las secuencias de proteína, los términos similitud, identidad y homología tienen un significado distinto. Además, los conceptos de ortología y paralogía son importantes para describir la relación entre miembros de una familia de proteínas dada en un organismo con los miembros de la misma familia en otros organismos.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas frecuentemente pueden realizarse en una proteína sin alterar ni la conformación ni la función de la proteína. Tales cambios incluyen la sustitución de cualquier isoleucina (I), valina (V) y leucina (L) por cualquier otro de estos aminoácidos hidrofóbicos; ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) y viceversa; glutamina (Q) por asparagina (N) y viceversa; y serina (S) por treonina (T) y viceversa. Otras sustituciones también pueden considerarse conservativas, dependiendo del ambiente del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) frecuentemente pueden intercambiarse, así como alanina (A) y valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrofóbica, frecuentemente puede intercambiarse con leucina e isoleucina, y algunas veces con valina. La lisina (K) y arginina (R) frecuentemente pueden intercambiarse en localizaciones en las que la característica significativa del residuo aminoacídico es su carga y la diferencia de los pK de estos dos residuos aminoacídicos no es significativa. Pueden considerarse como "conservativos" otros tipos de cambios en ambientes particulares (véase, por ejemplo la Tabla 2 aquí; páginas 13-15 "Biochemistry" 2ª Ed. Lubert Stryer Ed. (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol 89, 10915-10919; Lei et al., J Biol Chem, 1995 Mayo 19; 270 (20):11882-6).

Las realizaciones de la invención aquí descritas incluyen una amplia variedad de variantes de las proteínas 84P2A9 aceptadas en la materia, como los polipéptidos con inserciones, delecciones y sustituciones de aminoácido. Las variantes de 84P2A9 pueden obtenerse utilizando métodos conocidos en la materia como la mutagénesis dirigida, de escaneo de alanina y mutagénesis por PCR. La mutagénesis dirigida [Carter et al., Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], mutagénesis de cassette [Wells et al., Gene, 34:315 (1985)], mutagénesis por selección de restricción [Wells et al., Philos. Trans. R Soc. London SerA, 317:415 (1986)] u otras técnicas conocidas pueden realizarse sobre el DNA clonado para producir la variante de DNA de 84P2A9.

El análisis de escaneo de aminoácidos también puede utilizarse para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua que está involucrada en una actividad biológica específica como una interacción proteína-proteína. Entre los aminoácidos de escaneo preferibles están los aminoácidos neutrales relativamente pequeños. Tales aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina típicamente es un aminoácido de escaneo preferido entre este grupo ya que elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y tiene menor probabilidad de alterar la conformación de la cadena principal de la variante. La alanina también es típicamente preferida ya que es el aminoácido más común. Además, frecuentemente se encuentra tanto en posiciones internas como expuestas [Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Si la sustitución de alanina no da lugar a cantidades adecuadas de variante, puede utilizarse un aminoácido isoestérico.

Como se definen en la presente memoria, las variantes, análogos u homólogos de 84P2A9, tienen el atributo distintivo de tener al menos un epítipo en común con una proteína 84P2A9 con la secuencia de aminoácidos del Id. de Sec. N°: 2, de forma que un anticuerpo o célula que se une específicamente a una variante 84P2A9 también se unirá específicamente a la proteína 84P2A9 con la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 2. Un polipéptido deja de ser una variante de la proteína que se muestra en el Id. de Sec. N°: 2 cuando ya no contiene un epítipo capaz de ser reconocido por un anticuerpo o célula T que se une específicamente a una proteína 84P2A9. Los expertos en la materia entenderán que los anticuerpos que reconocen proteínas se unen a epítopos de tamaño variable, y se considera que una agrupación del orden de alrededor de cuatro o cinco aminoácidos, contiguos o no, es el número típico de aminoácidos en un epítipo mínimo. Véase, por ejemplo, Nair et al., J. Immunol 2000 165 (12):6949-6955; Hebbes et al., Mol Immunol (1989) 26 (9):865-73; Schwartz et al., J Immunol (1985) 135 (4):2598-608. Otro tipo específico de variantes de proteína relacionadas con 84P2A9 comparte el 90% o más identidad con la secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N°: 2 o un fragmento de la misma. Otro tipo específico de variantes o análogos de la proteína 84P2A9 comprende uno o más de los motivos biológicos de 84P2A9 descritos a continuación o que actualmente se conocen en la materia. Así, están incluidos en la presente invención los análogos de fragmentos de 84P2A9 (ácido nucleico o aminoácido) que alteran las propiedades funcionales (por ejemplo inmunogénicas) en

relación al fragmento de partida. Se debe apreciar que los motivos actuales o los que formen parte de la materia son de aplicación en las secuencias de ácido nucleico o aminoácido de la Fig. 2.

Como se discute en la presente memoria, las realizaciones de la invención reivindicada incluyen polipéptidos que contienen una secuencia de menos de los 504 aminoácidos de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2. Por ejemplo, las realizaciones representativas de la invención comprenden los péptidos/ proteínas con 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos contiguos de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2 (Id. de Sec. N°: 2). Además, realizaciones representativas de la invención descrita aquí incluyen los polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 1 hasta alrededor del aminoácido 10 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 10 hasta alrededor del aminoácido 20 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 20 hasta alrededor del aminoácido 30 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 30 hasta alrededor del aminoácido 40 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 40 hasta alrededor del aminoácido 50 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 50 hasta alrededor del aminoácido 60 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 60 hasta alrededor del aminoácido 70 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 70 hasta alrededor del aminoácido 80 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 80 hasta alrededor del aminoácido 90 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2 y polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 90 hasta alrededor del aminoácido 100 de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2, etc. a lo largo de la totalidad de la secuencia de 84P2A9. Siguiendo este esquema, los polipéptidos que comprenden porciones de la secuencia aminoacídica de los aminoácidos 100-504 de la proteína 84P2A9 son realizaciones típicas de la invención. Los polipéptidos que comprenden porciones mayores de la proteína 84P2A9 también se contemplan. Por ejemplo, los polipéptidos que comprenden desde alrededor del aminoácido 1 (o 20 o 30 o 40, etc.) hasta alrededor del aminoácido 20 (o 30 o 40 o 50, etc.) de la proteína 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2 pueden generarse mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la materia. Se debe apreciar que las posiciones de inicio y finalización en este párrafo se refieren a la posición especificada así como esta posición más o menos 5 residuos.

Realizaciones ilustrativas adicionales de la invención descritas aquí incluyen las proteínas relacionadas con 84P2A9 que contienen los residuos aminoacídicos de uno o más de los motivos biológicos que se encuentran en la secuencia de las proteínas relacionadas con 84P2A9 como se muestra en la Figura 2. En una realización, las proteínas de la invención comprenden una o más de las secuencias de localización nuclear de 84P2A9 como RKRR en los residuos 42-45 del Id. de Sec. N°: 2, RKRR en los residuos 47-50 del Id. de Sec. N°: 2, KRRP en los residuos 101-104 del Id. de Sec. N°: 2, RRRRRK en los residuos 135-139 del Id. de Sec. N°: 2 y/o KKRK en los residuos 186-189 del Id. de Sec. N°: 2. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los puntos de N-glucosilación de 84P2A9, como NRTL en los residuos 131-134 del Id. de Sec. N°: 2, NQTN en los residuos 212-215 del Id. de Sec. N°: 2 y/o NCSV en los residuos 394-397 del Id. de Sec. N°: 2. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden una o más de las regiones de 84P2A9 que muestran homología con LUCA 15 y/o KIAA1152. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los puntos de fosforilación por proteínas quinasas dependientes de cAMP y cGMP de 84P2A9, como KRRS en los residuos 48-51 del Id. de Sec. N°: 2 y/o RRPS en los residuos 102-105 del Id. de Sec. N°: 2. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los puntos de fosforilación por proteína quinasa C de 84P2A9, como TLR en los residuos 133-135 del Id. de Sec. N°: 2, SNK en los residuos 152-154 del Id. de Sec. N°: 2, SDR en los residuos 171-173 del Id. de Sec. N°: 2, TNK en los residuos 214-217 del Id. de Sec. N°: 2, SRR en los residuos 313-315 del Id. de Sec. N°: 2, SSK en los residuos 328-330 del Id. de Sec. N°: 2 y/o SVR en los residuos 396-398 del Id. de Sec. N°: 2. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los puntos de fosforilación por la caseína quinasa II de 84P2A9, como SALE en los residuos 10-13 del Id. de Sec. N°: 2, SSLE en los residuos 70-73 del Id. de Sec. N°: 2, SLEE en los residuos 71-74 del Id. de Sec. N°: 2, SDSD en los residuos 91-94 del Id. de Sec. N°: 2, TNKD en los residuos 214-217 del Id. de Sec. N°: 2, SESD en los residuos 232-235 del Id. de Sec. N°: 2, SSTD en los residuos 240-243 del Id. de Sec. N°: 2, TNDE en los residuos 248-251 del Id. de Sec. N°: 2, TELD en los residuos 287-290 del Id. de Sec. N°: 2 y/o TEHD en los residuos 374-377 del Id. de Sec. N°: 2. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los puntos de N-miristilación, como GSDSSL en los residuos 67-72 del Id. de Sec. N°: 2, GLFTND en los residuos 245-250 del Id. de Sec. N°: 2, GGACGI en los residuos 269-274 del Id. de Sec. N°: 2, GGTPTS en los residuos 336-341 del Id. de Sec. N°: 2, GTPTSM en los residuos 337-342 del Id. de Sec. N°: 2, GSLCTG en los residuos 409-414 del Id. de Sec. N°: 2, GSGLGR en los residuos 459-464 del Id. de Sec. N°: 2 y/o GLGLGF en los residuos 481-486 del Id. de Sec. N°: 2. En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más puntos de amidación, como RGRK en los residuos 45-48 del Id. de Sec. N°: 2 y/o RGKR en los residuos 113-116 del Id. de Sec. N°: 2. Una realización ilustrativa de tal polipéptido incluye dos o más secuencias de aminoácido seleccionadas de entre el grupo que consiste en KKRK, NQTN, NCSV, TNK, SRR, SSK, SVR, GLFTND, GGACGI, GGTPTS, GTPTSM y GSLCTG (como se han identificado anteriormente en el Id. de Sec. N°: 2). En una realización preferida, el polipéptido comprende tres o cuatro, o cinco o seis, o más de las secuencias de aminoácido KKRK, NQTN, NCSV, TNK, SRR, SSK, SVR, GLFTND, GGACGI, GGTPTS, GTPTSM y GSLCTG (como se han identificado anteriormente en el Id. de Sec. N°: 2).

En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los epítomos inmunorreactivos, identificados mediante un proceso descrito aquí, como los que se muestran en la Tabla 1. Los procesos para la identificación de péptidos y análogos con afinidades por moléculas de HLA y que se correlacionan con epítomos inmunogénicos, son bien conocidos en la materia. También se han descrito los principios para la creación de análogos de tales epítomos para modular la inmunogenicidad. Una serie de referencias son útiles en la identificación de tales moléculas. Véase, por ejemplo, la WO 9733602 de Chestnut et al.; Sette, *Immunogenetics* 1999 50 (3-4):201-212; Sette et al., *J. Immunol.* 2001 166 (2):1389-1397; Alexander et al., *Immunol. Res.* 18 (2):79-92; Sidney et al., *Hum. Immunol.* 1997 58 (1):12-20; Kondo et al., *Immunogenetics* 1997 45 (4):249-258; Sidney et al., *J. Immunol.* 1996 157 (8):3480-90; y Falk et al., *Nature* 351: 290-6 (1991); Hunt et al., *Science* 255:1261-3 (1992); Parker et al., *J. Immunol.* 149:3580-7 (1992); Parker et al., *J. Immunol.* 152:163-75 (1994); Kast et al., 1994 152 (8):3904-12; Borrás-Cuesta et al., *Hum. Immunol.* 2000 61 (3):266-278; Alexander et al., *J. Immunol.* 2000 164 (3):1625-1633; Alexander et al., PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan et al., *J. Immunol.* 1991 147 (8):2663-2669; Alexander et al., *Immunity* 1994 1 (9):751-761 y Alexander et al., *Immunol. Res.* 1998 18 (2):79-92.

Las realizaciones relacionadas con la invención comprenden polipéptidos que contienen combinaciones de los diferentes motivos discutidos aquí, en las que ciertas realizaciones no contienen inserciones, deleciones o sustituciones en los motivos o las secuencias intermedias de estos polipéptidos. Además, las realizaciones que incluyen un número de residuos aminoacídicos en N-terminal y/o C-terminal a cualquier lado de estos motivos pueden ser deseables (para, por ejemplo, incluir una mayor porción de la arquitectura del polipéptido donde el motivo se localiza). Típicamente el número de residuos aminoacídicos en N-terminal y/o C-terminal a cada lado de un motivo está entre alrededor de 1 y alrededor de 100 residuos aminoacídicos, preferiblemente de 5 a alrededor de 50 residuos aminoacídicos.

En otra realización de la invención, las proteínas de la invención comprenden secuencias de aminoácidos que son exclusivas de una o más variantes de corte y empalme alternativo de 84P2A9, como la variante de corte y empalme codificada por el transcrito de 4,5 kB que se sobreexpresa en los cánceres de próstata y que se muestran en la Fig. 4. La monitorización de las variantes de corte y empalme alternativo de 84P2A9 es útil ya que los cambios en el corte y empalme alternativo de las proteínas se ha sugerido como uno de los pasos de una serie de eventos que conducen a la progresión de los cánceres (véase, por ejemplo, Carstens et al., *Oncogene* 15 (25):3059-3065 (1997)). En consecuencia, la monitorización de las variantes de corte y empalme alternativo de 84P2A9 proporciona un medio adicional de evaluación de los síndromes asociados con las alteraciones en productos del gen 84P2A9, como los cánceres.

Los polipéptidos que comprenden uno o más de los motivos de 84P2A9 discutidos aquí son útiles en la elucidación de las características específicas de un fenotipo maligno, en vista de la observación de que los motivos de 84P2A9 discutidos aquí están asociados con la desregulación del crecimiento y ya que 84P2A9 se sobreexpresa en los cánceres (Fig. 4). Así, la presencia en una proteína de los motivos relacionados con estas enzimas o moléculas es relevante. Por ejemplo, la caseína quinasa II, las proteínas quinasa dependientes de cAMP y cGMP, y la proteína quinasa C, por ejemplo, son enzimas conocidos por su asociación con el desarrollo de un fenotipo maligno (véase, por ejemplo, Chen et al., *Lab Invest.* 78 (2):165-174 (1998); Gaidon et al., *Endocrinology* 136 (10):4331-4338 (1995); Hall et al., *Nucleic Acids Research* 24 (6):1119-1126 (1996); Peterziel et al., *Oncogene* 18 (46):6322-6329 (1999) y O'Brian, *Oncol. Rep.* 5 (2):305-309 (1998)). Además, tanto la glucosilación como la miristilación son modificaciones de las proteínas también asociadas con el cáncer y la progresión del cáncer (véase, por ejemplo, Dennis et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1473 (1):21-34 (1999); Raju et al., *Exp. Cell Res.* 235 (1):145-154 (1997)). La amidación es otra modificación de las proteínas asociada con el cáncer y la progresión del cáncer (véase, por ejemplo, Treston et al., *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* (13):169-175 (1992)). Además, se cree que las secuencias de localización nuclear influyen en el potencial maligno de una célula (véase, por ejemplo, Mirski et al., *Cancer Res.* 55 (10):2129-2134 (1995)).

Las proteínas de la invención tienen una serie de utilidades específicas diferentes. Como se ha demostrado que 84P2A9 se sobreexpresa en los cánceres de próstata (Fig. 4), estos péptidos/proteínas se utilizan en los métodos para valorar el estado de los productos del gen 84P2A9 en tejidos normales frente a cancerosos y la elucidación de fenotipo maligno. Normalmente, los polipéptidos que codifican regiones específicas de la proteína 84P2A9 se utilizan para valorar la presencia de alteraciones (como deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, etc.) en regiones específicas (regiones que contienen una señal de localización nuclear) de los productos del gen 84P2A9. Ejemplos de ensayos utilizan los anticuerpos o células T contra las proteínas relacionadas con 84P2A9 que comprenden los residuos aminoacídicos de uno o más de los motivos biológicos contenidos en la secuencia del polipéptido de 84P2A9 para evaluar las características de esta región en tejidos normales frente a cancerosos. Alternativamente, los polipéptidos de 84P2A9 que contienen los residuos aminoacídicos de uno o más de los motivos biológicos contenidos en las proteínas 84P2A9 se utilizan para cribar factores que interaccionan con esa región de 84P2A9.

Como se discute en la presente memoria, la redundancia del código genético permite la variación en las secuencias del gen 84P2A9. En particular, un experto en la materia reconocerá que hay preferencias específicas de codón por las diferentes especies de huésped específico, y pueden adaptar la secuencia descrita como la preferible para un huésped deseado. Por ejemplo, las secuencias con codón análogo preferidas normalmente tienen codones raros (es decir, codones con una frecuencia de uso inferior a alrededor del 20% en las secuencias conocidas del huésped deseado) reemplazados con codones de frecuencia superior. Las preferencias de codón de una especie específica

se calculan, por ejemplo, mediante la utilización de tablas de uso de codón disponibles en Internet como: <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>. Las secuencias de nucleótidos que se han optimizado para una especie huésped particular mediante el reemplazo de cualquier codón con una frecuencia de uso inferior a alrededor del 20% se denominan aquí "secuencias con codón optimizado".

Se conocen modificaciones de secuencia adicionales que mejoran la expresión de una proteína en una célula huésped. Éstas incluyen la eliminación de secuencias que codifican falsas señales de poliadenilación, señales de puntos de corte y empalme exón/ intrón, repeticiones tipo transposón, y/u otras secuencias bien caracterizadas que son deletéreas para la expresión génica. El contenido de GC de la secuencia se ajusta a los niveles medios de la célula huésped dada, calculándose en referencia a genes conocidos que se expresan en la célula huésped. Cuando es posible, la secuencia se modifica para evitar estructuras secundarias del mRNA en horquilla predecibles. Otras modificaciones útiles incluyen la adición de una secuencia consenso de iniciación de la traducción en el inicio del marco abierto de lectura, como se describe en Kozak, *Mol. Cell Biol.*, 9:5073-5080 (1989). Los expertos entenderán que la norma general de que los ribosomas eucariotas inician la traducción exclusivamente en el codón AUG proximal 5' se altera sólo en condiciones extrañas (véase, por ejemplo, Kozak *PNAS* 92 (7):2662-2666, (1995) y Kozak *NAR* 15 (20):8125-8148 (1987)). Las secuencias de nucleótidos que se han optimizado para su expresión en una especie huésped dada mediante la eliminación de falsas señales de poliadenilación, la eliminación de señales de corte y empalme exón/ intrón, eliminación de repeticiones tipo transposón y/o optimización del contenido en GC además de la optimización de codón se denominan aquí "secuencia de expresión mejorada".

Las proteínas 84P2A9 se realizan de muchas formas, preferiblemente de forma aislada. Una molécula de proteína 84P2A9 purificada estará sustancialmente libre de otras proteínas o moléculas que impiden la unión de 84P2A9 a un anticuerpo u otros ligandos. La naturaleza y grado de aislamiento y purificación dependerá del uso que se pretende hacer. Las realizaciones de una proteína 84P2A9 incluyen una proteína 84P2A9 purificada y una proteína 84P2A9 funcional soluble. En una realización, una proteína 84P2A9 funcional soluble o fragmento de la misma retiene la capacidad de unirse a un anticuerpo, célula T u otros ligandos.

La invención también proporciona proteínas 84P2A9 que comprenden fragmentos biológicamente activos de la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 que corresponden a la parte de la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 que se muestra en la Fig. 2. Tales proteínas de la invención muestran propiedades de la proteína 84P2A9, como la capacidad de inducir la generación de anticuerpos que se unen específicamente a un epítipo asociado con la proteína 84P2A9; de unirse a tales a tales anticuerpos; de permitir la activación de HTL o CTL; y/o de ser reconocida por HTL o CTL.

Las proteínas relacionadas con 84P2A9 se generan utilizando tecnología de síntesis de péptidos estándar o utilizando métodos de escisión química bien conocidos en la materia. Alternativamente, los métodos recombinantes pueden utilizarse para generar moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína relacionada con 84P2A9. En una realización, las moléculas de ácido nucleico que codifican 84P2A9 descritas aquí proporcionan un medio para generar fragmentos definidos de las proteínas 84P2A9. Los fragmentos/ subsecuencias de la proteína 84P2A9 son particularmente útiles para la obtención y caracterización de anticuerpos específicos de dominio (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítipo extracelular o intracelular de una proteína 84P2A9), en la identificación de agentes o factores celulares que se unen a 84P2A9 o a un dominio estructural particular de la misma, y en varios contextos terapéuticos, lo que incluye pero no se limita a las vacunas contra el cáncer o los métodos de preparación de tales vacunas.

Los polipéptidos de 84P2A9 que contienen en particular estructuras de interés pueden predecirse y/o identificarse utilizando varias técnicas analíticas bien conocidas en la materia, como, por ejemplo, los métodos de análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf, o en función de su inmunogenicidad. Los fragmentos que contienen tales estructuras son particularmente útiles en la obtención de anticuerpos o células T anti-84P2A9 específicos de subunidad, o en la identificación de factores celulares que se unen a 84P2A9.

Como ilustración de ello, se predijo la unión de péptidos derivados de proteínas 84P2A9 a la molécula de MHC humano clase I HLA-A2. Específicamente, la secuencia de aminoácidos completa de la proteína 84P2A9 se introdujo en el algoritmo de búsqueda de motivos de péptidos del HLA creado en la sección de Bioinformática y Análisis Molecular (BIMAS), página web (<http://bimas.dcrf.nih.gov/>). El algoritmo de búsqueda de motivos de péptidos del HLA lo desarrolló el Dr. Ken Parker basado en la unión de secuencias peptídicas específicas al surco de las moléculas de HLA de clase I y específicamente la HLA-A2 (véase, por ejemplo, Falk et al., *Nature* 351:290-6 (1991); Hunt et al., *Science* 255:1261-3 (1992); Parker et al., *J. Immunol.* 149:3580-7 (1992); Parker et al., *J. Immunol.* 152:163-75 (1994)). Este algoritmo permite la localización y clasificación de péptidos 8-meros, 9-meros y 10-meros a partir de una secuencia de proteína completa según la predicción de su unión a HLA-A2, así como otras numerosas moléculas de HLA de clase I. Muchos péptidos de unión a HLA clase I son 8-, 9-, 10 u 11-meros. Por ejemplo, para HLA-A2 de clase I, los epítopos preferiblemente contienen una leucina (L) o metionina (M) en la posición 2 y una valina (V) o leucina (L) en C-terminal (véase, por ejemplo, Parker et al., *J. Immunol.* 149:3580-7 (1992)). Los resultados seleccionados de la predicción de unión de los péptidos de 84P2A9 son los que se muestran en la Tabla 1 a continuación. Se debe apreciar que puede utilizarse cada epítipo predicho por la página del BIMAS, o especificado por el HLA de clase I o los motivos de clase I disponibles en la materia (por ejemplo, visualmente, mediante métodos basados en

informática o apreciados por los expertos en la materia relevante) o que forman parte de la materia y están dentro del alcance de la invención. En Tabla 1, se muestra la clasificación de los 10 mejores candidatos para cada miembro de la familia junto a su localización, la secuencia de aminoácidos de cada péptido específico, y una puntuación de unión estimada. La puntuación de unión corresponde al tiempo medio estimado de disociación de los complejos que contienen el péptido, a 37°C y a pH 6,5. Los péptidos con la mayor puntuación de unión (es decir 63,04 para 84P2A9) tienen la predicción de ser los que se unen más fuertemente al HLA de clase I sobre la superficie de la célula durante el mayor período de tiempo y por lo tanto, representan las mejores dianas inmunogénicas para el reconocimiento de las células T. La unión real de los péptidos a un alelo del HLA puede evaluarse mediante la estabilización de la expresión del HLA en la línea celular T2 defectiva en el procesamiento del antígeno (véase, por ejemplo, Xue et al., *Prostate* 30:73-8 (1997) y Peshwa et al., *Prostate* 36:129-38 (1998)). La inmunogenicidad de péptidos específicos pueden evaluarse in vitro por la estimulación de linfocitos T citotóxicos CD8+ (LTC) en presencia de células presentadoras de antígeno como las células dendríticas.

En una realización descrita en los ejemplos que siguen, 84P2A9 puede expresarse convenientemente en células (como las células 293T) transfectadas con un vector de expresión comercialmente disponible como un vector de expresión dirigido por CMV que codifica para 84P2A9 con una cola en C-terminal de 6 X His y MYC (pcDNA3.1/mycHis, Invitrogen o Tag5, GenHunter Corporation, Nashville TN). El vector Tag5 proporciona una señal de secreción de IgGK que puede utilizarse para facilitar la producción de una proteína 84P2A9 secretada en las células transfectadas. La 84P2A9 con la cola de His secretada en el medio de cultivo puede purificarse, por ejemplo, utilizando una columna de níquel utilizando técnicas estándar.

Las modificaciones de las proteínas relacionadas con 84P2A9, como las modificaciones covalentes se incluyen en el alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar los residuos aminoácidos deseados de un polipéptido de 84P2A9 con un agente de derivatización orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los residuos N- o C-terminales de 84P2A9. Otro tipo de modificación covalente del polipéptido de 84P2A9 incluido dentro del alcance de esta invención comprende la alteración del patrón nativo de glucosilación de una proteína de la invención. El significado de "alteración del patrón nativo de glucosilación" para los presentes propósitos se pretende que sea la delección de uno o más restos de carbohidrato que se encuentran en la secuencia nativa de 84P2A9 (eliminando el punto de glucosilación subyacente o deleccionando la glucosilación mediante medios químicos y/o enzimáticos), y/o adición de uno o más puntos de glucosilación que no están presentes en la secuencia nativa de 84P2A9. Además, la frase incluye los cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, lo que implica un cambio en la naturaleza y proporciones de los diferentes restos de carbohidrato presentes. Otro tipo de modificación covalente de 84P2A9 comprende la ligación del polipéptido de 84P2A9 a un polímero de una serie de polímeros no proteicos, por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxialquilenos, mediante el método que se presenta en las patentes estadounidenses N° 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 o 4.179.337.

La 84P2A9 de la presente invención también puede modificarse de forma que forme una molécula quimérica que comprende a 84P2A9 fusionada con otro polipéptido o secuencia de aminoácidos heteróloga. Tal molécula quimérica puede sintetizarse químicamente o de forma recombinante. Una molécula quimérica puede tener una proteína de la invención fusionada con otro antígeno asociado a tumores o fragmento del mismo, o puede comprender la fusión de fragmentos de la secuencia de 84P2A9 (de aminoácidos o ácidos nucleicos) de forma que se crea una molécula que no es directamente homóloga, a lo largo de toda su longitud, a las secuencias de aminoácidos o ácido nucleico respectivamente de la Fig. 2 (Id. de Sec. N°: 2); y tal molécula quimérica puede comprender múltiples repeticiones de la misma subsecuencia de 84P2A9. Una molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína relacionada con 84P2A9 con una cola epitopo de polihistidina, lo que proporciona un epitopo al cual el níquel inmovilizado puede unirse selectivamente. La cola epitopo se sitúa generalmente en el extremo amino o carboxilo de 84P2A9. En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína relacionada con 84P2A9 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para que la molécula quimérica tenga una forma bivalente (también denominada "inmunoadhesina"), tal fusión puede ser con la región Fc de una molécula de IgG. Las fusiones con Ig preferiblemente incluyen la sustitución de una forma soluble (con el dominio transmembrana deleccionado o inactivado) de un polipéptido de 84P2A9 con al menos una región variable de una molécula de Ig. En una realización particularmente preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase también la patente estadounidense N° 5.428.130 depositada el 27 de Junio de 1995.

Anticuerpos de 84P2A9

Otro aspecto de la invención proporciona anticuerpos que se unen a las proteínas y polipéptidos relacionados con 84P2A9. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente a una proteína relacionada con 84P2A9 y no se unen (o lo hacen débilmente) a las proteínas diferentes de 84P2A9. En otra realización, los anticuerpos se unen a las proteínas relacionadas con 84P2A9 así como los homólogos de las mismas.

Los anticuerpos anti-84P2A9 de la invención son particularmente útiles en los ensayos diagnósticos y pronósticos del cáncer de próstata, y en las metodologías de imagen. De forma similar, tales anticuerpos son útiles en el tratamiento, diagnóstico y/o pronósticos de otros cánceres, ya que 84P2A9 también se expresa o sobreexpresa en otros tipos de cáncer. Además, los anticuerpos expresados de forma intracelular (por ejemplo, anticuerpos de cadena

sencilla) son terapéuticamente útiles en el tratamiento de cánceres en los que la expresión de 84P2A9 está involucrada, como por ejemplo los cánceres de próstata avanzados y metastáticos.

La invención también proporciona varios ensayos inmunológicos útiles para la detección y cuantificación de 84P2A9 y proteínas relacionadas con 84P2A9 mutantes. Tales ensayos pueden comprender uno o más anticuerpos anti-84P2A9 capaces de reconocer y unirse a una proteína 84P2A9 o mutante de 84P2A9, según sea apropiado, y se realizan en diferentes formatos de ensayo inmunológico bien conocidos en la materia, lo que incluye pero no se limita a varios tipos de radioinmunoensayo, ensayos inmunosorbentes acoplados a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes acoplados a enzima (ELIFA) y similares.

Los ensayos inmunológicos relacionados pero sin anticuerpos de la invención también comprenden los ensayos de inmunogenicidad de células T (inhibitoria o estimuladora) así como ensayos de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Además, también se proporcionan en la invención métodos inmunológicos de imagen capaces de detectar el cáncer de próstata y otros cánceres que expresan 84P2A9, lo que incluye pero no se limita a los métodos de imagen radioscintográficos utilizando anticuerpos anti-84P2A9 marcados. Tales ensayos son clínicamente útiles en la detección, monitorización y pronóstico de cánceres que expresan 84P2A9, como el cáncer de próstata.

Los anticuerpos anti-84P2A9 también pueden utilizarse en métodos de purificación de 84P2A9, y proteínas y polipéptidos mutantes de 84P2A9 y para el aislamiento de homólogos y moléculas relacionadas con 84P2A9. Por ejemplo, en una realización, el método de purificación de una proteína 84P2A9 comprende la incubación de un anticuerpo anti-84P2A9, que se ha acoplado a una matriz sólida, con un lisado u otra solución que contiene 84P2A9, bajo condiciones que permiten que el anticuerpo 84P2A9 se una a 84P2A9; lavando la matriz sólida para eliminar las impurezas; y eluyendo 84P2A9 a partir del anticuerpo acoplado. Otras utilidades de los anticuerpos anti-84P2A9 de la invención incluyen la generación de anticuerpos anti-idiotípicos que mimetizan la proteína 84P2A9.

Diferentes métodos para la preparación de anticuerpos son bien conocidos en la materia. Por ejemplo, pueden obtenerse anticuerpos inmunizando un huésped mamífero adecuado utilizando una proteína, péptido o fragmento relacionados con 84P2A9, de forma aislada o inmuconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Ed., Harlow y Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Además, las proteínas de fusión de 84P2A9 también pueden utilizarse, como una proteína 84P2A9 de fusión a GST. En una realización particular, se obtiene una proteína de fusión a GST que comprende la totalidad o la mayor parte de la secuencia de aminoácidos del marco abierto de lectura de la Fig. 2 y se utiliza como inmunógeno para generar los anticuerpos apropiados. En otra realización, se sintetiza un péptido de 84P2A9 y se utiliza como inmunógeno.

Además, se utilizan técnicas de inmunización con DNA desnudo conocidas en la materia (con o sin proteína 84P2A9 purificada o células que expresan 84P2A9) para generar una respuesta inmune frente al inmunógeno codificado (para una revisión, véase Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15:617-648).

La secuencia de aminoácidos de 84P2A9 como la que se muestra en la Fig. 2 puede utilizarse para seleccionar regiones específicas de la proteína 84P2A9 para la generación de anticuerpos. Por ejemplo, los análisis de hidrofobicidad e hidrofiliidad de la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 se utilizan para identificar regiones hidrofílicas en la estructura de 84P2A9. Las regiones de la proteína 84P2A9 que muestran una estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, pueden identificarse fácilmente utilizando diferentes métodos conocidos en la materia, como los análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf. Así, cada región identificada mediante cualquiera de estos programas/ métodos está dentro del alcance de la presente invención. Los métodos para la generación de anticuerpos anti-84P2A9 se ilustran en más detalle mediante los ejemplos que aquí se proporcionan.

Los métodos para la preparación de una proteína o polipéptido para su utilización como inmunógeno y para la preparación de conjugados inmunogénicos de una proteína con un transportador como BSA, KLH u otras proteínas transportadoras son bien conocidos en la materia. En algunas circunstancias, se emplea la conjugación directa que utiliza, por ejemplo, reactivos carbodiimida; en otras ocasiones son efectivos los reactivos de ligación como los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL. La administración de un inmunógeno de 84P2A9 se realiza generalmente por inyección a lo largo de un periodo de tiempo adecuado y con la utilización de un adyuvante adecuado, como se conoce en general en la materia. Durante el proceso de inmunización, pueden realizarse títulos de los anticuerpos para determinar la adecuada formación de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales anti-84P2A9 pueden obtenerse mediante diferentes métodos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, las líneas celulares immortalizadas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado se preparan utilizando la tecnología estándar de hibridoma de Kohler y Milstein, o modificaciones que immortalizan células B productoras, como es generalmente conocido. Las líneas celulares immortalizadas que secretan los anticuerpos monoclonales deseados se criban mediante un inmunoensayo en el que el antígeno es una proteína relacionada con 84P2A9. Cuando se identifica el cultivo de células immortalizadas apropiado que secreta los anticuerpos deseados, las células pueden expandirse y producirse los anticuerpos a partir de cultivos in vitro o a partir de fluido de ascitis.

Los anticuerpos o fragmentos también pueden producirse, utilizando la actual tecnología, mediante métodos recombinantes. Las regiones que se unen específicamente a las regiones deseadas de la proteína 84P2A9 también pue-

den producirse en el contexto de anticuerpos quiméricos o injertados en la región determinante de complementariedad (CDR) originaria de múltiples especies. También pueden producirse anticuerpos humanizados o humanos de 84P2A9, y son preferidos para su utilización en contextos terapéuticos. Los métodos para la humanización de anticuerpos murinos y otros no humanos, mediante la sustitución de una o más de las CDR del anticuerpo no humano por las correspondientes secuencias de anticuerpo humano, son bien conocidos (véase por ejemplo, Jones et al., 1986, Nature 321:522-525; Riechmnan et al., 1988, Nature 332:323-327; Verhoeven et al., 1988, Science 239:1534-1536). Véase también, Carter et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 y Sims et al., 1993, J. Immunol. 151:2296. Los métodos para la producción de anticuerpos monoclonales totalmente humanos incluyen los métodos de presentación en fagos y transgénicos (para una revisión, véase Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16:535-539).

Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos anti-84P2A9 pueden generarse utilizando tecnologías de clonaje que utilizan grandes bibliotecas combinatoriales de los genes de las Ig humanas (es decir, presentación en fagos) (Griffiths y Hoogenboom, Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries. En: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications en Man. Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, págs. 45-64 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Id., págs. 65-82). Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos de 84P2A9 también pueden producirse utilizando ratones transgénicos creados para que contengan los loci del gen de las inmunoglobulinas humanas como se describe en la solicitud de patente PCT WO 98/24893, Kucherlapati y Jakobovits et al., publicada el 3 de Diciembre de 1997 (véase también Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs 7 (4):G07-G14). Este método evita la manipulación in vitro necesaria con la tecnología de presentación de fagos y produce de forma eficiente auténticos anticuerpos humanos de alta afinidad.

La reactividad de los anticuerpos de 84P2A9 con una proteína relacionada con 84P2A9 puede establecerse mediante una serie de métodos bien conocidos, como el análisis de Western blot, inmunoprecipitación, ELISA y FACS utilizando, según sea apropiado, proteínas o péptidos relacionados con 84P2A9, células que expresan 84P2A9 o extractos de las mismas.

Un anticuerpo anti-84P2A9 o fragmento del mismo de la invención se marca con una señal detectable o se conjuga con una segunda molécula. Las señales detectables adecuadas incluyen, pero no se limitan a los radioisótopos, compuestos fluorescentes, compuestos bioluminiscentes, compuestos quimioluminiscentes, un quelante de metales o una enzima. Además, los anticuerpos bi-específicos específicos para dos o más epítomos de 84P2A9 se generan utilizando métodos generalmente conocidos en la materia. Los anticuerpos homodiméricos también pueden generarse mediante técnicas de ligación cruzada conocidas en la materia (por ejemplo, Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

Animales transgénicos para 84P2A9

Los ácidos nucleicos que codifican para 84P2A9 o sus formas modificadas pueden también utilizarse para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y cribaje de reactivos terapéuticamente útiles. De acuerdo con las técnicas establecidas, el cDNA que codifica para 84P2A9 puede utilizarse para clonar DNA genómico que codifica para 84P2A9 y las secuencias genómicas utilizadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el DNA que codifica para 84P2A9. Los métodos para generar los animales transgénicos, particularmente animales como ratones o ratas, se han convertido en animales habituales en la materia y se describen, por ejemplo, en las patentes estadounidenses N° 4.736.866 y 4.870.009. Normalmente, unas células en particular serán dianas de la incorporación del transgén 84P2A9 con potenciadores específicos de tejido.

Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica para 84P2A9 pueden utilizarse para examinar el efecto del aumento de expresión del DNA que codifica para 84P2A9. Tales animales pueden utilizarse como animales de prueba para reactivos que se cree que confieren protección frente a, por ejemplo, estados patológicos asociados con su sobreexpresión. De acuerdo con esta faceta de la invención, un animal se trata con un reactivo y una incidencia reducida del estado patológico, en comparación con los animales sin tratar que portan el transgén, indicaría una potencial intervención terapéutica en el estado patológico.

Alternativamente, los homólogos no humanos de 84P2A9 pueden utilizarse para obtener un animal "knock out" de 84P2A9 que posee un gen defectuoso o alterado que codifica para 84P2A9 como resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica para 84P2A9 y el DNA genómico alterado que codifica para 84P2A9 introducido en una célula embrionaria del animal. Por ejemplo, el cDNA que codifica para 84P2A9 puede utilizarse para clonar el DNA genómico que codifica para 84P2A9 de acuerdo con las técnicas establecidas. Una porción del DNA genómico que codifica para 84P2A9 puede delecionarse o sustituirse por otro gen, como un gen que codifica para un marcador que puede seleccionarse y puede utilizarse para monitorizar la integración. Normalmente, se incluyen en el vector varias kilobases de DNA flanqueante inalterado (tanto en los extremos 5' como 3') [véase, por ejemplo Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de los vectores de recombinación homóloga]. El vector se introduce en una línea celular de células madre embrionarias (por ejemplo, mediante electroporación) y se seleccionan las células en las que el DNA introducido se ha recombinado de forma homóloga con el DNA endógeno [véase, por ejemplo Li et al., Cell, 69:915 (1992)]. Las células seleccionadas se inyectan entonces en un blas-

tocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación [véase, por ejemplo Bradley, en "Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach", E. J. Robertson, Ed. (IRL, Oxford, 1987), págs. 113-152]. Un embrión quimérico puede entonces implantarse en una hembra adecuada pseudoembarazada receptora y se desarrolla el embrión para conseguir un animal "knock out". La progenie portadora del DNA homológamente recombinado en sus células germinales puede identificarse mediante técnicas estándar y utilizarse para obtener animales en los que todas las células del animal contienen el DNA homológamente recombinado. Los animales "knock out" pueden caracterizarse por ejemplo, por su capacidad de defenderse frente a ciertos estados patológicos y por el desarrollo de estados patológicos debido a la ausencia del polipéptido de 84P2A9.

Métodos para la detección de 84P2A9

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con los métodos para detectar los polinucleótidos 84P2A9 y las proteínas relacionadas con 84P2A9 y las variantes de las mismas, así como los métodos para identificar una célula que expresa 84P2A9. El 84P2A9 parece expresarse en los xenoinjertos LAPC que derivan de la metástasis en nódulos linfáticos y hueso del cáncer de próstata. El perfil de expresión de 84P2A9 lo hace ser un marcador potencial para el diagnóstico de enfermedad metastatizada. En este contexto, el estado de los productos génicos de 84P2A9 proporciona una información útil para predecir una variedad de factores, como la susceptibilidad a un estado avanzado de la enfermedad, la tasa de progresión y/o la agresividad del tumor. Tal y como se discute en detalle más adelante, el estado de los productos génicos de 84P2A9 en muestras de pacientes puede analizarse mediante una serie de protocolos que son bien conocidos en la materia, como el análisis inmunohistoquímico, toda la variedad de técnicas de Northern blot incluida la hibridación in situ, análisis por RT-PCR (por ejemplo en muestras microdisecionadas capturadas con láser), análisis Western blot y análisis mediante un chip de tejidos.

Más concretamente, la invención proporciona ensayos para la detección de polinucleótidos de 84P2A9 en una muestra biológica, como suero, hueso, próstata y otros tejidos, orina, semen, preparaciones celulares, y similares. Los polinucleótidos de 84P2A9 detectables incluyen, por ejemplo, un gen de 84P2A9 o fragmentos de los mismos, mRNA de 84P2A9, variantes del mRNA de 84P2A9 con corte y empalme alternativo y moléculas de DNA o RNA recombinante que contienen un polinucleótido 84P2A9. Son bien conocidos en la materia una serie de métodos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos de 84P2A9 y que pueden utilizarse en la práctica de este aspecto de la invención.

En una realización, un método para detectar un mRNA de 84P2A9 en una muestra biológica comprende la obtención de cDNA a partir de la muestra mediante transcripción inversa utilizando al menos un cebador; la amplificación del cDNA así producido utilizando polinucleótidos de 84P2A9 como cebadores directos y reversos para amplificar los cDNA de 84P2A9 incluidos en éste; y la detección de la presencia del cDNA de 84P2A9 amplificado. Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del cDNA de 84P2A9 amplificado.

En otra realización, un método para detectar un gen de 84P2A9 en una muestra biológica comprende el aislamiento inicial del DNA genómico de la muestra; la amplificación del DNA genómico aislado utilizando polinucleótidos de 84P2A9 como cebadores directos y reversos para amplificar el gen 84P2A9 incluido en éste; y la detección de la presencia del gen de 84P2A9 amplificado. Puede diseñarse cualquier número de combinaciones adecuadas de sondas directas y reversas a partir de las secuencias de nucleótidos de 84P2A9 proporcionadas (Fig. 2) y utilizarse para este propósito.

La invención también proporciona ensayos para detectar la presencia de una proteína 84P2A9 en un tejido de otra muestra biológica como suero, hueso, próstata y otros tejidos, orina, preparaciones celulares y similares. Los métodos para detectar una proteína 84P2A9 son también bien conocidos e incluyen, por ejemplo, la inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de Western Blot, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, en una realización, un método para detectar la presencia de una proteína 84P2A9 en una muestra biológica comprende inicialmente poner en contacto la muestra con un anticuerpo anti-84P2A9, un fragmento reactivo frente a 84P2A9 del mismo o una proteína recombinante que contiene una región de unión a antígeno de un anticuerpo anti-84P2A9; y luego la detección de la unión de la proteína 84P2A9 en la muestra.

También se proporcionan métodos para identificar una célula que expresa 84P2A9. En una realización, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen de 84P2A9 comprende la detección de la presencia del mRNA de 84P2A9 en la célula. Los métodos para la detección de un mRNA particular en las células son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación que utilizan sondas de DNA complementarias (como la hibridación in situ que utiliza ribosondas de 84P2A9 marcadas, el Northern blot y técnicas relacionadas) y varios ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (como la RT-PCR que utiliza cebadores complementarios específicos de 84P2A9, y otro tipo de métodos de detección con amplificación, como, por ejemplo, el DNA ramificado, SISBA, TMA y similares). Alternativamente, un ensayo para la identificación de una célula que expresa un gen de 84P2A9 comprende la detección de la presencia de la proteína de 84P2A9 en la célula o su secreción por la célula. Son bien conocidos en la materia varios métodos para la detección de proteínas y se utilizan para la detección de proteínas 84P2A9 y células que expresan 84P2A9.

El análisis de la expresión de 84P2A9 es también útil como herramienta para identificar y evaluar agentes que modulan la expresión del gen 84P2A9. Por ejemplo, la expresión de 84P2A9 está regulada positivamente de forma signifi-

cativa en el cáncer de próstata, y también se expresa en otros cánceres, como el cáncer de próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovarios, mama, páncreas, colon, linfocítico y cáncer de pulmón. La identificación de una molécula o agente biológico que pudiera inhibir la expresión o sobreexpresión de 84P2A9 en la células cancerígenas es de valor terapéutico. Por ejemplo, dicho agente puede identificarse utilizando una criba en la que se cuantifica la expresión de 84P2A9 mediante RT-PCR, hibridación de ácidos nucleicos o unión de anticuerpos.

Monitorización del estado de 84P2A9 y sus productos

Los ensayos que evalúan el estado del gen de 84P2A9 y los productos génicos de 84P2A9 en un individuo pueden proporcionar información sobre el crecimiento o potencial oncogénico en una muestra biológica de este individuo. Por ejemplo, debido a que el mRNA de 84P2A9 está tan altamente expresado en cáncer de próstata (así como en otros tejidos cancerosos que se muestran por ejemplo en las Fig. 4-8) comparado con los tejidos normales de próstata, los ensayos que evalúan los niveles relativos de transcrito de mRNA o proteínas 84P2A9 en una muestra biológica pueden utilizarse para diagnosticar una enfermedad asociada con la desregulación de 84P2A9, como es el cáncer, y pueden proporcionar una información pronóstica útil para la definición de opciones terapéuticas apropiadas.

Debido a que el 84P2A9 se expresa, por ejemplo, en varios tejidos de xenoinjerto de cáncer de próstata, líneas celulares cancerosas y en muestras de pacientes con cáncer, el estado de la expresión de 84P2A9 puede proporcionar información útil para determinar información como la presencia, estadio y localización de células displásicas, precancerosas y cancerosas, predecir la susceptibilidad a los diferentes estadios de la enfermedad y/o para medir la agresividad del tumor. Además, el perfil de expresión lo hace útil como reactivo de imagen para enfermedad metastatizada. En consecuencia, un aspecto importante de la invención está dirigido a los diferentes métodos moleculares de pronóstico y diagnóstico para analizar el estado de 84P2A9 en muestras biológicas, como las de individuos que padecen, o se sospecha que padecen, una patología caracterizada por un crecimiento celular desregulado como es el cáncer.

La oncogénesis se sabe que es un proceso de múltiples pasos en el que el crecimiento celular se desregula progresivamente y las células progresan de un estado fisiológico normal a uno precanceroso, y después a un estado canceroso (véase, por ejemplo, Alers et al., Lab Invest. 77 (5):437-438 (1997) y Isaacs et al., Cancer Surv. 23:19-32 (1995)). En este contexto, el análisis de una muestra biológica en busca de evidencias de crecimiento celular desregulado (como la expresión aberrante de 84P2A9 en cáncer de próstata) puede permitir la detección temprana de dicha fisiología celular aberrante, antes de que una patología como el cáncer haya progresado hacia un estadio en el que las opciones terapéuticas son más limitadas. En tales análisis, puede compararse por ejemplo el estado de 84P2A9 en una muestra biológica de interés (como una que se sospecha que presenta crecimiento celular desregulado) con el estado de 84P2A9 en la muestra normal correspondiente (por ejemplo una muestra de ese individuo (o alternativamente otro individuo) que no esté afectado por una patología, por ejemplo, uno del que no se sospecha que presente crecimiento celular desregulado). Las alteraciones del estado de 84P2A9 en la muestra biológica de interés (comparado con la muestra normal) proporcionan evidencias de crecimiento celular desregulado. Además de utilizar una muestra biológica que no esté afectada por una patología como muestra normal, también se puede utilizar un valor normativo predeterminado como un nivel normal de expresión de mRNA predeterminado (véase, por ejemplo, Grever et al., J. Comp. Neurol. 9 Dic 1996; 376 (2):306-14 y la patente estadounidense N° 5.837.501) para comparar el 84P2A9 en muestras normales frente a las sospechosas.

El término "estado" en este contexto se utiliza de acuerdo al significado aceptado en la técnica y se refiere a la condición o estado de un gen y sus productos. Normalmente, los expertos en la técnica utilizan una serie de parámetros para evaluar la condición o estado de un gen y sus productos. Éstos incluyen, pero no se limitan a la localización de los productos génicos expresados (incluyendo la localización de las células que expresan 84P2A9) así como el nivel y actividad biológica de los productos génicos expresados (como los mRNA, polinucleótidos y polipéptidos de 84P2A9). Las alteraciones del estado de 84P2A9 pueden evaluarse mediante una gran variedad de metodologías bien conocidas en la materia, normalmente las que se discuten aquí. Normalmente una alteración en el estado de 84P2A9 comprende un cambio en la localización de 84P2A9 y/o de las células que expresan 84P2A9, y/o un aumento en la expresión del mRNA y/o proteína de 84P2A9.

Tal y como se discute en detalle en la presente memoria, para poder identificar un estado o fenómeno asociado con la desregulación del crecimiento celular, se evalúa el estado de 84P2A9 en una muestra biológica mediante una serie de métodos utilizados por expertos en la materia, lo que incluye pero no se limita a un análisis genómico de Southern (para examinar, por ejemplo alteraciones en el gen 84P2A9), análisis de Northern y/o análisis mediante PCR del mRNA de 84P2A9 (para examinar, por ejemplo alteraciones en las secuencias de polinucleótidos o en los niveles de expresión de los mRNA de 84P2A9), y análisis de Western y/o inmunohistoquímico (para examinar, por ejemplo las alteraciones en las secuencias de polipéptido, alteraciones en la localización del polipéptido en una muestra, alteraciones en los niveles de expresión de las proteínas de 84P2A9 y/o asociaciones de proteínas de 84P2A9 con parejas de unión del polipéptido). Los polinucleótidos de 84P2A9 detectables incluyen, por ejemplo, un gen de 84P2A9 o fragmentos del mismo, mRNA de 84P2A9, variantes de corte y empalme alternativas del mRNA de 84P2A9 y moléculas de DNA o RNA recombinantes que contienen un polinucleótido de 84P2A9.

El perfil de expresión de 84P2A9 lo convierte en un marcador diagnóstico para enfermedad local y/o metastatizada.

En particular, el estado de 84P2A9 proporciona información útil para predecir la susceptibilidad a estadios particulares de la enfermedad, progresión y/o agresividad del tumor. La invención proporciona métodos y ensayos para determinar el estado de 84P2A9 y diagnosticar los cánceres que expresan 84P2A9, como los cánceres de próstata, vejiga, testículos, ovarios, mama, páncreas, colon y pulmón. El estado de 84P2A9 en muestras de pacientes puede analizarse mediante una serie de métodos bien conocidos en la materia, lo que incluye sin limitarse a ello, el análisis inmunohistoquímico, hibridación in situ, análisis de RT-PCR sobre muestras microdisseccionadas y capturadas con láser, análisis de Western blot en muestras clínicas y líneas celulares, y el análisis con chips de tejidos. Los protocolos normales para evaluar el estado del gen y los productos génicos de 84P2A9 pueden encontrarse en, por ejemplo Ausubul et al. Ed., 1995, *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidades 2 [Northern Blot], 4 [Southern Blot], 15 [Inmunoblot] y 18 [Análisis por PCR].

Tal y como se ha descrito anteriormente, el estado de 84P2A9 en una muestra biológica puede examinarse mediante una serie de procedimientos bien conocidos en la materia. Por ejemplo, el estado de 84P2A9 en una muestra biológica tomada de una localización específica en el cuerpo puede examinarse evaluando en la muestra la presencia o ausencia de células que expresen 84P2A9 (por ejemplo aquellas que expresan mRNA o proteínas de 84P2A9). Este análisis puede proporcionar evidencias de crecimiento celular desregulado, por ejemplo, cuando las células que expresan 84P2A9 se encuentran en una muestra biológica que no contiene normalmente dichas células (como un nódulo linfático). Tales alteraciones en el estado de 84P2A9 en una muestra biológica están a menudo asociadas con crecimiento celular desregulado. Específicamente, un indicador de crecimiento celular desregulado es la metástasis de células cancerígenas desde el órgano de origen (como los testículos o la glándula prostática) hasta un área diferente del cuerpo (como un nódulo linfático). En este contexto, la evidencia de crecimiento celular desregulado es importante por ejemplo debido a que la metástasis oculta en un nódulo linfático puede detectarse en una proporción sustancial de pacientes con cáncer de próstata, y tal metástasis está asociada con predictores de la progresión de la enfermedad conocidos (véase, por ejemplo, Murphy et al., *Prostate* 42 (4):315-317 (2000); Su et al., *Semin. Surg. Oncol.* 18 (1):17-28 (2000) y Freeman et al., *J Urol* Ago 1995; 154 (2 Pt 1):474-8).

En un aspecto, la invención proporciona métodos para monitorizar los productos génicos de 84P2A9 mediante la determinación del estado de los productos génicos de 84P2A9 expresados por las células en una muestra de prueba de tejidos procedente de un individuo del que se sospecha que padece una enfermedad asociada con un crecimiento celular desregulado (como hiperplasia o cáncer), y después comparando el estado así determinado con el estado en la correspondiente muestra normal de los productos génicos de 84P2A9; la presencia de productos génicos de 84P2A9 aberrantes en la muestra de prueba frente a la muestra normal proporciona una indicación de la presencia de crecimiento celular desregulado en las células del individuo.

En otro aspecto, la invención proporciona ensayos útiles para determinar la presencia de cáncer en un individuo, que comprenden la detección de un aumento significativo de la expresión de mRNA o proteínas de 84P2A9 en una muestra celular o de tejido comparado con los niveles de expresión en las correspondientes células o tejidos normales. La presencia de mRNA de 84P2A9 puede, por ejemplo, evaluarse en muestras de tejido, lo que incluye pero no se limita a próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovarios, mama, páncreas, colon, tejidos linfocíticos y de pulmón (véase, por ejemplo, Fig. 4-8). La presencia de expresión significativa de 84P2A9 en cualquiera de estos tejidos es útil para indicar la emergencia, presencia y/o gravedad de un cáncer, ya que los correspondientes tejidos normales no expresan los mRNA de 84P2A9 o los expresan en niveles bajos.

En una realización relacionada, el estado de 84P2A9 se determina a nivel de proteína en lugar de a nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, dicho método o ensayo comprende la determinación del nivel de proteína 84P2A9 expresada por las células en una muestra de tejido de prueba y la comparación del nivel así determinado con el nivel de 84P2A9 expresado en la correspondiente muestra normal. En una realización, se evalúa la presencia de proteína 84P2A9, por ejemplo, utilizando métodos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos o parejas de unión de 84P2A9 capaces de detectar la expresión de la proteína 84P2A9 se utilizan en una serie de formatos de ensayo bien conocidos en la materia para este propósito.

En otras realizaciones relacionadas, se puede evaluar el estado de las secuencias de nucleótido y de aminoácidos de 84P2A9 en una muestra biológica para identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas, como inserciones, deleciones, sustituciones y similares. Dichas realizaciones son útiles debido a que se observan alteraciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en un gran número de proteínas asociadas con el fenotipo de crecimiento desregulado (véase, por ejemplo, Marrogi et al., 1999, *J. Cutan. Pathol.* 26 (8):369-378). Por ejemplo, una mutación en la secuencia de 84P2A9 puede ser indicativa de la presencia o desarrollo de un tumor. Tales ensayos por lo tanto pueden tener un valor diagnóstico y predictivo si una mutación en 84P2A9 indica una pérdida potencial de función o aumento del crecimiento del tumor.

Son bien conocidos en la técnica una amplia variedad de ensayos para detectar alteraciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, el tamaño y estructura de las secuencias de ácidos nucleicos o de aminoácidos de los productos génicos de 84P2A9 se pueden analizar mediante los protocolos de Northern, Southern, Western, PCR y secuenciación de DNA discutidos aquí. Además, otros métodos para la observación de alteraciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos como el análisis de polimorfismos de conformación de cadena sencilla son bien conocidos en la materia (véase, por ejemplo, las patentes estadounidenses N° 5.382.510 y 5.952.170).

En otra realización, se puede examinar el estado de metilación del gen de 84P2A9 en una muestra biológica. La desmetilación y/o hipermetilación aberrante de las islas CpG en las regiones reguladoras 5' del gen, aparece frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas, y puede resultar en la expresión alterada de diferentes genes. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de la glutatión S-transferasa de clase pi (una proteína expresada en la próstata normal pero no expresada en >90% de los carcinomas de próstata) parece que silencia permanentemente la transcripción de este gen, y es la alteración genómica más frecuentemente detectada en los carcinomas de próstata (De Marzo et al., *Am. J. Pathol.* 155 (6):1985-1992 (1999)). Además, esta alteración está presente en al menos el 70% de los casos de neoplasia prostática intraepitelial (PIN) de alto grado (Brooks et al, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998 7:531-536). En otro ejemplo, la expresión del gen específico de tumores LAGE-I (que no está expresado en próstata normal pero sí está expresado en el 25-50% de los cánceres de próstata) se ve inducida por la desoxiazacitidina en células linfoblastoides, lo que sugiere que la expresión tumoral se debe a la desmetilación (Lethe et al., *Int. J. Cancer* 76 (6):903-908 (1998)). En este contexto, son bien conocidos en la materia una serie de ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, se puede utilizar, en aproximaciones de hibridación Southern, enzimas de restricción sensibles a la metilación que no pueden escindir secuencias que contienen sitios CpG metilados, para poder evaluar el estado de metilación general de las islas CpG. Además, con la MSP (PCR específica de metilación) se puede perfilar rápidamente el estado de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla CpG de un gen determinado. Este procedimiento implica la modificación inicial del DNA mediante bisulfito sódico (que convertirá todas las citosinas no metiladas en uracilo) seguido por la amplificación utilizando cebadores específicos para el DNA metilado frente a DNA no metilado. Los protocolos que implican interferencia de la metilación también pueden encontrarse por ejemplo en *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidad 12, Frederick M. Ausubel et al. Ed., 1995.

La amplificación génica proporciona un método adicional para evaluar el estado de 84P2A9, un locus que se encuentra en 1q32.3, una región que se ve perturbada en una serie de cánceres. La amplificación génica se mide en una muestra directamente, por ejemplo, mediante Southern blotting o Northern blotting convencional para cuantificar la transcripción de mRNA (Thomas, 1980, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205), dot blot (análisis de DNA), o hibridación in situ, utilizando una sonda marcada de forma apropiada, en función de las secuencias proporcionadas aquí. Alternativamente, los anticuerpos se utilizan para reconocer dúplex, como dúplex de DNA, dúplex de RNA y dúplex híbridos de DNA-RNA o dúplex de DNA-proteína. Los anticuerpos a su vez están marcados y el ensayo se lleva a cabo con el dúplex unido a una superficie, de forma que tras la formación del dúplex en la superficie puede detectarse la presencia de anticuerpo unido al dúplex.

Además de los tejidos que aquí se discuten, se puede analizar de forma conveniente la presencia de células cancerígenas en tejido biopsiado o sangre periférica, lo que incluye pero no se limita a cáncer de próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovarios, mama, páncreas, colon, cáncer linfocítico y de pulmón, utilizando por ejemplo, el análisis de Northern, dot blot o RT-PCR para detectar la expresión de 84P2A9 (véanse, por ejemplo, las Fig. 4-8). La presencia de mRNA de 84P2A9 amplificable por RT-PCR proporciona una indicación de la presencia de cáncer. Actualmente se está evaluando la utilización de los ensayos de detección por RT-PCR de tumores celulares en sangre periférica en el diagnóstico y manejo de una serie de tumores sólidos humanos. En el campo del cáncer de próstata, esto incluye ensayos de RT-PCR para la detección de células que expresan PSA y PSM (Verkaik et al., 1997, *Urol. Res.* 25:373-384; Ghossein et al., 1995, *J. Clin. Oncol.* 13:1195-2000; Heston et al., 1995, *Clin. Chem.* 41:1687-1688). Los ensayos de RT-PCR son bien conocidos en la materia.

Un aspecto relacionado de la invención está dirigido a la predicción de la susceptibilidad a desarrollar cáncer de un individuo. En una realización, un método para predecir la susceptibilidad al cáncer comprende la detección de mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 en una muestra de tejido y su presencia indica susceptibilidad al cáncer, y el grado de expresión del mRNA de 84P2A9 presente se correlaciona con el grado de susceptibilidad. En una realización específica, se examina la presencia de 84P2A9 en la próstata u otro tejido, y esta presencia de 84P2A9 en la muestra proporciona una indicación de susceptibilidad al cáncer de próstata (o la aparición o existencia de un tumor de próstata). En una realización muy relacionada, se puede evaluar la integridad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de 84P2A9 en una muestra biológica para poder identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas, como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, y la presencia de una o más alteraciones en los productos génicos de 84P2A9 en la muestra proporciona una indicación de susceptibilidad al cáncer (o la aparición o existencia de un tumor).

Otro aspecto relacionado de la invención está dirigido a los métodos para evaluar la agresividad del tumor. En una realización, un método para evaluar la agresividad de un tumor comprende determinar el nivel de mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 expresado por las células en una muestra del tumor, comparar el nivel así determinado con el nivel de mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 expresado en el correspondiente tejido normal tomado del mismo individuo o una muestra normal de tejido de referencia, y el grado de expresión del mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 en la muestra de tumor en comparación con la muestra normal indica el grado de agresividad. En una realización específica, la agresividad de un tumor se evalúa mediante la determinación de la extensión en la que 84P2A9 se expresa en las células tumorales, indicando los altos niveles de expresión tumores más agresivos. En una realización muy relacionada, se puede evaluar la integridad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de 84P2A9 en una muestra biológica para poder identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas, como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, y la presencia de una o más alteraciones indica tumores más agresivos.

Otro aspecto relacionado con la invención está dirigido a los métodos para observar la progresión de una neoplasia maligna en un individuo a lo largo del tiempo. En una realización, los métodos para observar la progresión de una neoplasia maligna en un individuo a lo largo del tiempo comprenden la determinación del nivel de mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 expresado por las células en una muestra de tumor, comparar el nivel así determinado con el nivel de mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 expresado en una muestra de tejido equivalente tomada del mismo individuo en otro momento, y el grado de expresión de mRNA de 84P2A9 o proteína 84P2A9 en la muestra de tumor a lo largo del tiempo proporciona información sobre la progresión del cáncer. En una realización específica, la progresión de un cáncer se evalúa determinando la extensión en la que la expresión de 84P2A9 en las células tumorales cambia a lo largo del tiempo, los niveles de expresión más altos indican una progresión del cáncer. También, se puede evaluar la integridad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de 84P2A9 en una muestra biológica para poder identificar alteraciones en la estructura de estas moléculas, como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, y la presencia de una o más alteraciones indican una progresión del cáncer.

Las aproximaciones diagnósticas anteriores pueden combinarse con cualquiera de una amplia variedad de protocolos de pronóstico y diagnóstico conocidos en la materia. Por ejemplo, otra realización de la invención descrita aquí está dirigida a los métodos para observar una coincidencia entre la expresión del gen de 84P2A9 y de los productos génicos de 84P2A9 (o alteraciones en el gen de 84P2A9 y en los productos génicos de 84P2A9) y un factor que está asociado con la neoplasia maligna como método de diagnóstico y pronóstico del estado de una muestra de tejido. En este contexto, pueden utilizarse una amplia variedad de factores asociados con la neoplasia maligna como la expresión de genes asociados con la neoplasia maligna (por ejemplo expresión de PSA, PSCA y PSM para el cáncer de próstata, etc.) así como observaciones citológicas grandes (véase, por ejemplo, Bocking et al., 1984, Anal. Quant. Cytol. 6 (2):74-88; Eptsein, 1995, Hum. Pathol. 26 (2):223-9; Thorson et al., 1998, Mod. Pathol. 11 (6):543-51; Baisden et al., 1999, Am. J. Surg. Pathol. 23 (8):918-24). Los métodos para observar una coincidencia entre la expresión génica de 84P2A9 y productos génicos de 84P2A9 (o alteraciones en el gen de 84P2A9 y en los productos génicos de 84P2A9) y un factor adicional que está asociado con las neoplasias malignas son útiles, por ejemplo, ya que la presencia de un conjunto de factores específicos que coinciden en la enfermedad proporciona información crucial para diagnosticar y pronosticar el estado de una muestra de tejido.

En una realización típica, los métodos para observar una coincidencia entre la expresión génica de 84P2A9 y los productos génicos de 84P2A9 (o alteraciones en el gen de 84P2A9 y productos génicos de 84P2A9) y un factor que está asociado con neoplasia maligna implica la detección de la sobreexpresión de mRNA o proteína 84P2A9 en una muestra de tejido, la detección de la sobreexpresión del mRNA de PSA o la proteína en una muestra de tejido, y la observación de una coincidencia en la sobreexpresión de mRNA de 84P2A9 o la proteína y el mRNA de PSA o la proteína. En una realización específica, se examina la expresión de los mRNA de 84P2A9 y de PSA en el tejido prostático. En una realización preferida, la coincidencia de la sobreexpresión de los mRNA de 84P2A9 y de PSA en la muestra proporciona una indicación de cáncer de próstata, susceptibilidad al cáncer de próstata o la aparición o estado de un tumor de próstata.

Los métodos para detectar y cuantificar la expresión de mRNA de 84P2A9 o la proteína se describen aquí y el uso de tecnologías estándar de detección y cuantificación de ácidos nucleicos y proteínas es bien conocido en la materia. Los métodos estándar para la detección y cuantificación de mRNA de 84P2A9 incluyen la hibridación in situ que utiliza ribosondas marcadas de 84P2A9, Northern blot y técnicas relacionadas que utilizan sondas de polinucleótido de 84P2A9, análisis RT-PCR que utiliza cebadores específicos de 84P2A9, y otros tipos de métodos de detección con amplificación, como, por ejemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA y similares. En una realización específica, se utiliza la RT-PCR semicuantitativa para detectar y cuantificar la expresión del mRNA de 84P2A9 como se describe en los posteriores Ejemplos. Puede utilizarse cualquier número de cebadores capaces de amplificar 84P2A9 para este propósito, lo que incluye pero no se limita a los diferentes grupos de cebadores específicamente descritos aquí. Métodos estándar para la detección y cuantificación de proteína se utilizan con este propósito. En una realización específica, pueden utilizarse anticuerpos policlonales o monoclonales reactivos específicamente con la proteína 84P2A9 de tipo salvaje en un ensayo inmunohistoquímico de tejido biopsiado.

Identificación de moléculas que interactúan con 84P2A9

Las secuencias de las proteínas 84P2A9 descritas aquí permiten al experto en la materia identificar proteínas, pequeñas moléculas y otros agentes que interactúan con 84P2A9 y las rutas activadas por 84P2A9 mediante cualquier protocolo de la variedad aceptados en la materia. Por ejemplo, se puede utilizar uno de entre la variedad de los denominados sistemas de trampa de interacciones (también denominado como "ensayo de doble híbrido"). En tales sistemas, las moléculas que interactúan reconstituyen un factor de transcripción que dirige la expresión de un gen marcador, después de lo cual, se analiza la expresión del gen marcador. Los sistemas típicos identifican las interacciones proteína-proteína in vivo a través de la reconstitución de un activador transcripcional eucariota y se describen por ejemplo en las patentes estadounidenses N° 5.955.280, 5.925.523, 5.846.722 y 6.004.746.

Alternativamente, se pueden identificar moléculas que interactúan con secuencias de proteína de 84P2A9 mediante el cribado de bibliotecas de péptidos. En tales métodos, los péptidos que se unen a las moléculas receptoras seleccionadas, como 84P2A9, se identifican mediante el cribado de bibliotecas que codifican una colección aleatoria o controlada de aminoácidos. Los péptidos codificados por las bibliotecas se expresan como proteínas de fusión de proteínas de la cubierta de bacteriófagos, y entonces se criban las partículas de bacteriófago frente a los receptores

de interés.

De acuerdo con esto, pueden identificarse péptidos que poseen una amplia variedad de usos, como reactivos terapéuticos o de diagnóstico, sin ninguna información previa sobre la estructura del ligando esperado o molécula receptora. Las bibliotecas peptídicas típicas y los métodos de cribado que pueden utilizarse para identificar las moléculas que interactúan con las secuencias de proteína de 84P2A9 se describen por ejemplo en las patentes estadounidenses N° 5.723,286 y 5.33.731.

Alternativamente, las líneas celulares que expresan 84P2A9 se utilizan para identificar interacciones proteína-proteína mediadas por 84P2A9. Tales interacciones pueden examinarse utilizando técnicas de inmunoprecipitación como se ha mostrado (Hamilton BJ, et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261:646-51). Normalmente la proteína 84P2A9 puede inmunoprecipitarse a partir de las líneas celulares de cáncer de próstata que expresan 84P2A9 utilizando anticuerpos anti-84P2A9. Alternativamente, pueden utilizarse los anticuerpos frente a una cola de His en una línea celular construida para expresar 84P2A9 (vectores mencionados anteriormente). En el complejo inmunoprecipitado se puede examinar la asociación de proteínas mediante procedimientos como el Western blot, marcaje de proteínas con ³⁵S-metionina, microsecuenciación de proteínas, tinción de plata y electroforesis en gel bidimensional.

Las moléculas pequeñas que interactúan con 84P2A9 pueden identificarse a través de realizaciones relacionadas con dichos ensayos de cribado. Por ejemplo, pueden identificarse moléculas pequeñas que interfieren con la función de la proteína, como moléculas que interfieren con la capacidad de 84P2A9 para mediar la fosforilación y defosforilación, señalización de segundo mensajero y tumorigénesis. Los métodos típicos se discuten por ejemplo en la patente estadounidense N° 5.928.868 e incluyen métodos para formar ligandos híbridos en los que al menos un ligando es una molécula pequeña. En una realización ilustrativa, el ligando híbrido se introduce en las células que a su vez contienen un primer y un segundo vector de expresión. Cada vector de expresión incluye DNA para expresar una proteína híbrida que codifica una proteína diana unida a una secuencia que codifica un módulo transcripcional. Las células contienen además un gen marcador, cuya expresión está condicionada por la proximidad entre la primera y segunda proteínas híbridas, un evento que sólo ocurre si el ligando híbrido se une a los sitios diana sobre ambas proteínas híbridas. Se seleccionan aquellas células que expresan el gen marcador y se identifica la molécula pequeña desconocida o la proteína híbrida.

Una realización típica de esta invención consiste en un método de cribado para moléculas que interactúan con una secuencia de aminoácidos de 84P2A9 mostrada en la Fig. 1 (Id. de Sec. N°: 2), que comprende los pasos de poner en contacto una población de moléculas con la secuencia de aminoácidos de 84P2A9, permitir la interacción entre la población de moléculas y la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 bajo condiciones que facilitan una interacción, determinar la presencia de una molécula que interactúa con la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 y después separar las moléculas que no interactúan con la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 de las moléculas que interactúan con la secuencia de aminoácidos de 84P2A9. En una realización específica, el método además incluye la purificación de una molécula que interactúa con la secuencia de aminoácidos de 84P2A9. En una realización preferida, la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 se pone en contacto con una biblioteca de péptidos.

Métodos y composiciones terapéuticas

La identificación de 84P2A9 como una proteína que está normalmente relacionada con la próstata y los testículos, y que también se expresa en cánceres de próstata (y otros tipos de cáncer), abre una serie de aproximaciones terapéuticas al tratamiento de tales cánceres. Tal y como se describe aquí, es posible que 84P2A9 funcione como un factor de transcripción involucrado en la activación de genes promotores de tumores o la represión de genes que bloquean la tumorigénesis.

El perfil de expresión de 84P2A9 recuerda al de los antígenos de cáncer de testículos (CT) o antígenos de MAGE, que son genes relacionados con los testículos que están regulados positivamente en melanomas y otros cánceres (Van den Eynde y Boon, Int J Clin Lab Res. 27:81-86, 1997). Debido a su expresión específica de tejido y los altos niveles de expresión en cáncer, los antígenos MAGE están siendo investigados actualmente como dianas para las vacunas contra el cáncer (Durrant, Anticancer Drugs 8:727-733, 1997; Reynolds et al., Int J Cancer 72:972-976, 1997). El patrón de expresión de 84P2A9 proporciona evidencias de que es asimismo una diana ideal para una aproximación de vacuna contra el cáncer de próstata. Sus características estructurales indican que puede ser un factor de transcripción, y proporciona evidencias de que 84P2A9 es una diana de molécula pequeña.

De acuerdo con esto, se espera que las aproximaciones terapéuticas con el objetivo de inhibir la actividad de la proteína 84P2A9 sean útiles para los pacientes que padecen de cáncer de próstata, cáncer testicular y otros cánceres que expresan 84P2A9. Estas aproximaciones terapéuticas generalmente pertenecen a dos clases. Una clase comprende varios métodos para inhibir la unión o asociación de la proteína 84P2A9 con su pareja de unión o con otras proteínas. Otra clase comprende una serie de métodos para inhibir la transcripción del gen de 84P2A9 o traducción del mRNA de 84P2A9.

84P2A9 como Diana en una Terapia Basada en Anticuerpos

Las características estructurales de 84P2A9 indican que esta molécula es una diana atractiva para una estrategia terapéutica basada en anticuerpos. Son conocidas en la materia una serie de estrategias basadas en anticuerpos para localizar moléculas intracelulares y extracelulares (véase, por ejemplo, muerte mediada por CCDA y por el complemento así como el uso de intracuerpos discutidos aquí). Ya que células cancerígenas de varios linajes expresan 84P2A9 y las correspondientes células normales no, la administración sistémica de composiciones inmunorreactivas de 84P2A9 se esperaría que presentara una excelente sensibilidad sin efectos tóxicos, inespecíficos y/o no relacionados con la diana mediante la unión de la molécula inmunoterapéutica a órganos y tejidos no relacionados con la diana. Los anticuerpos específicamente reactivos con los dominios de 84P2A9 pueden ser útiles para tratar sistémicamente cánceres que expresan 84P2A9, conjugados con una toxina o con un agente terapéutico, o como anticuerpos desnudos capaces de inhibir la proliferación o función celular.

Los anticuerpos contra 84P2A9 pueden introducirse en un paciente en el que el anticuerpo se une a 84P2A9 y modula o altera una función, como puede ser la interacción con una pareja de unión y consecuentemente media la inhibición del crecimiento y/o la destrucción de las células tumorales, y/o inhibe el crecimiento de las células tumorales. Los mecanismos mediante los cuales los anticuerpos ejercen su efecto terapéutico pueden incluir la lisis celular mediada por el complemento, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, la modulación de la función fisiológica de 84P2A9, la inhibición de la unión del ligando o de rutas de transducción de señales, la modulación de la diferenciación de las células tumorales, la alteración de los perfiles de factores angiogénicos tumorales, y/o mediante la inducción de la apoptosis.

Los expertos en la materia entienden que los anticuerpos pueden utilizarse específicamente para la localización y unión de moléculas inmunogénicas como puede ser una región inmunogénica de la secuencia 84P2A9 que se muestra en la Figura 1. Además, los expertos en la materia entienden como rutinaria la conjugación de anticuerpos con agentes citotóxicos. En este contexto, los expertos en la materia entienden que cuando se liberan los agentes citotóxicos y/o terapéuticos directamente en las células mediante su conjugación con anticuerpos específicos para una molécula expresada por esta célula (por ejemplo 84P2A9), es razonable esperar que el agente citotóxico ejerza su efecto biológico conocido (por ejemplo citotoxicidad) sobre aquellas células.

Son conocidas en la materia una amplia variedad de composiciones y métodos para utilizar los anticuerpos conjugados con agentes citotóxicos para eliminar células. En el contexto de los cánceres, los métodos típicos comprenden la administración a un animal que tiene un tumor, una cantidad biológicamente efectiva de un conjugado que comprende un agente citotóxico y/o terapéutico seleccionado unido a un agente localizador (por ejemplo un anticuerpo anti-84P2A9) que se une al marcador expresado (por ejemplo 84P2A9) que está accesible para unirse o se localiza en la superficie celular. Una realización típica consiste en un método de suministro de un agente citotóxico y/o terapéutico en una célula que expresa 84P2A9, que comprende la conjugación del agente citotóxico con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente a un epítipo de 84P2A9 y que expone la célula al conjugado de anticuerpo-agente. Otra realización ilustrativa específica consiste en un método para tratar un individuo que se sospecha que padece un cáncer metastatizado, que comprende el paso de administrar por vía parenteral a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico y/o terapéutico.

La inmunoterapia del cáncer que utiliza anticuerpos anti-84P2A9 puede utilizar las enseñanzas generadas por varias aproximaciones que se han empleado con éxito en el tratamiento de otros tipos de cáncer, lo que incluye pero no se limita al cáncer de colon (Arlen et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138), mieloma múltiple (Ozaki et al., 1997, Blood 90:3179-3186; Tsunenari et al., 1997, Blood 90:2437-2444), cáncer gástrico (Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), linfoma de células B (Funakoshi et al., 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), leucemia (Zhong et al., 1996, Leuk. Res. 20:581-589), cáncer colorrectal (Moun et al., 1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders et al., 1995, Cancer Res. 55:4398-4403) y cáncer de mama (Shepard et al., 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127). Algunas aproximaciones terapéuticas implican la conjugación de anticuerpos desnudos con una toxina, como puede ser la conjugación de ¹³¹I con anticuerpos anti-CD20 (por ejemplo, Rituxan™, IDEC Pharmaceuticals Corp.), mientras que otros implican la coadministración de anticuerpos y otros agentes terapéuticos, como Herceptin™ (trastuzumab) con paclitaxel (Genentech, Inc.). Para el tratamiento del cáncer de próstata, por ejemplo, los anticuerpos anti-84P2A9 pueden administrarse junto con radiación, quimioterapia o ablación hormonal.

Aunque la terapia con el anticuerpo 84P2A9 es útil para todos los estadios del cáncer, la terapia con anticuerpos es particularmente apropiada en cánceres avanzados o metastáticos. El tratamiento con la terapia de anticuerpos de la invención está indicado para pacientes que han recibido una o más rondas de quimioterapia, siendo preferible la combinación de la terapia de anticuerpos de la invención con un régimen quimioterapéutico o de radiación para pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico. Adicionalmente, la terapia con anticuerpos puede permitir el uso concomitante de dosis reducidas de quimioterapia, particularmente en pacientes que no toleran muy bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

Es deseable para algunos pacientes con cáncer evaluar la presencia y el nivel de expresión de 84P2A9, preferiblemente utilizando valoraciones inmunohistoquímicas en el tejido tumoral, análisis cuantitativo de 84P2A9 por imagen u otras técnicas capaces de indicar de forma fiable la presencia y grado de expresión de 84P2A9. El análisis inmu-

nohistoquímico de biopsias tumorales o especímenes quirúrgicos es preferible para este propósito. Los métodos para el análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales son bien conocidos en la materia.

Los anticuerpos monoclonales anti-84P2A9 útiles en el tratamiento del cáncer de próstata y otros tipos de cáncer incluyen aquellos que son capaces de iniciar una respuesta inmune potente frente al tumor o aquellos que son directamente citotóxicos. Respecto a esto, los anticuerpos monoclonales (mAb) anti-84P2A9 pueden provocar la lisis de la célula tumoral por medio de los mecanismos de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o mediada por el complemento, requiriendo ambas una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para la interacción con los sitios del receptor Fc de la célula efectora o proteínas del complemento. Además, los mAb anti-84P2A9 que ejercen un efecto biológico directo sobre el crecimiento tumoral son útiles en la práctica de la invención. Los mecanismos potenciales mediante los que tales mAb directamente citotóxicos pueden actuar incluyen la inhibición del crecimiento celular, modulación de la diferenciación celular, la modulación de los perfiles de factores angiogénicos tumorales, y de la inducción de la apoptosis. El mecanismo mediante el que un mAb anti-84P2A9 particular ejerce un efecto antitumoral se evalúa utilizando cualquier número de ensayos in vitro diseñados para determinar la muerte celular, como puede ser la CCDA, CMMDA, lisis celular mediada por el complemento, y similares, como es conocido generalmente en la materia.

El uso de anticuerpos murinos u otros anticuerpos monoclonales no humanos, o mAb quiméricos humano/ ratón, puede inducir respuestas inmunes de moderadas a fuertes en algunos pacientes. En algunos casos, esto puede resultar en la eliminación del anticuerpo en circulación y una reducción de la eficacia. En los casos más graves, tal respuesta inmune puede llevar a la formación extensiva de inmunocomplejos que, potencialmente, pueden provocar un fallo renal. De acuerdo con lo dispuesto, los anticuerpos monoclonales preferidos utilizados en la práctica de los métodos terapéuticos de la invención son aquellos que son totalmente humanos o humanizados y que se unen específicamente al antígeno diana 84P2A9 con alta afinidad pero presentan antigenicidad muy baja o no la presentan en absoluto en el paciente.

Los métodos terapéuticos de la invención contemplan la administración de mAb anti-84P2A9 únicos así como combinaciones o cócteles de diferentes mAb. Dichos cócteles de mAb pueden presentar ciertas ventajas ya que contienen mAb que reconocen diferentes epítopos, explotan diferentes mecanismos efectores o combinan directamente mAb citotóxicos con mAb que dependen de la funcionalidad efectora inmune. Tales mAb en combinación pueden presentar efectos terapéuticos sinérgicos. Además, la administración de mAb anti-84P2A9 puede combinarse con otros agentes terapéuticos, lo que incluye pero no se limita a varios agentes quimioterapéuticos, bloqueadores de andrógenos e inmunomoduladores (por ejemplo, IL-2, GM-CSF). Los mAb anti-84P2A9 se administran en su forma "desnuda" o no conjugada, o pueden tener agentes terapéuticos conjugados con ellos.

Las formulaciones de anticuerpo anti-84P2A9 se administran por cualquier ruta capaz de liberar los anticuerpos en el lugar del tumor. Las rutas de administración potencialmente efectivas incluyen pero no se limitan a la vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica y similares. El tratamiento involucrará generalmente la administración repetida de la preparación de anticuerpo anti-84P2A9 mediante una ruta aceptable de administración como puede ser la inyección intravenosa (IV), normalmente a una dosis en el rango de alrededor de 0,1 a alrededor de 10 mg/kg de peso corporal. Las dosis en el rango de 10-500 mg de mAb por semana son efectivas y bien toleradas.

Basado en la experiencia clínica con el mAb Herceptin en el tratamiento de cáncer de mama metastásico, una dosis de carga inicial de aproximadamente de 4 mg/kg de peso corporal de paciente IV seguido por dosis semanales de alrededor de 2 mg/kg IV de la preparación de mAb anti-84P2A9, representa un régimen de dosis aceptable. Preferiblemente, la carga de dosis inicial se administra como una infusión de 90 minutos o más. La dosis de mantenimiento periódica se administra como una infusión de 30 minutos o más, siempre que la dosis inicial sea bien tolerada. No obstante, tal como entenderá un experto en la materia, varios factores pueden influir en el régimen de dosis ideal en un caso particular. Tales factores pueden incluir, por ejemplo, la afinidad de unión y la vida media del Ab o mAb utilizado, el grado de expresión de 84P2A9 en el paciente, la extensión de la propagación de antígeno 84P2A9 circulante, el nivel de concentración de anticuerpo permanente deseado, la frecuencia del tratamiento y la influencia de los agentes quimioterapéuticos utilizados en combinación con el método de tratamiento de la invención, así como el estado de salud de un paciente en particular.

Opcionalmente, se evaluarán los niveles de 84P2A9 de los pacientes en una muestra determinada (por ejemplo los niveles de antígeno 84P2A9 circulante y/o de células que expresan 84P2A9) para ayudar a determinar el régimen de dosis más efectivo y los factores relacionados. Tales evaluaciones también se utilizan con propósitos de monitorización a lo largo de la terapia, y son útiles para evaluar el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros parámetros (como los niveles de PSA en suero en la terapia de cáncer de próstata).

Inhibición de la Función de la Proteína 84P2A9

Dentro de la primera clase de aproximaciones terapéuticas, la invención incluye varios métodos y composiciones para inhibir la unión de 84P2A9 a su pareja de unión o su asociación con otra(s) proteína(s) así como los métodos para inhibir la función de 84P2A9.

Inhibición de 84P2A9 con anticuerpos intracelulares

En una aproximación, se introducen los vectores recombinantes que codifican anticuerpos de cadena única que se unen específicamente a 84P2A9 en células que expresan 84P2A9 mediante tecnologías de transferencia de genes, en la que el anticuerpo anti-84P2A9 de cadena sencilla codificado se expresa intracelularmente, se une a la proteína 84P2A9, y por lo tanto inhibe su función. Son bien conocidos los métodos para diseñar tales anticuerpos intracelulares de cadena sencilla. Tales anticuerpos intracelulares, también conocidos como "intracuerpos", están específicamente dirigidos a un compartimiento particular dentro de la célula, proporcionando control sobre la actividad inhibidora del tratamiento al que está dirigido. Esta tecnología se ha aplicado con éxito en la técnica (para su revisión, véase Richardson y Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13). Los intracuerpos han demostrado que eliminan virtualmente la expresión de receptores celulares de superficie que normalmente son abundantes. Véase, por ejemplo, Richardson et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli et al., 1994, J. Biol. Chem. 269: 23931-23936; Deshane et al., 1994, Gene Ther. 1: 332-337.

Los anticuerpos de cadena sencilla comprenden los dominios variables de la cadena pesada y ligera unidas mediante un polipéptido enlazante flexible, y están expresados como un solo polipéptido. Opcionalmente, los anticuerpos de cadena sencilla están expresados como un fragmento de la región variable de la cadena sencilla unido a la región constante de la cadena ligera. Se han diseñado señales de tráfico intracelulares bien conocidas en vectores polinucleotídicos recombinantes que codifican tales anticuerpos de cadena sencilla para dirigir de forma precisa el intracuerpo expresado al compartimiento intracelular deseado. Por ejemplo, los intracuerpos dirigidos al retículo endoplasmático (RE) se diseñan para que incorporen un péptido líder, y opcionalmente, una señal en C-terminal de retención en el RE, como el motivo de aminoácidos KDEL. Los intracuerpos que se pretende que ejerzan una actividad en el núcleo se diseñan para que incluyan una señal de localización nuclear. Los restos lipídicos se unen a los intracuerpos para poder atar el intracuerpo al lado citosólico de la membrana plasmática. Los intracuerpos pueden también dirigirse para que ejerzan una función en el citosol. Por ejemplo, los intracuerpos citosólicos se utilizan para secuestrar factores que están en el citosol, evitando por lo tanto que éstos sean transportados a su destino celular natural.

En una realización, se utilizan los intracuerpos para capturar la 84P2A9 en el núcleo, evitando así su actividad en el núcleo. Las señales de localización nuclear se diseñan en tales intracuerpos anti-84P2A9 para poder alcanzar el objetivo deseado. Dichos intracuerpos anti-84P2A9 están diseñados para unirse específicamente a un dominio particular de la 84P2A9. En otra realización, los intracuerpos citosólicos que se unen específicamente a la proteína 84P2A9 se utilizan para evitar el acceso al núcleo por parte de 84P2A9, de esta forma se evita que ejerza cualquier actividad biológica en el núcleo (por ejemplo, evitando que la 84P2A9 forme complejos de transcripción con otros factores).

Para poder dirigir específicamente la expresión de tales intracuerpos en células particulares, la transcripción del intracuerpo se sitúa bajo el control regulador de un promotor y/o potenciador apropiado específico de tumor. Para poder dirigir la expresión del intracuerpo específicamente en la próstata, por ejemplo, se puede utilizar el promotor y/o promotor/ potenciador de PSA (véase, por ejemplo, patente estadounidense N° 5.919.652).

Inhibición de 84P2A9 con proteínas recombinantes

En otra aproximación, se utilizan moléculas recombinantes que se unen a 84P2A9 que evitan o inhiben el acceso o unión de 84P2A9 a su(s) pareja(s) de unión o su asociación con otra(s) proteína(s). Tales moléculas recombinantes pueden, por ejemplo, contener la(s) parte(s) reactiva(s) de un anticuerpo específico anti-84P2A9. En una realización particular, el dominio de unión de 84P2A9 de una pareja de unión de 84P2A9 está diseñado dentro de una proteína de fusión dimérica que comprende dos dominios de unión a ligando de 84P2A9 unidos a la porción Fc de una IgG humana, como puede ser la IgG1 humana. Dicha porción de IgG puede contener, por ejemplo, los dominios C_H2 y C_H3 y la región bisagra, pero no el dominio C_H1. Dichas proteínas de fusión diméricas se administran en su forma soluble a pacientes que padecen de un cáncer asociado con la expresión de 84P2A9, lo que incluye pero no se limita a cánceres de próstata y de testículos, en los que la proteína de fusión dimérica se une específicamente a 84P2A9 que bloquea de esta manera la interacción de 84P2A9 con una pareja de unión. Dichas proteínas de fusión diméricas se pueden combinar también dentro de proteínas multiméricas utilizando tecnologías de unión a anticuerpos.

Inhibición de la transcripción o traducción de 84P2A9

Dentro de la segunda clase de aproximaciones terapéuticas, la invención proporciona varios métodos y composiciones para inhibir la transcripción del gen 84P2A9. De forma similar, la invención también proporciona métodos y composiciones para inhibir la traducción del mRNA de 84P2A9 en proteínas.

En una aproximación, un método para inhibir la transcripción del gen de 84P2A9 comprende poner en contacto el gen de 84P2A9 con un polinucleótido de 84P2A9 antisentido. En otra aproximación, un método para inhibir la traducción del mRNA de 84P2A9 comprende poner en contacto el mRNA de 84P2A9 con un polinucleótido antisentido. En otra aproximación, un ribozima específico de 84P2A9 se utiliza para escindir el mensajero de 84P2A9, inhibiendo de esta forma la traducción. Tales métodos basados en polinucleótidos antisentido y ribozimas pueden también

dirigirse a las regiones reguladoras del gen 84P2A9, como pueden ser los elementos de promotor y/o potenciador de 84P2A9. De forma similar, pueden utilizarse proteínas capaces de inhibir un gen del factor de transcripción de 84P2A9 para inhibir la transcripción del mRNA de 84P2A9. Los diferentes polinucleótidos y composiciones útiles en los métodos mencionados previamente, se han descrito anteriormente en el texto. El uso de moléculas antisentido y ribozimas para inhibir la transcripción y traducción es bien conocido en la materia.

Otros factores que inhiben la transcripción de 84P2A9 a través de la interferencia de la activación transcripcional de 84P2A9 son también útiles para el tratamiento de cánceres que expresan 84P2A9. De forma similar, los factores que son capaces de interferir en el procesado de 84P2A9 son útiles para el tratamiento de cánceres que expresan 84P2A9. Los métodos para el tratamiento del cáncer que utilizan dichos factores están también dentro del alcance de la invención.

Consideraciones generales de las estrategias terapéuticas

Las tecnologías de transferencia génica y terapia génica pueden utilizarse para la liberación de moléculas polinucleótidas terapéuticas (es decir, moléculas antisentido, ribozimas, polinucleótidos que codifican intracuerpos y otras moléculas inhibidoras de 84P2A9) en células tumorales que sintetizan 84P2A9. Son conocidas en la materia una serie de aproximaciones de terapia génica. Los vectores recombinantes que codifican polinucleótidos antisentido de 84P2A9, ribozimas, factores capaces de interferir con la transcripción de 84P2A9 y similares, pueden liberarse sobre células tumorales diana utilizando dichas aproximaciones de terapia génica.

Las aproximaciones terapéuticas anteriores pueden combinarse con cualquiera de una amplia variedad de regímenes quirúrgicos, quimioterápicos o de terapia con radiación. Estas aproximaciones terapéuticas pueden permitir el uso de dosis reducidas de quimioterapia y/o disminuir la frecuencia de administración, lo cual es una ventaja para todos los pacientes y particularmente para aquellos que no toleran bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

La actividad antitumoral de una composición particular (por ejemplo antisentido, ribozima, intracuerpo), o una combinación de tales composiciones, puede evaluarse utilizando varios sistemas de ensayo *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* para evaluar el potencial terapéutico incluyen los ensayos de crecimiento celular, ensayos de agar blando y otros ensayos indicativos de actividad promotora tumoral, y ensayos de unión capaces de determinar la extensión en la que una composición terapéutica puede inhibir la unión de 84P2A9 a una pareja de unión, etc.

El efecto de una composición terapéutica de 84P2A9 puede evaluarse en un modelo animal adecuado *in vivo*. Por ejemplo, son apropiados en relación con el cáncer de próstata, los modelos de cáncer xenogénico de próstata en los que se introducen explantes de cáncer de próstata humano o tejidos xenoinjertados transferidos en animales inmunocomprometidos, tales como ratones desnudos o SCID, y se han descrito en Klein et al., 1997, Nature Medicine 3:402-408. Por ejemplo, la solicitud de patente PCT WO98/16628, Sawyers et al., publicada el 23 de Abril de 1998, describe varios modelos de xenoinjertos de cáncer de próstata humano capaces de reiniciar el desarrollo de tumores primarios, de micrometástasis y formación de metástasis osteoblástica característica de la enfermedad en su estadio tardío. La eficacia puede predecirse utilizando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, regresión tumoral o metástasis, y similares. Véanse, también, los Ejemplos a continuación.

Los ensayos *in vivo* que evalúan la promoción de la apoptosis son útiles en la evaluación de composiciones terapéuticas. En una realización, los xenoinjertos de ratones portadores de tumores tratados con la composición terapéutica pueden examinarse para ver si presentan focos apoptóticos y compararlos con ratones portadores de xenoinjertos control sin tratar. La extensión en la que se encuentran los focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

Las composiciones terapéuticas utilizadas en la práctica de los métodos anteriores pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un transportador adecuado para el sistema de liberación deseado. Los transportadores adecuados incluyen cualquier material que cuando se combina con la composición terapéutica retiene la función antitumoral de la composición terapéutica y son generalmente no reactivos con el sistema inmunitario del paciente. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquier número de transportadores farmacéuticos estándar como las soluciones salinas estériles tamponadas de fosfato, agua bacteriostática y similares (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, A. Osal., Ed., 1980).

Las formulaciones terapéuticas pueden solubilizarse y administrarse por cualquier vía capaz de liberar la composición terapéutica al lugar del tumor. Las rutas potencialmente efectivas de administración incluyen, pero no se limitan a la vía intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraórgano, ortotópica y similares. Una formulación preferida para la inyección intravenosa comprende la composición terapéutica en una solución de agua bacteriostática preservada, agua estéril no preservada, y/o diluida en cloruro de polivinilo o bolsas de polietileno que contienen cloruro sódico estéril al 0,9% para inyección, USP. Las preparaciones de proteína terapéuticas pueden liofilizarse y almacenarse como polvos estériles, preferiblemente al vacío, y después reconstituirse en agua bacteriostática que contiene, por ejemplo, un conservante como el alcohol bencílico, o en agua estéril antes de la inyección.

Las dosis y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres que se utilizan con los métodos anteriores variarán con el método y el cáncer diana, y dependerá generalmente de un número de factores diferentes apreciados en la materia.

5 Vacunas contra el cáncer

Como se ha dicho antes, el perfil de expresión de 84P2A9 muestra que está altamente expresado en cáncer de próstata avanzado y metastatizado. Este patrón de expresión recuerda al de los antígenos de cáncer de testículos (CT) o antígenos MAGE, que son genes específicos de testículos que están regulados positivamente en melanomas y otros cánceres (Van den Eynde y Boon, Int J Clin Lab Res. 27:81-86, 1997). Debido a su expresión específica de tejido y a los altos niveles de expresión en cáncer, los antígenos MAGE están siendo investigados actualmente como dianas para vacunas contra el cáncer (Durrant, Anticancer Drugs 8:727-733, 1997; Reynolds et al., Int J Cancer 72:972-976, 1997).

La invención además proporciona vacunas contra el cáncer que comprenden una proteína relacionada con 84P2A9 o fragmento de la misma, así como vacunas basadas en DNA. En vista de la expresión de 84P2A9, las vacunas contra el cáncer son efectivas en la prevención específica y/o tratamiento de cánceres que expresan 84P2A9, sin provocar efectos inespecíficos sobre los tejidos no diana. El uso de un antígeno tumoral en una vacuna para generar inmunidad humoral y mediada por células para su utilización en la terapia contra el cáncer es bien conocido en la materia y se ha empleado en el cáncer de próstata con los inmunógenos PSMA de humanos y PAP de roedor (Hodges et al., 1995, Int. J. Cancer 63:231-237; Fong et al., 1997, J. Immunol. 159:3113-3117).

Tales métodos pueden ponerse en práctica fácilmente utilizando una proteína 84P2A9, o fragmento de la misma, o una molécula de ácido nucleico que codifica para 84P2A9 y vectores recombinantes capaces de expresar y presentar apropiadamente el inmunógeno 84P2A9 (que normalmente comprende un número de epítopos inmunorreactivos de células humorales o de células T). En este contexto, los expertos en la materia entenderán que son conocidas en la materia una amplia variedad de sistemas de vacunas diferentes para la liberación de epítopos inmunorreactivos (véase, por ejemplo, Heryln et al., Ann Med 1999 Feb; 31 (1):G6-78; Maruyama et al., Cancer Immunol Immunother 2000 Jun; 49 (3):123-32) En resumen, tales técnicas consisten en métodos para generar en un mamífero una respuesta inmune (por ejemplo una respuesta humoral y/o mediada por células), que comprende los pasos de exponer el sistema inmune del mamífero a un epítipo inmunorreactivo (por ejemplo un epítipo de la proteína 84P2A9 que se muestra en el Id. de Sec. N°: 2) de forma que el mamífero genere una respuesta inmune que es específica para ese epítipo (por ejemplo genera los anticuerpos que reconocen de forma específica ese epítipo). En un método preferido, el inmunógeno de 84P2A9 contiene un motivo biológico. En una realización altamente preferida, el inmunógeno de 84P2A9 contiene una o más secuencias de aminoácidos identificadas, mediante una de las técnicas analíticas pertinentes bien conocidas en la materia, como las secuencias que se muestran en la Tabla 1.

Son bien conocidos en la materia una amplia variedad de métodos para generar una respuesta inmune en un mamífero (por ejemplo el primer paso en la generación de hibridomas). Los métodos para generar una respuesta inmune en un mamífero comprenden exponer el sistema inmunitario del mamífero a un epítipo inmunogénico exógeno en una proteína (por ejemplo la proteína 84P2A9 del Id. de Sec. N°: 2) por lo que se genera la respuesta inmune. Una realización típica consiste en un método para generar una respuesta inmune frente a 84P2A9 en un huésped, poniendo en contacto el huésped con una cantidad suficiente de 84P2A9 o un epítipo o análogo de la misma, lo que estimula las células B o células T citotóxicas; y al menos un intervalo periódico de tiempo después se pone en contacto el huésped con 84P2A9 adicional o un epítipo o análogo de la misma, lo que estimula las células B o células T citotóxicas. Una realización específica consiste en un método para generar una respuesta inmune frente a una proteína 84P2A9 o a un péptido multiepitópico, lo que comprende la administración de un inmunógeno de 84P2A9 (por ejemplo la proteína 84P2A9 o un fragmento peptídico de la misma, una proteína de fusión de 84P2A9, etc.) en una preparación de vacuna a humanos o animales. Normalmente, tales preparaciones de vacuna contienen además un adyuvante adecuado (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N° 6.146.635). Una variación representativa de estos métodos consiste en un método para generar una respuesta inmune en un individuo frente a un inmunógeno de 84P2A9, lo que comprende administrar *in vivo* un facilitador de vacuna genética en el músculo o piel del individuo como el que se selecciona de entre el grupo que consiste en: lípidos aniónicos, saponinas, lectinas, compuestos estrogénicos, alquilos inferiores hidroxilados, dimetilsulfóxido y urea, y una molécula de DNA que se ha disociado de un agente infeccioso y comprende una secuencia de DNA que codifica el inmunógeno de 84P2A9, cuya secuencia de DNA se encuentra unida de forma operativa a las secuencias reguladoras que controlan la expresión de la secuencia de DNA; y la molécula de DNA es incorporada por las células, se expresa la secuencia de DNA en las células y se genera una respuesta inmune frente al inmunógeno (véase, por ejemplo, la patente estadounidense N° 5.962.428).

En un ejemplo ilustrativo de un método específico para generar una respuesta inmunitaria, se utilizan sistemas de liberación de genes con virus para liberar una molécula de ácido nucleico que codifica para 84P2A9. Se pueden utilizar varios sistemas de liberación de genes con virus en la práctica de este aspecto de la invención, lo que incluye pero no se limita al virus de la vacuna, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus de la gripe, virus de la polio, virus adenoasociado, lentivirus y virus sindbus (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8:658-

663). También pueden utilizarse sistemas de liberación no víricos utilizando DNA desnudo que codifica una proteína 84P2A9 o fragmento de la misma introducida en el paciente (por ejemplo, por vía intramuscular o por vía intradérmica) para inducir una respuesta antitumoral. En una realización, se utiliza el cDNA humano de 84P2A9 de longitud completa. En otra realización, se pueden utilizar las moléculas de ácido nucleico de 84P2A9 que codifican epítomos específicos de linfocitos T citotóxicos (LTC). Los epítomos de LTC pueden determinarse utilizando algoritmos específicos (por ejemplo, Epimer, Brown University) para identificar péptidos dentro de una proteína de 84P2A9 que son capaces de unirse de forma óptima a alelos específicos de HLA.

También se pueden emplear varias estrategias *ex vivo*. Una aproximación involucra el uso de células dendríticas para presentar el antígeno de 84P2A9 al sistema inmunitario de un paciente. Las células dendríticas expresan moléculas MHC de clase I y II, co-estimulador B7, e IL-12, y son por lo tanto células altamente especializadas en la presentación de antígenos. En un ensayo clínico de fase I de cáncer de próstata, se están utilizando células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) para estimular los sistemas inmunitarios de los pacientes con cáncer de próstata (Tjoa et al., 1996, Prostate 28:65-69; Murphy et al., 1996, Prostate 29:371-380). Por lo tanto, las células dendríticas pueden utilizarse para presentar péptidos de 84P2A9 a las células T en el contexto de moléculas MHC de clase I y II. En una realización, se pulsan células dendríticas autólogas con péptidos 84P2A9 capaces de unirse a las moléculas MHC de clase I y/o II. En otra realización, las células dendríticas se pulsan con la proteína 84P2A9 completa. Otra realización implica construir células dendríticas que sobreexpresan el gen de 84P2A9 utilizando varios vectores mejorados que son conocidos en la materia, como los adenovirus (Arthur et al., 1997, Cancer Gene Ther. 4:17-25), retrovirus (Henderson et al., 1996, Cancer Res. 56:3763-3770), lentivirus, virus adenoasociado, transfección de DNA (Ribas et al., 1997, Cancer Res. 57:2865-2869), o transfección de RNA derivado de tumor (Ashley et al., 1997, J. Exp. Med. 186:1177-1182). Las células que expresan 84P2A9 pueden también diseñarse para expresar inmunomoduladores, como el GM-CSF, y utilizarse como agentes inmunizantes.

Los anticuerpos antiidiotípicos anti-84P2A9 pueden también utilizarse en la terapia contra el cáncer como vacuna para inducir una respuesta inmune hacia las células que expresan una proteína de 84P2A9. Específicamente, la generación de anticuerpos antiidiotípicos es bien conocida en la materia y puede adaptarse fácilmente para generar anticuerpos antiidiotípicos anti-84P2A9 que mimetizan un epítipo sobre una proteína de 84P2A9 (véase, por ejemplo, Wagner et al., 1997, Hybridoma 16:33-40; Foon et al., 1995, J. Clin. Invest. 96:334-342; Herlyn et al., 1996, Cancer Immunol. Immunother. 43:65-76). Dicho anticuerpo antiidiotípico puede utilizarse en estrategias de vacuna contra el cáncer.

Pueden utilizarse métodos de inmunización genética para generar respuestas inmunitarias celulares o humores profilácticas o terapéuticas dirigidas contra células cancerígenas que expresan 84P2A9. Las construcciones que comprenden DNA que codifica un inmunógeno/ proteína relacionada con 84P2A9 y secuencias reguladoras apropiadas pueden inyectarse directamente en el músculo o piel de un individuo, de forma que las células del músculo o piel captan a la construcción y expresan el inmunógeno/ proteína de 84P2A9 codificado. Alternativamente, una vacuna comprende una proteína relacionada con 84P2A9. La expresión de la proteína inmunógeno de 84P2A9 resulta en la generación de inmunidad celular o humoral profiláctica o terapéutica contra el cáncer de hueso, colon, páncreas, testículos, cérvix y de ovarios. Pueden utilizarse varias técnicas conocidas en la materia para la inmunización genética profiláctica o terapéutica (como revisión, véase la información y referencias publicadas en la dirección de Internet www.genweb.com).

Equipos

Se proporcionan también equipos para utilizar en las aplicaciones diagnósticas y terapéuticas descritas hasta aquí por la invención. Dichos equipos pueden comprender un transportador compartimentalizado para introducir uno o más contenedores, como viales, tubos, y similares, con gran proximidad y cada uno de los contenedores comprende uno de los elementos por separado que se van a utilizar en el método. Por ejemplo, los contenedores pueden comprender una sonda que está o puede estar marcada para ser detectada. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína relacionada con 84P2A9, o un gen de 84P2A9 o mensajero, respectivamente. Cuando el equipo utiliza la hibridación de ácidos nucleicos para detectar el ácido nucleico diana, el equipo puede también tener contenedores que contienen nucleótidos para la amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana y/o un contenedor que comprende una forma de detección, como una proteína de unión a biotina, como la avidina o estreptavidina, unida a una molécula marcadora, como puede ser un marcaje enzimático, fluorescente o un radioisótopo.

El equipo de la invención comprenderá normalmente el contenedor descrito anteriormente y uno o más contenedores adicionales que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y de uso, como tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso. El contenedor puede contener una etiqueta para indicar que la composición se utiliza para una terapia específica o aplicación no terapéutica, y puede también contener directrices para su uso *in vivo* o *in vitro*, como las descritas anteriormente.

El p84P2A9-1 ha sido depositado bajo los requisitos del Tratado de Budapest el 6 de enero del 2000 en la American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA, y se ha identificado con el N° de Acceso de ATCC PTA-1151.

Ejemplos

Se describen e ilustran en profundidad varios aspectos de la invención por medio de los diferentes ejemplos que siguen a continuación, ninguno de los cuales pretende limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento generado por SSH de un fragmento de cDNA del gen 84P2A95 **Materiales y Métodos****Xenoinjertos LAPC y tejidos humanos:**

Los xenoinjertos LAPC se obtuvieron del Dr. Charles Sawyers (UCLA) y se generaron tal y como se describe (Klein et al, 1997, Nature Med. 3:402-408). Los xenoinjertos LAPC-4 AD y LAPC-4 AI (dependiente e independiente de andrógeno, respectivamente) y los xenoinjertos LAPC-9 AD y AI se cultivaron en ratones macho SCID y se transfirieron como pequeños trocitos de tejido a machos receptores. Los xenoinjertos LAPC-4 y -9 AI derivan de los tumores LAPC-4 o LAPC-9 AD, respectivamente. Los ratones macho portadores de tumores AD se castraron y se mantuvieron vivos durante 2-3 meses. Después de que los tumores recrecieran, se aislaron los tumores y se transfirieron a ratones macho SCID castrados o a hembras. Los tejidos humanos para el análisis de RNA y proteína se obtuvieron del Human Tissue Resource Center (HTRC) en UCLA (Los Angeles, CA) y de QualTek, Inc. (Santa Barbara, CA).
15 Una muestra de tejido de hiperplasia benigna de próstata procedía de un paciente.

Líneas celulares:

Las líneas celulares humanas (por ejemplo, HeLa) se obtuvieron de la ATCC y se mantuvieron en DMEM con suero fetal bovino al 5%.

Aislamiento de RNA:

20 El tejido tumoral y las líneas celulares se homogenizaron en reactivo Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) utilizando 10 ml/ g de tejido o 10 ml/ 10⁸ células para aislar RNA total. Se purificó RNA Poli A a partir del RNA total utilizando los equipos mRNA Mini y Midi de Qiagen Oligotex. Se cuantificó el mRNA y el RNA total mediante análisis espectrofotométrico (D.O. 260/280 nm) y se analizó mediante electroforesis en gel.

Oligonucleótidos:

25 Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos purificados mediante HPLC.

DPNCDN (cebador de síntesis de cDNA):

5'TTTTGATCAAGCTT₃₀3' (Id. de Sec. N°: 7)

Adaptador 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCGGGCAG3' (Id. de Sec. N°: 8)

30 3'GGCCCGTCCTAG5' (Id. de Sec. N°: 9)

Adaptador 2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3' (Id. de Sec. N°:10)

3'CGGCTCCTAG5' (Id. de Sec. N°: 11)

Cebador de PCR 1:

35 5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (Id. de Sec. N°: 12)

Cebador anidado (NP)1:

5'TCGAGCGGCCGCCGGGCAGGA3' (Id. de Sec. N°: 13)

Cebador anidado (NP)2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (Id. de Sec. N°: 14)

40 Hibridación sustractiva por supresión:

La Hibridación Sustractiva por Supresión (SSH) se utilizó para identificar los cDNA que corresponden a genes que pueden expresarse de forma diferencial en el cáncer de próstata. La reacción de SSH utilizó cDNA de dos xenoinjertos LAPC-4 AD. Específicamente, la secuencia de SSH de 84P2A9 se identificó a partir de una sustracción en la que un cDNA derivado de un tumor LAPC-4 AD, 3 días después de la castración, se sustrajo del cDNA derivado de un

tumor LAPC-4 AD generado en un macho intacto. El xenoinjerto tumoral LAPC-4 AD generado en un macho intacto se utilizó como fuente de cDNA "probador", mientras que el cDNA del tumor LAPC-4 AD, 3 días después de la castración, se utilizó como fuente de cDNA "conductor".

5 Los cDNA de doble cadena que corresponden a los cDNA probador y conductor se sintetizaron a partir de 2 µg de RNA poli(A)⁺ aislado del tejido xenoinjertado relevante, tal y como se ha descrito anteriormente, utilizando el equipo de sustracción PCR-select cDNA de CLONTECH y 1 ng de oligonucleótido DPNCNDN como cebador. La síntesis de la primera y segunda cadena se llevó a cabo como se describe en el protocolo del manual del usuario del equipo (Protocolo N° PT1117-1 de CLONTECH, Catálogo N° K1804-1). El cDNA resultante se digirió con Dpn II durante 3 h a 37°C. El cDNA digerido se extrajo con fenol/ cloroformo (1:1) y se precipitó con etanol.

10 El cDNA conductor se generó al combinar en una proporción 1:1 el cDNA digerido con Dpn II de la fuente de xenoinjerto relevante (véase más arriba) con una mezcla de cDNA digerido derivado de hiperplasia benigna de próstata humana (BPH), las líneas celulares humanas HeLa, 293, A431, Colo205, e hígado de ratón.

15 El cDNA probador se generó diluyendo 1 µl de cDNA digerido con Dpn II a partir de la fuente de xenoinjerto relevante (véase más arriba) (400 ng) en 5 µl de agua. El cDNA diluido (2 µl, 160 ng) se ligó entonces a 2 µl de Adaptador 1 y Adaptador 2 (10 µM), en reacciones de ligación separadas, en un volumen total de 10 µl a 16°C durante la noche, utilizando 400 U de DNA ligasa T4 (CLONTECH). La ligación se terminó con 1 µl de EDTA 0,2 M y se calentó a 72°C durante 5 min.

20 La primera hibridación se realizó añadiendo 1,5 µl (600 ng) de cDNA conductor a cada uno de los dos tubos que contienen 1,5 µl (20 ng) de cDNA probador ligado con Adaptador 1 y Adaptador 2. En un volumen final de 4 µl, las muestras se cubrieron con aceite mineral, se desnaturalizaron en un termociclador MJ Research a 98°C durante 1,5 minutos, y después se dejaron hibridar durante 8 h a 68°C. Las dos hibridaciones se mezclaron entonces junto con 1 µl adicional de cDNA conductor fresco desnaturalizado y se dejaron hibridar durante la noche a 68°C. La segunda hibridación se diluyó entonces en 200 µl de Hepes 20 mM, pH 8,3, NaCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, se calentó a 70°C durante 7 min. y se guardó a -20°C.

25 **Amplificación por PCR, clonaje y secuenciación de los fragmentos génicos generados a partir de SSH:**

Para amplificar los fragmentos génicos resultantes de las reacciones SSH, se realizaron dos amplificaciones de PCR. En la reacción primaria de PCR se añadió 1 µl de la mezcla final de hibridación diluida a 1 µl de cebador 1 de PCR (10 µM), 0,5 µl de mezcla de dNTP (10 µM), 2,5 µl de tampón de reacción 10 x (CLONTECH) y 0,5 µl de mezcla de cDNA polimerasa Advantage 50 x (CLONTECH) en un volumen final de 25 µl. La PCR 1 se realizó bajo las siguientes condiciones: 75°C durante 5 min., 94°C durante 25 s, después 27 ciclos de 94°C durante 10 s, 66°C durante 30 s, 72°C durante 1,5 min. Se realizaron cinco reacciones de PCR primarias por separado para cada experimento. Los productos se unieron y se diluyeron con agua en proporción 1:10. Para la reacción secundaria de PCR, se añadió 1 µl de la reacción de PCR primaria agrupada y diluida a la misma mezcla de reacción que la utilizada para la PCR 1, excepto que se utilizaron los cebadores NP1 y NP2 (10 µM) en lugar del cebador 1 de PCR. La PCR 2 se realizó utilizando 10-12 ciclos de 94°C durante 10 s, 68°C durante 30 s, 72°C durante 1,5 minutos. Los productos de PCR se analizaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2%.

40 Los productos de PCR se insertaron en un pCR2.1 utilizando el equipo de vector de clonaje T/A (Invitrogen). Las *E. coli* transformadas se sometieron a una selección de color azul/ blanco y con ampicilina. Se escogieron las colonias blancas y se dispusieron en placas de 96 pocillos y se cultivaron en medio líquido durante la noche. Para identificar los insertos, se realizó una amplificación por PCR sobre 1 ml de cultivo bacteriano utilizando las condiciones de las PCR1 y NP1 y NP2 como cebadores. Los productos de PCR se analizaron utilizando electroforesis en gel de agarosa al 2%.

45 Los clones bacterianos se guardaron en glicerol al 20% en un formato de 96 pocillos. El DNA plasmídico se preparó, secuenció, y se sometió a búsquedas de homología de ácidos nucleicos en las bases de datos del GenBank, dBest, y NCI-CGAP.

Análisis de la expresión mediante RT-PCR:

50 Las primeras cadenas de cDNA pueden generarse a partir de 1 µg de mRNA con cebadores oligo(dT)12-18 utilizando el sistema de preamplificación Gibco-BRL Superscript. Puede utilizarse el protocolo del fabricante que incluye una incubación de 50 min. a 42°C con transcriptasa reversa seguida por el tratamiento con RNasa H a 37°C durante 20 min. Tras completar la reacción, el volumen puede aumentarse hasta 200 µl con agua antes de la normalización. Pueden obtenerse de Clontech las primeras cadenas de cDNA de 16 tejidos normales humanos diferentes.

55 Se pueden normalizar las primeras cadenas de cDNA a partir de múltiples tejidos utilizando los cebadores 5'atatcgccgcgctcgctcgacaa3' (Id. de Sec. N°: 15) y 5'agccacacgcagctcattgtagaagg 3' (Id. de Sec. N°: 16) que amplifican la β-actina. La primera cadena de cDNA (5 µl) puede amplificarse en un volumen total de 50 µl que contiene cebadores 0,4 µM, 0,2 µM de cada dNTP, tampón de PCR 1X (Clontech, Tris-HCL 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3) y DNA polimerasa KlenTaq 1X (Clontech). Pueden recogerse 5 µl de la reacción de PCR a los 18, 20 y 22 ciclos y utilizarlos para una electroforesis en gel de agarosa. La PCR puede realizarse utilizando un termociclador

MJ Research bajo las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial puede ser a 94°C durante 15 s, seguida por 18, 20 y 22 ciclos a 94°C durante 15, 65°C durante 2 min., 72°C durante 5 s. Se puede realizar una extensión final a 72°C durante 2 min. Tras la electroforesis en gel de agarosa, pueden compararse las intensidades de banda de las bandas de 283 pb de la β -actina en los múltiples tejidos mediante inspección visual. Pueden calcularse factores de dilución de las primeras cadenas de cDNA para lograr la misma intensidad de banda de β -actina en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR. Pueden ser necesarias tres rondas de normalización para lograr la misma intensidad de banda en todos los tejidos después de los 22 ciclos de PCR.

Para determinar los niveles de expresión del gen 84P2A9, pueden analizarse 5 μ l de cDNA de primera cadena normalizado mediante PCR utilizando 25, 30 y 35 ciclos de amplificación utilizando pares de cebadores que pueden diseñarse con la ayuda del MIT (para más detalles, véase www.genome.wi.mit.edu).

El análisis de expresión semicuantitativo puede lograrse comparando los productos de PCR de números de ciclo que proporciona una intensidad de banda ligera.

Resultados

Los dos experimentos de SSH descritos en los Materiales y Métodos, más arriba, lograron el aislamiento de numerosos candidatos de clones de fragmentos del gen (clones SSH). Todos los clones candidatos se secuenciaron y se sometieron a análisis de homología frente a todas las secuencias de las principales bases de datos de genes y EST públicas para proporcionar información sobre la identidad del gen correspondiente y para ayudar a tomar la decisión de analizar la expresión diferencial de un gen particular. En general, los fragmentos génicos que no tenían homología con ninguna secuencia conocida en ninguna de las bases de datos utilizadas, y que se consideraron por lo tanto que representaban nuevos genes, así como todos los fragmentos génicos que mostraban homología con marcas de secuencia expresadas (EST) previamente secuenciadas, se sometieron a análisis diferencial de expresión mediante RT-PCR y/o análisis Northern.

Uno de los clones de SSH que comprende alrededor de 425 pb, mostró una homología significativa a varias EST derivadas de testículos pero ninguna homología a ningún gen conocido, y se le llamó 84P2A9.

El análisis de expresión Northern de las primeras cadenas de cDNA de 16 tejidos normales mostró un patrón de expresión altamente relacionado con la próstata y los testículos en tejidos adultos (Fig. 4).

Ejemplo 2: Clonaje de 84P2A9 de longitud completa

Se clonó un clon de cDNA de 84P2A9 de longitud completa (clon 1) de 2347 pares de bases (pb) a partir de una biblioteca de cDNA de LAPC-4 AD (Lambda ZAP Express, Stratagene) (Fig. 2). El cDNA codifica un marco de lectura abierto (ORF) de 504 aminoácidos. El análisis de la secuencia reveló la presencia de seis señales de localización nuclear potenciales y se predijo que eran de localización nuclear utilizando el programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/form.html>). La secuencia de proteína es homóloga a la proteína KIAA1152 de cerebro humano (39,5% de identidad sobre una región de 337 aminoácidos), y presenta un dominio que es homólogo al de la proteína supresora de tumores LUCA15 (64,3% de identidad sobre una región de 42 aminoácidos) (GenBank N° Acceso P52756) (Fig. 3). El cDNA de 84P2A9 se depositó el 5 de enero de 2000 en la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) como el plásmido p84P2A9-1, y se le ha asignado el N° de Acceso PTA-1151.

Las proteínas de 84P2A9 no tienen homología con ninguna proteína conocida, pero la secuencia se solapa con varios EST derivados de testículos.

Ejemplo 3: Análisis de la expresión génica de 84P2A9

La expresión de mRNA de 84P2A9 en tejidos humanos normales se analizó mediante Northern blotting de dos transferencias de múltiples tejidos (Clontech; Palo Alto, California), que comprenden un total de 16 tejidos normales humanos diferentes, utilizando como sonda un fragmento de SSH de 84P2A9 marcado (Ejemplo 1). Las muestras de RNA se normalizaron cuantitativamente con una sonda de β -actina. Los resultados demostraron expresión de un transcrito de 2,4 y 4,5 kb en testículos y próstata normales (Fig. 4).

Para analizar la expresión de 84P2A9 en líneas de tejidos de cáncer de próstata se realizó un Northern blot con RNA derivado de los xenoinjertos LAPC. Los resultados mostraron altos niveles de expresión de 84P2A9 en todos los xenoinjertos, con los niveles más altos detectados en LAPC-9 AD, LAPC-9 AI (Fig. 4 y 5). Estos resultados proporcionan evidencias de que 84P2A9 está regulado positivamente en el cáncer de próstata.

Además, se detectaron altos niveles de expresión en líneas celulares de cáncer de cerebro (PFSK-1, T98G), hueso (HOS, U2-OS), pulmón (CALU-1, NCI-H82, NCI-H146), y riñón (769-P, A498, CAKI-1, SW839) (Fig. 5). Se detectaron niveles de expresión moderados en varias líneas celulares de cáncer de páncreas (PANC-1, BxPC-3, HPAC, CAPAN-1), colon (SK-CO-1, CACO-2, LOVO, COLO-205), hueso (SK-ES-1, RD-ES), mama (MCF-7, MDA-MB-435s) y testículos (NCCIT) (Fig. 5).

Además, las muestras de pacientes con cáncer de próstata mostraron expresión de 84P2A9 tanto en la parte normal como tumoral de los tejidos de la próstata (Fig. 6). Estos resultados sugieren que 84P2A9 es un gen muy específico de testículos que está regulado positivamente en el cáncer de próstata y potencialmente en otros cánceres. De forma similar a los antígenos MAGE, el 84P2A9 puede calificarse como un antígeno de cáncer de testículos (Van den Eynde y Boon, Int J Clin Lab Res. 27:81-86,1997).

La expresión de 84P2A9 en tejidos normales puede analizarse utilizando un dot blot de RNA de múltiples tejidos que contiene diferentes muestras (que representan principalmente tejidos normales así como unas cuantas líneas celulares de cáncer).

Ejemplo 4: Generación de anticuerpos policlonales de 84P2A9

Pueden obtenerse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, el agente inmunizante y/o adyuvante se inyectará en el mamífero mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Normalmente puede diseñarse un péptido de una región codificante de 84P2A9. Alternativamente el agente inmunizante puede incluir toda o parte de la proteína 84P2A9, o proteínas de fusión de la misma. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de 84P2A9 puede fusionarse a cualquiera de una serie de parejas de proteínas de fusión que son bien conocidas en la materia, como la proteína de unión a la maltosa, LacZ, tiorredoxina o una región constante de inmunoglobulina (véase, por ejemplo, Current Protocols In Molecular Biology, Volumen 2, Unidad 16, Frederick M. Ausubul et al. eds., 1995; Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N., y Ledbetter, L.(1991) J.Exp. Med. 174, 561-566). Otras de dichas proteínas bacterianas recombinantes incluyen la glutatión-S-transferasa (GST), y las proteínas de fusión de 84P2A9 con cola de HIS (que pueden purificarse utilizando la matriz de afinidad apropiada a partir de bacterias inducidas).

Puede ser útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que va a ser inmunizado. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no se limitan a la hemocianina de lapa, albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de la tripsina de soja. Ejemplos de adyuvantes que pueden utilizarse incluyen el adyuvante completo de Freund y el adyuvante MPL-TDM (Lípido A de monofosforilo, dicorinomicolato de trehalosa sintética).

En un protocolo típico, inicialmente se inmunizan los conejos por vía subcutánea con alrededor de 200 µg de proteína de fusión o péptido KLH mezclado con adyuvante completo de Freund. Los conejos se inyectan entonces por vía subcutánea cada dos semanas con alrededor de 200 µg de inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund. Se toman muestras de sangre aproximadamente a los 7-10 días después de cada inmunización y se utilizan para monitorizar la titulación del antisuero mediante ELISA.

La especificidad del antisuero se prueba mediante análisis de Western blot e inmunoprecipitación utilizando lisados de células modificadas genéticamente o células que expresan 84P2A9 endógeno. Para modificar genéticamente las células para que expresen 84P2A9, se puede clonar el cDNA de longitud completa de 84P2A9 en un vector de expresión que proporciona una cola de 6 His en el extremo carboxilo terminal (pCDNA 3.1 myc-his, InVitrogen). Tras la transfección de las construcciones en células 293T, los lisados celulares pueden inmunoprecipitarse y analizarse por Western blot utilizando anticuerpos anti-His o anti-epítipo v5 (Invitrogen) y el suero anti-84P2A9 (véase, por ejemplo, Fig. 11). Los sueros de los conejos inmunizados con la proteína con cola de His y con péptido, así como los sueros deplecionados de proteína GST y MBP se purificaron mediante su paso por una columna de afinidad compuesta del inmunógeno respectivo covalentemente acoplado a la matriz Affigel (BioRad).

Ejemplo 5: Producción de 84P2A9 recombinante en sistemas bacterianos y de mamíferos

CONSTRUCCIONES BACTERIANAS

Producción de 84P2A9 recombinante utilizando construcciones de pGEX

Para expresar 84P2A9 en células bacterianas, se fusionó una porción de 84P2A9 al gen de la glutatión S-transferasa (GST) mediante el clonaje en pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Todas las construcciones se realizaron para generar secuencias de proteínas de 84P2A9 recombinantes con la GST fusionada al extremo N-terminal y un epítipo de seis histidinas en el C-terminal. El epítipo de seis histidinas se generó añadiendo los codones de histidina al ORF del extremo 3' del cebador de clonaje. Un sitio de reconocimiento PreScission™ permite que se escinda el marcaje de GST del 84P2A9. El gen de la resistencia a la ampicilina y el origen de pBR322 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. En esta construcción, se clonó un fragmento que contiene los aminoácidos de 1 a 151 de 84P2A9 en pGEX-6P-1. Se pueden realizar construcciones adicionales en pGEX-6P-1 que abarcan regiones de la proteína 84P2A9 como las comprendidas entre los aminoácidos 1 a 504 y los aminoácidos 151 a 504.

Construcciones en mamíferos

Para expresar 84P2A9 recombinante en sistemas de mamíferos, el cDNA de 84P2A9 de longitud completa puede por ejemplo, clonarse en un vector de expresión que proporciona una cola de 6 His en el extremo carboxilo (pCDNA 3.1 myc-his, InVitrogen). Las construcciones pueden transfectarse en células 293T. Los lisados de las células 293T

transfectadas pueden ensayarse en un Western blot con el suero policlonal anti-84P2A9 descrito en el Ejemplo 4 anterior.

Los genes de 84P2A9 pueden también subclonarse en el vector de expresión retroviral pSRaMSVtkneo y utilizarse para establecer líneas celulares que expresan 84P2A9 tal y como se describe a continuación. La secuencia codificante de 84P2A9 (desde el inicio de la traducción ATG hasta los codones de terminación) se amplificó mediante PCR utilizando el molde de ds cDNA del cDNA de 84P2A9. El producto de PCR se subclonó en pSRaMSVtkneo mediante los sitios de restricción del vector EcoR1 (rom) y Xba 1, y se transformó en células competentes DH5α. Se recogieron las colonias para cribar los clones con un único sitio de restricción interna en el cDNA. Los clones positivos se confirmaron por secuenciación del inserto de cDNA. Se pueden utilizar entonces retrovirus para infectar y generar varias líneas celulares utilizando, por ejemplo, células NIH 3T3, TsuPr1, 293 o rat-1.

Se discuten a continuación los sistemas específicos de mamífero.

Producción de 84P2A9 recombinante utilizando construcciones en pcDNA3.1/V5-His-TOPO

Para expresar 84P2A9 en células de mamífero, se clonó el ORF de 1512 pb (504 aminoácidos) de 84P2A9 junto con la secuencia consenso de inicio de traducción perfecto Kozak en pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de proteínas se realizó a partir del promotor de citomegalovirus (CMV). La proteína recombinante posee el epítipo V5 y seis histidinas fusionadas al C-terminal. El vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO también contiene la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y la secuencia de terminación de la transcripción para aumentar la estabilidad del mRNA junto con el origen de SV40 para la replicación episómica y el rescate simple del vector en las líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de la resistencia a la neomicina permite la selección de células de mamíferos que expresan la proteína y el gen de resistencia a la ampicilina y el origen ColE1 permiten la selección y mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Construcciones pSRa

Para generar líneas celulares de mamíferos que expresan 84P2A9 de forma constitutiva, se clonó el ORF de 1551 pb (517 aminoácidos) en construcciones pSRa. Se generaron retrovirus anfotrópicos y ecotrópicos por transfección de construcciones pSRa en la línea de empaquetamiento 293T-10A1 o por cotransfección de pSRa y un plásmido ayudante (ϕ) en células 293, respectivamente. El retrovirus puede utilizarse para infectar una serie de líneas celulares de mamífero, con el resultado de la integración del gen clonado, 84P2A9, en las líneas celulares huésped. La expresión de proteína está dirigida por una repetición terminal larga (RTL). El gen de la resistencia a la neomicina permite la selección de células de mamíferos que expresan la proteína y el gen de resistencia a la ampicilina y el origen ColE1 permiten la selección y mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Se han obtenido construcciones adicionales de pSRa para producir ambas proteínas de fusión GFP y myc/6 HIS en los extremos N-terminal y C-terminal de la proteína 84P2A9 de longitud completa.

Ejemplo 6: Producción de 84P2A9 recombinante en un sistema de baculovirus

Para generar una proteína recombinante de 84P2A9 en un sistema de expresión de baculovirus, se clonó el cDNA de 84P2A9 en el vector de transferencia de baculovirus pBlueBac 4.5 (Invitrogen), que proporciona una cola de His en el extremo N-terminal. Específicamente, pBlueBac-84P2A9 se co-transfectó con el plásmido ayudante pBac-N-Blue (Invitrogen) en células de insecto SF9 (*Spodoptera frugiperda*) para generar baculovirus recombinantes (véase manual de instrucciones de Invitrogen para más detalles). El baculovirus se extrajo entonces del sobrenadante celular y se purificó mediante ensayo en placa.

La proteína recombinante de 84P2A9 se generó entonces mediante la infección de células de insecto HighFive (Invitrogen) con el baculovirus purificado. La proteína recombinante de 84P2A9 puede detectarse utilizando anticuerpos anti-84P2A9. La proteína 84P2A9 puede purificarse y utilizarse en varios ensayos basados en células o utilizarse como inmunógeno para generar anticuerpos policlonales y monoclonales específicos anti-84P2A9.

Ejemplo 7: Mapeo cromosómico del gen 84P2A9

La localización cromosómica de 84P2A9 se determinó utilizando el panel de híbridos de radiación GeneBridge4 (Walter et al., 1994, Nat. Genetics 7:22) (Research Genetics, Huntsville AL). Se utilizaron los siguientes cebadores de PCR para localizar el 84P2A9:

84P2A9.1 gacttcactgatgcatgtaggt (Id. de Sec. N°: 17)

84P2A9.2 gtcaatactttccgatgcttgct (Id. de Sec. N°: 18)

El vector de mapeo resultante para los 93 DNA del panel de híbridos de radiación fue: 000010001100101100100000110001001001000010001100010000000100100101000000010000010000. Este vector y el programa de mapeo que está en <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl> situó el 84P2A9 en la localización cromosómica 1q32.3 (D1S1602-D1S217).

Ejemplo 8: Identificación de rutas potenciales de transducción de señales

Para determinar si el 84P2A9 activa directa o indirectamente las rutas de transducción de señales en células, se llevaron a cabo ensayos de marcadores transcripcionales basados en la luciferasa (luc) en células que expresan 84P2A9. Estos marcadores transcripcionales contienen sitios de unión consenso para factores de transcripción conocidos que discurren corriente abajo de las rutas de transducción de señales. Los marcadores y ejemplos de los factores de transcripción asociados, rutas de transducción de señales, y estímulos de activación se enumeran a continuación.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; quinasa Ik/ SAPK; crecimiento/ apoptosis/ estrés
2. SRE-luc, SRF/ TCF/ ELK1; MAPK/ SAPK; crecimiento/ diferenciación
3. AP-1-luc, FOS/ JUN; MAPK/ SAPK/ PKC; crecimiento/ apoptosis/ estrés
4. ARE-luc, receptor de andrógenos; esteroides/ MAPK; crecimiento/ diferenciación/ apoptosis
5. p53-luc, p53; SAPK; crecimiento/ diferenciación/ apoptosis
6. CRE-luc, CREB/ ATF2; PKA/ p38; crecimiento/ apoptosis/ estrés

Los efectos mediados por 84P2A9 se pueden ensayar en células que muestran expresión del mRNA. Los plásmidos con marcador luciferasa pueden introducirse mediante transfección mediada por lípidos (TFX-50, Promega). La actividad luciferasa, un indicador de la actividad transcripcional relativa, se mide mediante la incubación de los extractos celulares con el sustrato luciferina y se monitoriza la luminiscencia de la reacción en un luminómetro.

Ejemplo 9: Generación de anticuerpos monoclonales de 84P2A9

Para generar MAb dirigidos contra 84P2A9, normalmente se inmunizan ratones Balb C por vía intraperitoneal con alrededor de 10-50 µg de proteína inmunogénica mezclada con adyuvante completo de Freund. Las proteínas inmunogénicas incluyen proteínas recombinantes de 84P2A9 producidas en bacterias y baculovirus, y proteínas de fusión de Fc de IgG humano expresadas en mamíferos. Los ratones se inmunizan posteriormente cada 2-4 semanas con 10-50 µg de antígeno mezclado con adyuvante incompleto de Freund. Alternativamente, se utiliza adyuvante de Ribi para las inmunizaciones iniciales. Además, se utiliza un protocolo de inmunización basado en DNA que utiliza un vector de expresión de mamífero como el pCDNA 3.1, que codifica el cDNA de 84P2A9 solo o como fusión con un Fc de IgG, para inmunizar ratones mediante la inyección directa del DNA del plásmido. Este protocolo se utiliza solo y en combinación con proteínas inmunogénicas. Se toman muestras de sangre cada 7-10 días después de la inmunización para monitorizar la titulación y especificidad de la respuesta inmune. Una vez obtenidos una reactividad y especificidad apropiadas determinadas mediante análisis de ELISA, Western blot e inmunoprecipitación, se lleva a cabo la fusión y generación de hibridomas mediante los procedimientos establecidos que son bien conocidos en la materia (Harlow y Lane, 1988).

En un protocolo específico típico, se sintetiza una proteína de fusión de glutatión-S-transferasa (GST) abarcando una proteína de 84P2A9 y se utiliza como inmunógeno. Los ratones Balb C se inmunizaron inicialmente por vía intraperitoneal con 10-50 µg de la proteína de fusión GST-84P2A9 mezclada en adyuvante completo de Freund. Los ratones se inmunizaron posteriormente cada 2 semanas con 10-50 µg de proteína GST-84P2A9 mezclada en adyuvante incompleto Freund con un total de 3 inmunizaciones. La reactividad del suero de los ratones inmunizados a la proteína 84P2A9 de longitud completa se monitorizó mediante ELISA utilizando una preparación parcialmente purificada de proteína 84P2A9 con una cola de HIS expresada a partir de células 293T (Ejemplo 5). Los ratones que mostraron la reactividad más fuerte se dejaron descansar durante 3 semanas, se les administró una inyección final de proteína de fusión en PBS y se sacrificaron 4 días después. Se extrajeron los bazo de los ratones sacrificados y se fusionaron con células de mieloma SPO/2 utilizando procedimientos estándar (Harlow y Lane, 1988). Los sobrenadantes de los pocillos de crecimiento después de la selección con HAT, se cribaron mediante ELISA y Western blot para identificar los clones productores de anticuerpos específicos de 84P2A9.

La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal de 84P2A9 se puede determinar utilizando tecnología estándar. Las mediciones de afinidad cuantifican la fuerza del anticuerpo en su unión a epítopos y puede utilizarse para ayudar a definir qué anticuerpos monoclonales de 84P2A9 son preferibles para su uso diagnóstico o terapéutico. El sistema BIAcore (Uppsala, Suecia) es un método preferible para determinar la afinidad de unión. El sistema BIAcore utiliza la resonancia de plasmón en superficie (RPS, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23:1; Morton y Myszk, 1998, Methods in Enzymology 295:268) para monitorizar las interacciones biomoleculares a tiempo real. El análisis BIAcore genera de forma adecuada las constantes de la tasa de asociación, constantes de la tasa de disociación, constantes de disociación de equilibrio y constantes de afinidad.

Ejemplo 10: Ensayos in vitro de la función de 84P2A9

La expresión de 84P2A9 en cáncer de próstata proporciona evidencia de que este gen posee un papel funcional en la progresión tumoral. Es posible que 84P2A9 funcione como factor de transcripción involucrado en la activación de genes que participan en la tumorigénesis o en la represión de genes que bloquean la tumorigénesis. La función de 84P2A9 puede evaluarse en células de mamíferos utilizando aproximaciones *in vitro*. Para la expresión en mamífe-

ros, el 84P2A9 puede clonarse en diferentes vectores apropiados, como pcDNA 3.1 myc-His-tag (Ejemplo 5) y el vector retroviral pSR α tkneo (Muller et al., 1991, MCB 11:1785). Utilizando dichos vectores de expresión, el 84P2A9 puede expresarse en diferentes líneas celulares, como NIH 3T3, rat-1, TsuPr1 y 293T. La expresión de 84P2A9 puede monitorizarse utilizando anticuerpos anti-84P2A9 (véanse los Ejemplos 4 y 9).

5 Las líneas celulares de mamíferos que expresan 84P2A9 pueden analizarse en varios ensayos *in vitro* e *in vivo*, como proliferación celular en cultivo de tejidos, activación de señales apoptóticas, formación de tumores en ratones SCID, e invasión *in vitro* utilizando un sistema de cultivo de invasión de membrana (SCIM) (Welch et al., Int. J. Cancer 43:449-457). El fenotipo de las células con 84P2A9 se compara con el fenotipo de las células que carecen de expresión de 84P2A9. El efecto transcripcional de 84P2A9 puede analizarse evaluando el efecto de 84P2A9 sobre la expresión génica utilizando chips de genes (Clontech) y ensayos de marcadores transcripcionales (Stratagene).

10 En las líneas celulares que expresan la 84P2A9 pueden también analizarse la alteración de las propiedades invasivas y migratorias midiendo el paso de las células a través de una cámara con una membrana porosa cubierta de matrigel (Becton Dickinson). El paso de las células a través de la membrana al lado opuesto se monitoriza utilizando un ensayo de fluorescencia (Becton Dickinson Technical Bulletin N° 428) utilizando células indicadoras marcadas con calceína-Am (Molecular Probes). Las líneas celulares analizadas incluyen las células PC3, NIH 3T3 y LNCaP parentales y que sobreexpresan 84P2A9. Para determinar si las células que expresan 84P2A9 poseen propiedades quimioatrayentes, se monitoriza si las células indicadoras pasan a través del poro de la membrana hacia un gradiente de medio acondicionado con 84P2A9 en comparación con un medio control. Este ensayo puede también utilizarse para cualificar y cuantificar la neutralización específica del efecto inducido por 84P2A9 con composiciones terapéuticas candidatas contra el cáncer.

15 La función de 84P2A9 puede evaluarse utilizando tecnología de RNA antisentido acoplado a varios ensayos funcionales descritos antes, por ejemplo crecimiento, invasión y migración. Los oligonucleótidos de RNA antisentido pueden introducirse en células que expresan 84P2A9, evitando de esta manera la expresión de 84P2A9. En las células control y las que contienen el RNA antisentido puede analizarse su potencial de proliferación, invasión, migración, apoptótico y transcripcional. Se puede valorar el efecto local así como el sistémico de la pérdida de expresión de 84P2A9.

Ejemplo 11: Ensayo *in vivo* para la promoción del crecimiento tumoral de 84P2A9

20 El efecto de la proteína 84P2A9 sobre el crecimiento celular tumoral puede evaluarse *in vivo* mediante la sobreexpresión génica en ratones portadores de tumores. Por ejemplo, pueden inyectarse en ratones SCID por vía subcutánea, en cada flanco, 1×10^6 células de PC3, TSUPR1 o DU145 que contienen el vector tkNeo vacío o con 84P2A9. Se pueden utilizar al menos dos estrategias: (1) la expresión constitutiva de 84P2A9 bajo la regulación de un promotor, como un promotor constitutivo obtenido de los genomas de virus como el virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (como el Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y virus de simio 40 (SV40), o a partir de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped, y (2) expresión regulada bajo control de un sistema de vector inducible, como la ecdysona, tet, etc., siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped. El volumen tumoral se monitoriza entonces tras la aparición de tumores palpables y se siguen a lo largo del tiempo para determinar si las células que expresan 84P2A9 crecen a una tasa de velocidad superior y si los tumores producidos por las células que expresan 84P2A9 demuestran características de agresividad alteradas (por ejemplo aumento de metástasis, vascularización, reducción de la respuesta a fármacos quimioterapéuticos). Además, a los ratones se les puede implantar por vía ortotópica 1×10^5 de las mismas células para determinar si la 84P2A9 posee un efecto sobre el crecimiento local en la próstata o sobre la capacidad de las células para metastatizar, específicamente en los pulmones, nódulos linfáticos y médula ósea.

45 El ensayo es también útil para determinar el efecto inhibitorio sobre 84P2A9 de composiciones terapéuticas candidatas, como por ejemplo, intracuerpos 84P2A9, moléculas antisentido de 84P2A9 y ribozimas.

Ejemplo 12: Análisis de Western de la expresión de 84P2A9 en Fracciones Subcelulares

50 El análisis de la secuencia de 84P2A9 reveló la presencia de señales de localización nuclear. La localización celular de 84P2A9 puede evaluarse utilizando técnicas de fraccionamiento subcelular ampliamente utilizadas en biología celular (Storrie B, et al. Methods Enzymol. 1990; 182:203-25). Las líneas celulares de próstata o testículos pueden separarse en fracciones nucleares, citosólicas y de membrana. La expresión de 84P2A9 en las diferentes fracciones puede valorarse utilizando técnicas de Western blot.

55 Alternativamente, para determinar la localización subcelular de 84P2A9, las células 293T pueden transfectarse con un vector de expresión que codifica para 84P2A9 con cola de HIS (pCDNA 3.1 MYC/HIS, Invitrogen). Las células transfectadas pueden separarse y someterse a un protocolo de fraccionamiento subcelular diferencial tal como se ha descrito previamente (Pemberton, P.A. et al, 1997, J of Histochemistry and Cytochemistry, 45:1697-1706.) Este protocolo separa la célula en fracciones enriquecidas de núcleo, membranas pesadas (lisosomal, peroxisomal y mitocondrial), membranas ligeras (membrana plasmática y retículo endoplasmático), y proteínas solubles.

A lo largo de esta solicitud, se hace referencia a varias publicaciones (entre paréntesis, por ejemplo).

El ámbito de la presente invención no ha de limitarse a las realizaciones divulgadas aquí, que tienen la intención de ser simples ilustraciones de aspectos individuales de la invención, y todas las que sean funcionalmente equivalentes quedan dentro del ámbito de la invención. Diversas modificaciones de los modelos y métodos de la invención, además de aquellas descritas aquí, resultarán obvias para los expertos en la materia a partir de la descripción y enseñanzas anteriores, y se pretende asimismo que pertenezcan al ámbito de la invención. Dichas modificaciones u otras realizaciones pueden ponerse en práctica sin alejarse del verdadero ámbito y espíritu de la invención.

TABLAS

TABLA 1: Predicción de la unión de péptidos de las proteínas de 84P2A9 a las moléculas HLA-A2 de MHC de clase I humanas

Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación)
1	300	SILTGSFPL (Id. de Sec. N°: 19)	63,04
2	449	RMLQNMGWT (Id. de Sec. N°: 20)	33,75
3	4	LVHDLVSAL (Id. de Sec. N°: 21)	29,97
4	238	SLSSTDAGL (Id. de Sec. N°: 22)	21,36
5	198	KIQDEGWL (Id. de Sec. N°: 23)	17,28
6	433	FVGENAQPI (Id. de Sec. N°: 24)	17,22
7	301	ILTGSFPLM (Id. de Sec. N°: 25)	16,05
8	218	KMECEEQKV (Id. de Sec. N°: 26)	11,25
9	480	KGLGLGFPL (Id. de Sec. N°: 27)	10,47
10	461	GLGRDGKGI (Id. de Sec. N°: 28)	10,43

Las TABLAS 3-16 proporcionan un análisis adicional de la predicción de la unión de péptidos a partir de proteínas de 84P2A9 a varias moléculas de HLA.

TABLA 2: MATRIZ DE SUSTITUCIÓN DE AMINOÁCIDOS. Adaptado de la matriz de sustitución de aminoácidos (matriz de sustitución de bloque) BLOSUM62 del programa del GCG 9.0. Cuanto más alto sea un valor, más probabilidad de encontrar una sustitución en proteínas naturales relacionadas.

A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y	
4	0	-	-	-2	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-1	1	0	0	-3	-2	A
	2	1																		
	9	-	-	-2	-3	-3	-1	-3	-1	-1	-3	-3	-3	-3	-1	-1	-1	-2	-2	C
		3	4																	
		6	2	-3	-1	-1	-3	-1	-4	-3	1	-1	0	-2	0	-1	-3	-4	-3	D
			5	-3	-2	0	-3	1	-3	-2	0	-1	2	0	0	-1	-2	-3	-2	E
				6	-3	-1	0	-3	0	0	-3	-4	-3	-3	-2	-2	-1	1	3	F
					6	-2	-4	-2	-4	-3	0	-2	-2	-2	0	-2	-3	-2	-3	G
						8	-3	-1	-3	-2	1	-2	0	0	-1	-2	-3	-2	2	H
							4	-3	2	1	-3	-3	-3	-3	-2	-1	3	-3	-1	I
								5	-2	-1	0	-1	1	2	0	-1	-2	-3	-2	K
									4	2	-3	-3	-2	-2	-2	-1	1	-2	-1	L
										5	-2	-2	0	-1	-1	-1	1	-1	-1	M
											6	-2	0	0	1	0	-3	-4	-2	N
												7	-1	-2	-1	-1	-2	-4	-3	P
													5	1	0	-1	-2	-2	-1	Q
														5	-1	-1	-3	-3	-2	R
															4	1	-2	-3	-2	S
																5	0	-2	-2	T
																	4	-3	-1	V
																		11	2	W
																			7	Y

5 TABLA 3A

Resultados de búsqueda de motivos de los péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número exacto
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A1
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 3B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	71	SLEEPSKDY	45,000
2	469	ISEPIQAMQ	27,000
3	283	KEDPTELDK	25,000

4	15	SSEQARGGF	13,500
5	23	FAETGDHSR	9,000
6	441	ILENNIGNR	9,000
7	241	STDAGLFTN	6,250
8	872	LEEPSKDYR	4,500
9	233	ESDSSSLSS	3,750
10	92	DSDDQMLVA	3,750
11	157	MTQPPEGCR	2,500
12	413	TGDIKRRRK	2,500
13	256	DDEQSDWRY	2,250
14	373	RTEHDQHQL	2,250
15	309	MSHPSRRGF	1,500
16	207	ESEETNQTN	1,350
17	231	MSESDSSSL	1,350
18	64	LSECSDSSL	1,350
19	456	WTPGSGLGR	1,250
20	375	EHDQHQLLR	1,250
21	293	VPDPVFES1	1,250
22	93	SDDQMLVAK	1,000
23	494	ATTPNAGK	1,000
24	208	SEETNQTNK	0,900
25	205	VLESEETNQ	0,900
26	79		0,900
27	11	ALEESSEQA	0,900
28	226	VSDELMSES	0,750
29	31	RSISCPLKR	0,750
30	90	HSDSDDQML	0,750

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNKKDH SDSDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRMTMQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDLE MSESDSSSL STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGFVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRARG HKKNCSVRTA
401    SRQTSMLHGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 4A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A1
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	10
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	Tabla 30

TABLA 4B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	469	ISEPIQAMQR	675,000
2	92	DSDDqMLVAK	30,000
3	207	ESEEtNQTNK	27,000
4	168	DMDSdRAYQY	25,000
5	11	ALEEsSEQAR	9,000
6	71	SLEEpSKDYR	9,000
7	282	EKEDpTELDK	4,500
8	166	DQDMdSDRAY	3,750
9	90	HSDSdDQMLV	3,750
10	177	YQEFtKNKVK	2,700
11	144	AVDLpQDISN	2,500
12	373	RTEHdQHQLL	2,250
13	33	ISCPiKRQAR	1,500
14	231	MSESdSSSLs	1,350
15	15	SSEQaRGGFA	1,350
16	254	QGDDeQSDWF	1,250
17	255	GDDEqSDWFY	1,250
18	293	VPDPvFESIL	1,250

19	173	RAYQyQEFTK	1,000
20	481	GLGLgFPLPK	1,000
21	205	VLESeETNQT	0,900
22	79	YREnhNNNKK	0,900
23	441	ILENnIGNRM	0,900
24	23	FAETgDHSRS	0,900
25	121	ESDFaVDNVG	0,750
26	233		0,750
27	409	GSLCtGDIKR	0,750
28	259	QSDWfYEKES	0,750
29	70	SSLEePSKDY	0,750
30	67	GSDSsLEEPS	0,750

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNvhHPWET GHCLSEgSDS SLEEPSKDYR ENHNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRtMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDel MSESdSSSLs STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWfYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELd KNPDPVPFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHq LLRDnRAERG HkKNCsVRTA
401    SRQTSMLGSL LCTGDIKRRR KAAPLPgPTT AGfVGENAQp ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 5A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A_0201
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 5B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	300	SILTGSFPL	63,035
2	449	RMLQNMGWT	32,748
3	4	LVHDLVSAL	29,965
4	238	SLSSTDAGL	21,362
5	198	KIQDEGVVL	17,282
6	433	FVGENAQPI	17,217
7	301	ILTGSEELM	16,047
8	218	KMECEEQKV	11,252
9	480	KGLGLGFPL	10,474
10	461	GLGRDGKGI	10,433
11	341	SMVPIGPV	6,530
12	468	GISEPIQAM	6,442
13	405	SMHLGSLCT	5,382
14	191	KIIRQCPKI	5,021
15	117	PLWHESDFA	2,445
16	177	YQEFTKNKV	2,076
17	454	MGWTPGSGL	1,968
18	156	TMTQPPEGC	1,758
19	374	TEHDQHQLL	1,703
20	52	YNVHHPWET	1,678
21	474	QAMQRPKGL	1,098
22	240	SSTDAGLFT	1,097
23	438	AQPILENNI	1,058
24	269	GGACGITGV	1,044
25	143	MAVDLFQDI	1,010
26	206	LESEETNOT	1,010
27	173	RAYQYQEFT	0,893
28	3	ELVHDLVSA	0,857
29	132	RTLRRRRKV	0,715
30	266	KESGGACGI	0,710
Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)			

```

1      MEELVHOLVS ALLESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKOYR ENHNNNKKDH SDSDDDQLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNNG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQF PEGCRUQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDLE MSEDSSSLs STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRAGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEDQHQ LLRONRAERG HKKNCSVATA
401    SRQTSMLGSL LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 6A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A_0201
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	10
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 6B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	230	LMSEsDSSSL	107,536
2	63	CLSEgSDSSSL	87,586
3	117	PLWHESDFAV	73,661
4	453	NMGWtPGSGL	15,428
5	475	AMQRpKGLGL	15,428
6	433	FVGEaAQPIIL	14,454
7	323	RLHGmSSKNI	10,433
8	142	RMAVdLPQDI	7,535
9	483	GLGFpLPKST	7,452
10	300	SILTGSFPLM	4,802

11	3	ELVHdLVSAL	3,685
12	473	IQAMqRPKGL	3,682
13	292	NVPDPVFESI	3,485
14	124	FAVDnVGNRT	1,952
15	334	KSGGPTSMV	1,589
16	445	NIGNrMLQNM	1,571
17	315	RGFQaRLSRL	1,187
18	268	SGGAcGITGV	1,044
19	288	ELDKnVPDPV	1,022
20	486	FPLPkSTSAT	0,828
21	205	VLESeETNQT	0,811
22	402	RQTSmHLGSL	0,648
23	425	LPGPtTAGFV	0,552
24	441	ILENnIGNRM	0,541
25	237	SSLSSTDAGL	0,516
26	10	SALEeSSEQA	0,513
27	212	NOTNkDKMEC	0,504
28	301	ILTGsFPLMS	0,481
29	239	LSSTDAGLFT	0,455
30	103	RPSSnLNNNV	0,454

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNNG NRTLARRRKV KRMAVOLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEZQKVSDEL MSESDSSSLs STOAGLFTND
251    EGRQGDDQES DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGsFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGFVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRONRAERG HKKNCSVRTA
401    SRQTSMLHGS LCTGDIKARR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 7A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A3

longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 7B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	326	GMSSKNIKK	120,000
2	245	GLFTKDEGR	60,000
3	133	TLRRRRKVK	10,000
4	146	DLPQDISNK	9,000
5	410	SLCTGDIKR	8,000
6	107	NLNNNVRGK	6,000
7	258	EQSDWFYEK	4,860
8	71	SLEEPSKDY	4,500
9	381	LLRDNRAER	4,000
10	441	ILENLNIGNR	1,800
11	494	ATTPNAGK	1,500
12	301	ILTGSFPLM	0,900
13	461	GLGRDGKGI	0,900
14	128	NVGNRTLRR	0,800
15	238	SLSSTDAGL	0,600
16	307	PLMSHPSRR	0,600
17	456	WTPGSGLGR	0,600
18	218	KMECEEQKV	0,600
19	283	KEDPTELDK	0,540
20	409	GSLCTGDIK	0,450
21	273	GITGVVPWW	0,405
22	344	PIPGPVGNK	0,405
23	184	KVKKRKLKI	0,360
24	156	TMTOPPEGC	0,300

25	11	ALEESSEQA	0,300
26	180	FTKNKVKKR	0,300
27	35	CPLKRQARK	0,300
28	459	GSGLGRDGK	0,300
29	191	KIIRQGPKI	0,270
30	483	GLGFPLPKS	0,210
Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)			
1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGS	SDS SLEEP SKDYR ENHNNNNKKOH SDSDDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151	ISNKRTMTQP	PEGCRDQDM	SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNDKME	CEEQKVSDLE MSESDSSSL S
251	EGRQGDDEQS	DWFYEKESGG	ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301	ILTGSPFLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPPIPGPVG
351	NKRMVHFSPD	SHHHDHWFSP	GARTEHDQHQ LLRDNRRAERG HKNKCSVRTA
401	SRQTSMLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451	LQNMGWTPGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501	GKSA		

TABLA 8A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A3
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	10
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 8B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	481	GLGLgFPLPK	360,000
2	189	KLKliRQGPK	18,000
3	71	SLEEpSKDYR	6,000

4	11	ALEEsSEQAR	6,000
5	380	QLLRDNRAER	6,000
6	175	YQYQeFTKNK	4,500
7	274	ITGVvPWWEK	4,500
8	133	TLRRrRKVKR	4,000
9	168	DMDSDRAYQY	3,600
10	173	RAYQyQEFTK	3,000
11	410	SLCTgDIKRR	3,000
12	156	TMTQpPEGCR	1,800
13	146	DLPQdISNKR	1,800
14	107	NLNNnVRGKR	1,800
15	475	AMQRpPKGLGL	1,200
16	63	CLSEgSDSSL	0,900
17	453	NMGWtPGSGL	0,900
18	230	LMSESDSSSL	0,900
19	3	ELVHDLVSAL	0,810
20	132	RTLRRRRKVK	0,750
21	180	FTKNkVKKRK	0,750
22	343	VPIPgVGnk	0,608
23	238	SLSStDAGLF	0,600
24	142	RMAVdLPQDI	0,600
25	257	DEQSdWFYEK	0,486
26	323	RLHGmSSKNT	0,450
27	301	ILTGsFPLMS	0-360
28	117	PLWHeSDFAV	6,300
29	493	SATTtPNAGK	0,300
30	177	YQEFKKNKVK	0,300

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYS ENHNNNNKKDH SDSODQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMO SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDME CEEQKVSDEL MSEDSSSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFEYKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301    ILTGsFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRRAERG HKNKCSVRTA
401    SRQTSMLHGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQF ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 9A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A_1101
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 9B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	326	GMSSKNIKK	2,400
2	174	AYQYQEFTK	1,200
3	494	ATTPNAGK	1,000
4	128	NVGNRTLRR	0,800
5	245	GUFTNDEGR	0,480
6	456	WTPGSGGLGR	0,400
7	258	EQSDWFYEK	0,360
8	283	KEDPTELDK	0,360
9	35	CPLKRQARK	0,300
10	133	TLRRRRKVK	0,200
11	176	QYQEFTKNK	0,200
12	157	MTQPPEGCR	0,200
13	40	QARKRRGRK	0,200
14	80	RENHNNNKK	0,180
15	410	SLCTGDIKR	0,160
16	210	ETNQTNKDK	0,150
17	146	DLPQDISNK	0,120
18	114	FVKKRKLKI	0,120

19	180	FTKNKVKKR	0,100
20	409	GSLCTGDIK	0,090
21	381	LLRDNRAER	0,080
22	441	ILENNIGNR	0,080
23	482	LGLGFPLPK	0,060
24	459	GSGLGRDGK	0,060
25	275	TGWPWWEK	0,060
26	139	KVKRMAVDL	0,060
27	208	SEETNQTNK	0,060
28	306	FPLMSHPSR	0,060
29	178	QEFTKNKVK	0,060
30	179	EFTKNKVKK	0,060

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLKRQ	ARKRRGRKRR	
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGS	SDS	SLEEPSKDYR	ENHNNNKKDH	SDSDDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVG	NRTLRRRRKV	KRMAVDLPQD	
151	ISNKRTMTQP	PEGCRDQDMO	SDRAYQYQEF	TKNKVKKRL	KIIRQGPKIQ	
201	DEGVVLESEE	TNQTNKDKME	CEEQKVDEL	MSESDSSSL	STDAGLFTND	
251	EGRQGDDEQS	DWFYKESGC	ACGITGVVPW	WEKEDPTELD	KNVPDPVFES	
301	ILTGSPPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK	NIKKSGGTPT	SMVPIPGPVG	
351	NKRMVHFSPD	SHHHDHWFSP	GARTEHDQHQ	LLRDNRAERG	HKKNC SVRTA	
401	SRQTSMLHGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM	
451	LQNMGWTPGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFPLPK	STSATTTPNA	
501	GKSA					

TABLA 10A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A_1101
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	10
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 10B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	173	RAYQyQEFTK	3,600
2	481	GLGLgFPLPK	2,400
3	132	RTLRRRRKVK	2,250
4	274	ITGVvPWWEK	2,000
5	39	RQARKRRGRK	1,800
6	189	KLKliRQGPK	1,200
7	175	YQYQeFTKNK	0,600
8	180	FTKNXVKKRK	0,500
9	177	YQEftKNKVK	0,300
10	343	VPIPgFVGNK	0,300
11	493	SATTtPNAGK	0,200
12	34	SCPLkRQARK	0,200
13	178	QEFTKNKVKK	0,120
14	78	DYREnHNNNK	0,120
15	380	QLLRdNRAER	0,120
16	22	GFAEtGDHSR	0,120
17	412	CTGDiKRRRK	0,100
18	133	TLRRrRKVKR	0,080
19	71	SLEEpSKDYR	0,080
20	325	HGMSsKNIKK	0,080
21	107	NLNNnVRGKR	0,080
22	11	ALEEsSEQAR	0,080
23	156	TMTQpPEGCR	0,080
24	182	KNKVkKRKLLK	0,060
25	216	KDKMeCEEQK	0,060
26	383	RDNRaERGHK	0,060
27	306	FPLMsHPSRR	0,060
28	128	NVGNrTLRRR	0,040
29	111	NVRGkRPLWH	0,040
30	311	HPSRrGFQAR	0,040
Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)			

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEOR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRHRGRKR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGS DS SLEEPSKDYR ENHNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKAPLWH ESDFAVDNVG NRTLARRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRMTQTP PEGCRQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSESDDSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPI SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHOHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRARER HKNKCSVRTA
401    SRQTSMLHGS LCTGDIKRAR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMORPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 11A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A24
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 11B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	316	GFQARLSRL	30,000
2	480	KGLGLGFPL	14,400
3	198	KIQDEGVVL	14,400
4	373	RTEHDQHQL	12,000
5	182	KNKVKNKL	8,800
6	139	KVKRMAVDL	8,000
7	263	FYEKJESGGA	7,500
8	78	DYRENNNN	7,200
9	300	SILTGSFPL	6,000
10	474	QAMQRPKGL	6,000

11	116	RPLWHESDF	6,000
12	110	NNVRGKRPL	6,000
13	231	MSESDSSSL	6,000
14	434	VGENAQFIL	6,000
15	64	LSEGSDDL	6,000
16	443	ENNIGNRML	6,000
17	4	LVHDLVSAL	5,760
18	29	HSRSISCPL	5,600
19	56	HPWETGHCL	4,800
20	90	HSDSDDQML	4,800
21	478	RPKGLGLGF	4,800
22	476	MQRPKGLGL	4,800
23	400	ASRQTSMLH	4,000
24	454	MGWTPGSGL	4,000
25	238	SLSSTDAGL	4,000
26	403	QTSMLHLSL	4,000
27	191	KIIRQGPKI	3,300
28	349	GNKRMVHF	3,000
29	15	SSEOARGGF	3,000
30	143	MAVDLPODI	2,592

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNVAHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKCKME CEEQKVDEL MSESDSSSL SSTDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSPPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHOHWFSP CARTEHDQHQ LLRDNRARG HKKNCSVRTA
401    SRQTSMLHLS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 12A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	A24

longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	10
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 12B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	297	VFESILTGSF	18,000
2	373	RTEHDQHQLL	14,400
3	176	QYQEFTKNKV	11,880
4	174	AYQYqEFTKN	9,900
5	432	GFVGeNAQPI	9,000
6	51	SYNVhHPWET	8,250
7	402	RQTSmHLGSL	8,000
8	315	RGFQaRLSRL	8,000
9	263	FYEKeSGGAC	7,500
10	3	ELVHdLVSAL	7,200
11	280	WWEKeDPTEL	6,600
12	237	SSLsTDAGL	6,000
13	299	ESILtGSFPL	6,000
14	475	AMQRpKGLGL	6,000
15	109	NNNVrGKRPL	6,000
16	230	LMSEsDSSSL	4,800
17	293	VPDPvFESIL	4,800
18	433	FVGEaAQPII	4,800
19	63	CLSEgSDSSSL	4,800
20	125	AVDNvGNRTL	4,000
21	99	VAKRrPSSNL	4,000
22	473	IQAMqRPKGL	4,000
23	453	NMGWtPGSGL	4,000
24	399	TASRqTSMHL	4,000

25	292	NVPDPVFESI	3,024
26	142	RMAVdLPQDI	2,880
27	437	NAOPILENNI	2,592
28	254	QGDDeQSDWF	2,400
29	14	ESSEqARGGF	2,400
30	323	RLHCmSSKNI	2,000

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLKRQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGSDS	SLEEPSKDYR	ENHNNNKKDH	SDSDDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVC	NRTLRRRRKV	KRMAVDLPQD
151	ISNKRMTMQP	PEGCRDQDM	SDRAYQYQEF	TKNKVKKRKL	KIIRQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNDKME	CEEQKVSDEL	MSESDDSSLS	STOAGLFTND
251	EGRQGDEQS	DWFYEKESGG	ACGITGVVPW	WEKEDPTELD	KNVPDPVFES
301	ILTGSFPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK	NIKKSGGTPT	SMVPIPGFVG
351	NKRMVHFSPD	SHHHDHWFSP	GARTEHDQHQ	LLRDNRAERG	HKKNC5VRTA
401	SRQTSMHLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTPGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFPLPK	STSATTTPNA
501	GKSA				

TABLA 13A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	B7
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 13B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	400	ASRQTSMLH	120,000
2	56	HPWETGHCL	80,000
3	476	MORPKCLGL	40,000

4	29	HSRSISCPL	40,000
5	474	QAMQRPKGL	36,000
6	4	LVHDLVSAL	20,000
7	139	KVKRMAVDL	20,000
8	100	AKPRPSSNL	18,000
9	423	APLPGPTTA	6,000
10	454	MGWTPGSGL	6,000
11	396	SVRTASRQT	5,00
12	196	GPKIQDEGV	4,000
13	182	KNKVKKRKL	4,000
14	110	NNVRGKRPL	4,000
15	198	KIQDEGVVL	4,000
16	403	QTSMHLGSL	4,000
17	238	SLSSTDAGL	4,000
18	285	DPTELDKNV	4,000
19	300	SILTGSFPL	4,000
20	347	PVGNKRMV	4,000
21	480	KGLGLGFPL	4,000
22	417	KRRRKAAPL	4,000
23	443	ENNIGNRML	4,000
24	313	SRRGFQARL	4,000
25	18	QARGGFAET	3,000
26	293	VPDPVFESI	2,400
27	295	DPVFESILT	2,000
28	311	HPSRRGFOA	2,000
29	433	FVGENAQPI	2,000
30	486	FPLPKSTSA	2,000

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMADVLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSEDL MSESDDSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGFVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRRAERG HKKNCVVRTA
401    SRQTSMHLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABLA 14A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	B7
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 14B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	318	QARLsRLHGM	30,000
2	293	VPDPvFESIL	24,000
3	345	IPGPvGNKRM	20,000
4	433	FVGE _n AQPIL	20,000
5	125	AVDNvGNRTL	18,000
6	99	VAKRrPSSNL	18,000
7	399	TASRqTSMHL	12,000
8	475	AMQRpKGLGL	12,000
9	453	NMGWtPGSGL	6,000
10	230	LMSEsDSSSL	4,000
11	473	IQAMqRPKGL	4,000
12	312	PSRRgFQARL	4,000
13	125	LPGPtTAGFV	4,000
14	103	RPSS _n LNNNV	4,000
15	109	NNNVrGKRPL	4,000
16	63	CLSEGSDSSSL	4,000
17	315	RCFQaRLSRL	4,000
18	237	SSLSS _t DAGL	4,000

19	416	IKRRrKAAPL	4,000
20	196	GPKIqDEGVV	4,000
21	299	ESILtGSFPL	4,000
22	402	RQTSmHLGSL	4,000
23	3	ELVHdLVSAL	4,000
24	147	LPQDiSNKRT	2,000
25	116	RPLWhESDFA	2,000
26	278	VPWWeKEDPT	2,000
27	488	LPKStSATT	2,000
28	292	NVPDpVFESI	2,000
29	45	RGRKrRSYNV	2,000
30	486	FPLPkSTSAT	2,000

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLKRQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGS	DS SLEEPSKDYR	ENHNNNKKDH	SDSDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVG	NRTLRRRRKV	KRMAVOLPQD
151	ISNKRTMTOP	PEGCRDQDMD	SORAYQYQEF	TKNKVKKRKL	KIIRQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNKOKME	CEEQKVSD	EL MSESOS	SLSDAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWFYKESGG	ACGITGVVPW	WEKEDPTELD	KNVPDPVFES
301	ILTGSFPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK	NIKKSGGTPT	SMVPIPGPVG
351	NKRMVHFSPD	SHHHDHWFSP	GARTEHDQHQ	LLRDNRARG	HKKNCVSRTA
401	SRQTSMHLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTPGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFPLPK	STSATTTPNA
501	GKSA				

TABLA 15A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	B_3501
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	9
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	496
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 15B

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	478	RPKGLGLGF	120,000
2	56	HPWETGCL	40,000
3	116	RPLWHESDF	40,000
4	425	LPGPTTAGF	20,000
5	334	KSGGTPTSM	20,000
6	400	ASROTSMHL	15,000
7	29	HSRSISCPL	15,000
8	196	GPKIQDEGV	12,000
9	285	DPTELDKNV	8,000
10	239	LSSTDAGLF	7,500
11	139	KVKRMAVDL	6,000
12	223	EQKVSELM	6,000
13	488	LPKSTSATT	6,000
14	198	KIQDEGVVL	6,000
15	182	KNKVKKRKL	6,000
16	309	MSHPSRRGF	5,000
17	360	DSHHHDHMF	5,000
18	50	RSYNVHHPW	5,000
19	103	RPSSNLNNN	4,000
20	468	GISEPIQAM	4,000
21	347	GPVGNKRMV	4,000
22	398	RTASRQTSM	4,000
23	295	DPVFESILT	3,000
24	476	MQRPKGLGL	3,000
25	74	EPSKDYREN	3,000
26	474	QAMQRPKGL	3,000
27	143	MAVDLPQDI	2,400
28	184	KVKKRKLKI	2,400
29	293	VPDPVFESI	2,400
30	90	HSDSDDQML	2,250
Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)			

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLKRQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGSDS	SLEEPSKDYR	ENHNNNKKDH	SOSDDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVG	NRTLRRRRKV	KRMAVDLPQD
151	ISNKRTHMQP	PEGCRDQOMD	SDRAYQYQEF	TKNKVKKRKL	KIIRQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNDKME	CEEQKVDEL	MSESDSSSL	STDAGLFTND
251	EGROGDDEQS	DWFYEKESGG	ACGITGVVPW	WEKEDPTELD	KNVPDPVFES
301	ILTGSPPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK	NIKSSGGTPT	SMVPIPGPVG
351	NKRMVHFSPD	SHHHDHWFSP	GARTEHDQHQ	LLRDNRARG	HKKNCVSRTA
401	SRQTSMLGSG	LCTGDIKRRR	KAAPLPGETT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTFGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFPLPK	STSATTTFNA
501	GKSA				

TABLA 16A

Resultados de búsqueda de motivos de péptidos de HLA	
Parámetros de usuario e información de la puntuación	
método seleccionado para limitar el número de resultados	número explícito
número de resultados buscados	30
tipo de molécula HLA seleccionado	B_3501
longitud seleccionada para subsecuencias a puntuar	10
modo de eco seleccionado para la secuencia de entrada	Y
formato de eco	líneas numeradas
longitud de la secuencia del péptido de entrada del usuario	504
número de puntuaciones de subsecuencias calculadas	495
número de subsecuencias de máxima puntuación mostradas en la tabla de puntuación de salida	30

TABLA 16B

5

Resultados de la puntuación			
Rango	Posición inicial	Listado de residuos de la subsecuencia	Puntuación (Estimación de la vida media de disociación de una molécula que contiene esta subsecuencia)
1	345	IPGPVGNKRM	40,000
2	70	SSLEePSKDY	20,000
3	196	GPKIQDEGVV	18,000
4	318	QARLsRLHGM	18,000
5	14	ESSEqARGGF	10,000
6	99	VAKRRPSSNL	9,000
7	103	RPSSnLNNNV	8,000
8	116	FLPLWhESDFA	6,000
9	488	LPKStSATT	6,000

10	293	VPDPvFESIL	6,000
11	299	ESILtGSFPL	5,000
12	237	SSLSSTDAGL	5,000
13	467	KGISePIQAM	4,000
14	56	HPWEtGHCLS	4,000
15	147	LPQDiSNKRT	4,000
16	425	LPGPtTAGFV	4,000
17	358	SPDShHHDHW	3,000
18	230	LMSEsDSSSL	3,000
19	253	RQGDdEQSDW	3,000
20	399	TASRqTSMHL	3,000
21	184	KVKKrKlKlI	2,400
22	445	NIGNrMLQNM	2,000
23	402	RQTSmHLGSL	2,000
24	300	SILTgSSFPLM	2,000
25	334	KSGGtPTSMV	2,000
26	433	FVGEaAQPIl	2,000
27	210	ETNOTNKDKM	2,000
28	63	CLSEgSDSSSL	2,000
29	486	FPLPkSTSAT	2,000
30	315	RGFQaLRLSRL	2,000

Secuencia peptídica del usuario sometida a eco (longitud = 504 residuos)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCEFLKRQ ARKRRGRKRRA
51     SYNvHHPWET GHCLSEGSQs SLEEPSKDyR ENHNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLARRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKYKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDkME CEEQKVSDel MSESdSSSLs STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEkESGG ACgITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVéES
301    ILTGsFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGmSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGpVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHq LLRDnRAERG HkKNCSvRTA
401    SRQTSMKLGS LCTGDIKRRR KAAPLPgPTT AGFVGEnAOP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

La invención proporciona:

1. Un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84P29, donde el polinucleótido se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 (a) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 2, donde T también puede ser U;
- (b) un polinucleótido que tiene la secuencia mostrada en la Figura 2, desde el residuo nucleotídico número 165 hasta el residuo nucleotídico número 1676, donde T también puede ser U;
- (c) un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84P2A9 cuya secuencia está codificada por los

cDNA contenidos en los plásmidos designados p129.1-US-P1 depositados en la American Type Culture Collection con Número de Acceso PTA-1151;

(d) un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84P2A9 que es al menos un 90% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2 a lo largo de toda su extensión; y

5 (e) un polinucleótido que es totalmente complementario con un polinucleótido de cualquiera de los (a)-(d).

2. Un polinucleótido del apartado 1 que codifica la secuencia polipeptídica que se muestra en la Figura 2.

3. Un fragmento de un polinucleótido del apartado 1 que comprende:

(a) un polinucleótido que comprende la secuencia que se muestra en la Figura 2, desde el residuo nucleotídico número 720 hasta el residuo nucleotídico número 1392;

10 (b) un polinucleótido que es un fragmento del polinucleótido de (a) que tiene al menos 10 bases de longitud; o

(c) un polinucleótido que hibrida selectivamente bajo condiciones restrictivas con el polinucleótido de (a) o (b).

4. Un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84P2A9, donde el polipéptido incluye una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en KKRK, NQTN, NCSV, TNY, SRR, SVR, GLFTND, GGACGI, GGTPTS, GTPTSM y GSLCTG.

15 5. Un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84P2A9, donde el polipéptido comprende un supermotivo HLA de clase I A1, A2, A3, A24, B7, B27, B58, B62 o un supermotivo HLA de clase II O'Sullivan DR o un supermotivo Alexander pan DR de unión a epítipo o un motivo HLA DR3.

6. Un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados 1-4 que está marcado con un marcador detectable.

7. Un vector de expresión recombinante que contiene un polinucleótido de uno cualquiera de los apartados 1-4.

20 8. Una célula huésped que contiene un vector de expresión del apartado 7.

9. Un procedimiento para producir una proteína relacionada con 84P2A9 que comprende cultivar una célula huésped del apartado 8 bajo condiciones suficientes para la producción del polipéptido.

10. El procedimiento del apartado 9, que comprende adicionalmente la recuperación de la proteína relacionada con 84F2A9 así producida.

25 11. Una proteína relacionada con 84F2A9 producida por el procedimiento del apartado 10.

12. Una proteína relacionada con 84F2A9 aislada.

13. La proteína relacionada con 84F2A9 del apartado 12, donde la proteína relacionada con 84F2A9 tiene la secuencia de aminoácidos que se muestra en la SEC. ID N°: 2.

30 14. Una proteína relacionada con 84F2A9 aislada que tiene una secuencia de aminoácidos que es exactamente igual que una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 2, donde T también puede ser U;

(b) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 2, desde el residuo nucleotídico número 165 hasta el residuo nucleotídico número 1676, donde T también puede ser U;

35 (c) un polinucleótido que codifica una proteína relacionada con 84F2A9 cuya secuencia está codificada por los cDNA contenidos en los plásmidos designados p129.1-US-P1 depositados en la American Type Culture Collection con Número de Acceso PTA-1151;

(d) un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84F2A9 que tiene la secuencia de aminoácidos que de muestra es la Figura 2; y

(e) un polinucleótido que es totalmente complementario con un polinucleótido de cualquiera de los (a)-(d).

40 15. Una proteína relacionada con 84F2A9 aislada del apartado 14 seleccionada del grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que tiene la secuencia que se muestra en la Figura 2, desde el residuo nucleotídico número 720 hasta el residuo nucleotídico número 1392;

(b) un polinucleótido que es un fragmento del polinucleótido de (a) que tiene al menos 10 bases de longitud;

o

(c) un polinucleótido que hibrida selectivamente bajo condiciones restrictivas a los polinucleótidos de (a) o (b).

16. Un anticuerpo o sus fragmentos que se unen inmuno-específicamente a una proteína relacionada con 84F2A9.

17. El anticuerpo o su fragmento del apartado 16, que es monoclonal.

5 18. Una proteína recombinante que comprende la región de unión a antígeno de un anticuerpo monoclonal del apartado 17.

19. El anticuerpo o su fragmento del apartado 17, que está marcado con un marcador detectable.

20. La proteína recombinante del apartado 18, que está marcada con un marcador detectable.

21. El fragmento de anticuerpo del apartado 16, que es un fragmento Fab, F(ab')₂ o Sfv.

10 22. El anticuerpo del apartado 16, que es un anticuerpo humano.

23. La proteína recombinante del apartado 20, que comprende residuos de regiones murinas de unión a antígenos y residuos de regiones constantes humanas.

24. Un animal transgénico no humano que produce un anticuerpo monoclonal del apartado 20.

25. Un hibridoma que produce un anticuerpo del apartado 22.

15 26. Un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla que comprende los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal del apartado 17.

27. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica para un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla que se une inmuno-específicamente a una proteína relacionada con 84F2A9.

20 28. Un ensayo para detectar la presencia de una proteína relacionada con 84F2A9 o un polinucleótido en una muestra biológica que comprende poner en contacto la muestra con un anticuerpo o polinucleótido, respectivamente, que se une específicamente a la proteína relacionada con 84F2A9 o al polinucleótido, respectivamente, y detectar la unión de la proteína relacionada con 84F2A9 o el polinucleótido, respectivamente, en dicha muestra.

25 29. Un ensayo para detectar la presencia de proteínas relacionadas con 84F2A9 o polinucleótidos, que comprende obtener una muestra, evaluar dicha muestra en presencia de una proteína relacionada con 84F2A9 o un polinucleótido, donde dichos medios de evaluación producen un resultado que indica la presencia o cantidad de proteína relacionada con 84F2A9 o de polinucleótido, respectivamente.

30. Un ensayo del apartado 29 para detectar la presencia de un polinucleótido 84F2A9 en una muestra biológica, que comprende:

30 (a) poner en contacto la muestra con un polinucleótido sonda que hibrida específicamente con un polinucleótido que codifica para una proteína relacionada con 84F2A9 que tiene una secuencia de aminoácidos que se muestra en la Figura 2; y

(b) detectar la presencia de un complejo de hibridación formado por la hibridación de la sonda con el polinucleótido 84F2A9 de la muestra, donde la presencia del complejo de hibridación indica la presencia de polinucleótidos 84F2A9 en la muestra.

35 31. Un ensayo para detectar la presencia de mRNA de 84F2A9 en una muestra biológica, que comprende:

(a) producir cDNA a partir de la muestra por transcripción inversa utilizando al menos un cebador,

(b) amplificar el cDNA así producido utilizando polinucleótidos de 84F2A9 como cebadores sentido y antisentido para amplificar los cDNA de 84F2A9 presentes;

(c) detectar la presencia de cDNA de 84F2A9 amplificado,

40 donde los polinucleótidos de 84F2A9 utilizados como sondas sentido y antisentido son capaces de amplificar el cDNA de 84F2A9 contenido en el plásmido depositado en la American Type Culture Collection con Número de Acceso PTA-1151.

32. un procedimiento del apartado 31 para monitorizar los productos génicos de 84F2A9 que comprende:

45 Determinar el estado de los productos génicos de 84F2A9 expresados por células en una muestra de tejido para ensayo de un individuo;

Comparar el estado así determinado con el estado de productos génicos de 84F2A9 en una muestra correspondiente normal; e

Identificar la presencia de productos génicos de 84F2A9 aberrantes en la muestra de ensayo en comparación con la muestra normal.

5 33. El procedimiento del apartado 32, donde los productos génicos de 84F2A9 se monitorizan mediante la comparación de las secuencias polinucleotídicas de los productos génicos de 84F2A9 de la muestra de tejido de ensayo con las secuencias polinucleotídicas de los productos génicos de 84F2A9 en una muestra correspondiente normal.

10 34. El procedimiento del apartado 32, donde los productos génicos de 84F2A9 se monitorizan mediante la comparación de los niveles de productos génicos de 84F2A9 en la muestra de tejido de ensayo con los niveles de productos génicos de 84F2A9 en la correspondiente muestra normal.

35. Un procedimiento de diagnóstico de la presencia de cáncer en un individuo que comprende:

(a) determinar el nivel de mRNA de 84F2A9 o proteína expresada en una muestra de ensayo obtenida del individuo; y

15 (b) comparar el nivel así determinado con el nivel de mRNA de 84F2A9 o proteína expresada en una muestra de tejido normal,

Donde la presencia elevada de mRNA de 84F2A9 o expresión de proteína en la muestra de ensayo en comparación con la muestra de tejido normal proporciona un indicio de la presencia del cáncer.

20 36. El procedimiento del apartado 35, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia y cáncer de próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovario, mama, páncreas, colon y pulmón, y las muestras de tejido de ensayo y normal se seleccionan del grupo que consiste en suero, sangre u orina y tejidos de la próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovaio, mama, páncreas, colon y pulmón.

25 37. El uso de una proteína relacionada con 84F2A9 o un fragmento inmunogénico suyo, un vector que comprende un polinucleótido que codifica para un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla que se une inmunoespecíficamente a una proteína relacionada con 84F2A9, un polinucleótido antisentido complementario a un polinucleótido que comprende secuencias codificantes de 84F2A9, o un ribozima capaz de escindir un polinucleótido que tiene secuencias codificantes de 84F2A9, para la preparación de una composición para tratar a un paciente con un cáncer que expresa 84F2A9.

38. El uso del apartado 37, donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en leucemia y cáncer de próstata, testículos, riñón, cerebro, hueso, piel, ovario, mama, páncreas, colon, linfocítico y pulmón.

30 39. Una composición farmacéutica que comprende una proteína relacionada con 84F2A9, un anticuerpo o un fragmento suyo que se une específicamente a una proteína relacionada con 84F2A9, un vector que comprende un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla que se une inmunoespecíficamente a una proteína relacionada con 84F2A9, un polinucleótido que comprende una secuencia codificante de proteína relacionada con 84F2A9, un polinucleótido antisentido complementario a un polinucleótido que tiene una secuencia codificante de 84F2A9 o un ribozima capaz de escindir un polinucleótido que tiene una secuencia codificante de 84F2A9 y, opcionalmente, un transportador fisiológicamente aceptable.

40 40. Un procedimiento para tratar a un paciente con un cáncer que expresa 84F2A9 que comprende administrar a dicho paciente un vector que comprende un polinucleótido que codifica para un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla que se une inmunoespecíficamente a una proteína relacionada con 84F2A9, de modo que el vector libera la secuencia codificante del anticuerpo monoclonal de cadena sencilla a las células cancerosas y el anticuerpo codificado de cadena sencilla se expresa intracelularmente en ellas.

41. Una composición de vacuna para el tratamiento de un cáncer que expresa 84F2A9 que comprende una porción inmunogénica de una proteína relacionada con 84F2A9 y un transportador fisiológicamente aceptable.

45 42. Un procedimiento para inhibir el desarrollo de un cáncer que expresa 84F2A9 en un paciente, que comprende administrarle al paciente una cantidad efectiva de composición de vacuna del apartado 41.

43. Un procedimiento para generar una respuesta inmune en un mamífero que comprende exponer el sistema inmune del mamífero a una porción inmunogénica de una proteína relacionada con 84F2A9 de la reivindicación 41, de modo que se genere una respuesta inmune frente a 84F2A9.

50 44. Un procedimiento para liberar un agente citotóxico a una célula que expresa 84F2A9 que comprende conjugar el agente citotóxico con un anticuerpo o un fragmento suyo del apartado 16 que se une específicamente a un epítipo 84F2A9 y exponer la célula al conjugado anticuerpo-agente.

45. Un procedimiento para inducir una respuesta inmune frente a una proteína 84F2A9, comprendiendo dicho método

do:

proporcionar un epítipo de proteína relacionada con 84F2A9;

poner en contacto el epítipo con una célula T o célula B del sistema inmune, a través de lo cuál la célula T o célula B del sistema inmune son inducidas.

5 46. El procedimiento del apartado 45, donde la célula del sistema inmune es una célula B, a través de lo cuál la célula B inducida genera anticuerpos que se unen específicamente a la proteína relacionada con 84F2A9.

47. El procedimiento del apartado 45, donde la célula del sistema inmune es una célula T que es una célula citotóxica (CTL), a través de lo cuál la CTL activada elimina a una célula autóloga que expresa proteína 84F2A9.

10 48. El procedimiento del apartado 45, donde la célula del sistema inmune es una célula T que es una célula T auxiliar (HTL), a través de lo cuál la HTL activada secreta citoquinas que facilitan la actividad citotóxica de una CTL o la actividad productora de anticuerpos de una célula B.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UroGenesys, Inc.

<120> 84P2A9: UNA PROTEÍNA ESPECÍFICA DE PRÓSTATA Y TESTÍCULOS ALTAMENTE EXPRESADA EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

5 <130> 129,1MOU1

<160> 28

<170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1

<211> 2345

10 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (163)...(1674)

15 <400> 1

```

attcggcacg aggtggaagt cgccggtgct gttgtagttg gagtctgttc acgggcctga      60
gcttcgagggc caggctcctg ggtgtcgtta atgttcgggg cgccggggcg ccaaccgata      120
ggagctccag cagccgggaa cagctggcat ttcagtagaa cc atg gag gag ctg      174
                               Met Glu Glu Leu
                               1

ggt cat gac ctt gtc tca gca ttg gaa gag agc tca gag caa gct cga      222
Val His Asp Leu Val Ser Ala Leu Glu Glu Ser Ser Glu Gln Ala Arg
  5                10                15                20

ggt gga ttt gct gaa aca gga gac cat tct cga agt ata tct tgc cct      270
Gly Gly Phe Ala Glu Thr Gly Asp His Ser Arg Ser Ile Ser Cys Pro
                25                30                35

ctg aaa cgc cag gca agg aaa agg aga ggg aga aaa cgg agg tcg tat      318
Leu Lys Arg Gln Ala Arg Lys Arg Arg Gly Arg Lys Arg Arg Ser Tyr
                40                45                50

aat gtg cat cac ccg tgg gag act ggt cac tgc tta agt gaa ggc tct      366
Asn Val His His Pro Trp Glu Thr Gly His Cys Leu Ser Glu Gly Ser
                55                60                65

gat tct agt tta gaa gaa cca agc aag gac tat aga gag aat cac aat      414
Asp Ser Ser Leu Glu Glu Pro Ser Lys Asp Tyr Arg Glu Asn His Asn
                70                75                80

aat aat aaa aaa gat cac agt gac tct gat gac caa atg tta gta gca      462
Asn Asn Lys Lys Asp His Ser Asp Ser Asp Asp Gln Met Leu Val Ala
  85                90                95                100

```

aag cgc agg ccg tca tca aac tta aat aat aat gtt cga ggg aaa aga	510
Lys Arg Arg Pro Ser Ser Asn Leu Asn Asn Asn Val Arg Gly Lys Arg	
105 110 115	
cct cta tgg cat gag tct gat ttt gct gtg gac aat gtt ggg aat aga	558
Pro Leu Trp His Glu Ser Asp Phe Ala Val Asp Asn Val Gly Asn Arg	
120 125 130	
act ctg cgc agg agg aga aag gta aaa cgc atg gca gta gat ctc cca	606
Thr Leu Arg Arg Arg Arg Lys Val Lys Arg Met Ala Val Asp Leu Pro	
135 140 145	
cag gac atc tct aac aaa cgg aca atg acc cag cca cct gag ggt tgt	654
Gln Asp Ile Ser Asn Lys Arg Thr Met Thr Gln Pro Pro Glu Gly Cys	
150 155 160	
aga gat cag gac atg gac agt gat aga gcc tac cag tat caa gaa ttt	702
Arg Asp Gln Asp Met Asp Ser Asp Arg Ala Tyr Gln Tyr Gln Glu Phe	
165 170 175 180	
acc aag aac aaa gtc aaa aaa aga aag ttg aaa ata atc aga caa gga	750
Thr Lys Asn Lys Val Lys Lys Arg Lys Leu Lys Ile Ile Arg Gln Gly	
185 190 195	
cca aaa atc caa gat gaa gga gta gtt tta gaa agt gag gaa acg aac	798
Pro Lys Ile Gln Asp Glu Gly Val Val Leu Glu Ser Glu Glu Thr Asn	
200 205 210	
cag acc aat aag gac aaa atg gaa tgt gaa gag caa aaa gtc tca gat	846
Gln Thr Asn Lys Asp Lys Met Glu Cys Glu Glu Gln Lys Val Ser Asp	
215 220 225	
gag ctc atg agt gaa agt gat tcc agc agt ctc agc agc act gat gct	894
Glu Leu Met Ser Glu Ser Asp Ser Ser Ser Leu Ser Ser Thr Asp Ala	
230 235 240	
gga ttg ttt acc aat gat gag gga aga caa ggt gat gat gaa cag agt	942
Gly Leu Phe Thr Asn Asp Glu Gly Arg Gln Gly Asp Asp Glu Gln Ser	
245 250 255 260	
gac tgg ttc tac gaa aag gaa tca ggt gga gca tgt ggt atc act gga	990
Asp Trp Phe Tyr Glu Lys Glu Ser Gly Gly Ala Cys Gly Ile Thr Gly	
265 270 275	
gtt gtg ccc tgg tgg gaa aag gaa gat cct act gag cta gac aaa aat	1038
Val Val Pro Trp Trp Glu Lys Glu Asp Pro Thr Glu Leu Asp Lys Asn	
280 285 290	
gta cca gat cct gtc ttt gaa agt atc tta act ggt tct ttt ccc ctt	1086
Val Pro Asp Pro Val Phe Glu Ser Ile Leu Thr Gly Ser Phe Pro Leu	
295 300 305	
atg tca cac cca agc aga aga ggt ttc caa gct aga ctc agt cgc ctt	1134
Met Ser His Pro Ser Arg Arg Gly Phe Gln Ala Arg Leu Ser Arg Leu	
310 315 320	

cat gga atg tct tca aag aat att aaa aaa tct gga ggg act cca act	1182
His Gly Met Ser Ser Lys Asn Ile Lys Lys Ser Gly Gly Thr Pro Thr	
325 330 335 340	
tca atg gta ccc att cct ggc cca gtg ggt aac aag aga atg gtt cat	1230
Ser Met Val Pro Ile Pro Gly Pro Val Gly Asn Lys Arg Met Val His	
345 350 355	
ttt tcc ccg gat tct cat cac cat gac cat tgg ttt agc cct ggg gct	1278
Phe Ser Pro Asp Ser His His His Asp His Trp Phe Ser Pro Gly Ala	
360 365 370	
agg aca gag cat gac cag cat cag ctt ctg aga gat aat cga gct gaa	1326
Arg Thr Glu His Asp Gln His Gln Leu Leu Arg Asp Asn Arg Ala Glu	
375 380 385	
aga gga cac aag aaa aat tgt tct gtg aga aca gcc agc agg caa aca	1374
Arg Gly His Lys Lys Asn Cys Ser Val Arg Thr Ala Ser Arg Gln Thr	
390 395 400	
agc atg cat tta gga tcc tta tgc acg gga gat atc aaa cgg aga aga	1422
Ser Met His Leu Gly Ser Leu Cys Thr Gly Asp Ile Lys Arg Arg Arg	
405 410 415 420	
aaa gct gca cct ttg cct gga cct act act gca gga ttt gta ggt gaa	1470
Lys Ala Ala Pro Leu Pro Gly Pro Thr Thr Ala Gly Phe Val Gly Glu	
425 430 435	
aat gcc cag cca atc cta gaa aat aat att gga aac cga atg ctt cag	1518
Asn Ala Gln Pro Ile Leu Glu Asn Asn Ile Gly Asn Arg Met Leu Gln	
440 445 450	
aat atg ggc tgg acg cct ggg tca ggc ctt gga cga gat ggc aag ggg	1566
Asn Met Gly Trp Thr Pro Gly Ser Gly Leu Gly Arg Asp Gly Lys Gly	
455 460 465	
atc tct gag cca att caa gcc atg cag agg cca aag gga tta gga ctt	1614
Ile Ser Glu Pro Ile Gln Ala Met Gln Arg Pro Lys Gly Leu Gly Leu	
470 475 480	
gga ttt cct cta cca aaa agt act tcc gca act act acc ccc aat gca	1662
Gly Phe Pro Leu Pro Lys Ser Thr Ser Ala Thr Thr Thr Pro Asn Ala	
485 490 495 500	
gga aaa tcc gcc taagaaaagc aaagaagaaa tgttttacag actttattca	1714
Gly Lys Ser Ala	
ctatgtccca ttgttctaaa atgataacat gacttctgtt tttgaagcaa aaatctacat	1774
tgctctcaaac acatcactct agcttcctta ctgcatacag tcttgccata gtgagagaaa	1834
tgggatttca tcacaattca tgggtgctaaa atgaaaacct ctgcacttta atttttttca	1894
gtaatttcca gctatttcta ggtataaaga gcagctcggt tctcttattt attttagtct	1954
catgtgtcaa tactttccga tgctttgctt aattcatgta tgtgtgcagt gctgcaatgc	2014
ccagacaaac gtgagcacac ccaccagttt ctaaaatgga atagacagga aaagattgtg	2074

<210> 2

```

ttttatatca tccctatcta ttgtaaccca aaagacctac catcgcatca gtgaagtcgg 2134
aacacatctt tgtttgaaag gcttgtaaat ttcataattcc ttgaattggc ttcttggtga 2194
ggattttctg acagagtgat acccatcaat tttctatcct tagacaatgt agtgtgaagt 2254
tcacagttga caaacaacaa ttaatgtttc ccttggtatgt ttgacaaaa ataaacctca 2314
tcgttggtat caccaaaaaa aaaaaaaaaa a 2345

```

<211> 504

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 2

```

Met Glu Glu Leu Val His Asp Leu Val Ser Ala Leu Glu Glu Ser Ser
 1      5      10      15
Glu Gln Ala Arg Gly Gly Phe Ala Glu Thr Gly Asp His Ser Arg Ser
 20      25      30
Ile Ser Cys Pro Leu Lys Arg Gln Ala Arg Lys Arg Arg Gly Arg Lys
 35      40      45
Arg Arg Ser Tyr Asn Val His His Pro Trp Glu Thr Gly His Cys Leu
 50      55      60
Ser Glu Gly Ser Asp Ser Ser Leu Glu Glu Pro Ser Lys Asp Tyr Arg
 65      70      75      80
Glu Asn His Asn Asn Asn Lys Lys Asp His Ser Asp Ser Asp Asp Gln
 85      90      95
Met Leu Val Ala Lys Arg Arg Pro Ser Ser Asn Leu Asn Asn Asn Val
100      105      110
Arg Gly Lys Arg Pro Leu Trp His Glu Ser Asp Phe Ala Val Asp Asn
115      120      125
Val Gly Asn Arg Thr Leu Arg Arg Arg Arg Lys Val Lys Arg Met Ala
130      135      140
Val Asp Leu Pro Gln Asp Ile Ser Asn Lys Arg Thr Met Thr Gln Pro
145      150      155      160
Pro Glu Gly Cys Arg Asp Gln Asp Met Asp Ser Asp Arg Ala Tyr Gln
165      170      175
Tyr Gln Glu Phe Thr Lys Asn Lys Val Lys Lys Arg Lys Leu Lys Ile
180      185      190
Ile Arg Gln Gly Pro Lys Ile Gln Asp Glu Gly Val Val Leu Glu Ser
195      200      205
Glu Glu Thr Asn Gln Thr Asn Lys Asp Lys Met Glu Cys Glu Glu Gln
210      215      220
Lys Val Ser Asp Glu Leu Met Ser Glu Ser Asp Ser Ser Ser Leu Ser
225      230      235      240
Ser Thr Asp Ala Gly Leu Phe Thr Asn Asp Glu Gly Arg Gln Gly Asp
245      250      255
Asp Glu Gln Ser Asp Trp Phe Tyr Glu Lys Glu Ser Gly Gly Ala Cys
260      265      270
Gly Ile Thr Gly Val Val Pro Trp Trp Glu Lys Glu Asp Pro Thr Glu
275      280      285
Leu Asp Lys Asn Val Pro Asp Pro Val Phe Glu Ser Ile Leu Thr Gly
290      295      300
Ser Phe Pro Leu Met Ser His Pro Ser Arg Arg Gly Phe Gln Ala Arg
305      310      315      320
Leu Ser Arg Leu His Gly Met Ser Ser Lys Asn Ile Lys Lys Ser Gly
325      330      335
Gly Thr Pro Thr Ser Met Val Pro Ile Pro Gly Pro Val Gly Asn Lys

```

340								345				350			
Arg	Met	Val	His	Phe	Ser	Pro	Asp	Ser	His	His	His	Asp	His	Trp	Phe
355								360				365			
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Thr	Glu	His	Asp	Gln	His	Gln	Leu	Leu	Arg	Asp
370								375				380			
Asn	Arg	Ala	Glu	Arg	Gly	His	Lys	Lys	Asn	Cys	Ser	Val	Arg	Thr	Ala
385								390				395			
Ser	Arg	Gln	Thr	Ser	Met	His	Leu	Gly	Ser	Leu	Cys	Thr	Gly	Asp	Ile
405								410				415			
Lys	Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro	Thr	Thr	Ala	Gly
420								425				430			
Phe	Val	Gly	Glu	Asn	Ala	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Asn	Asn	Ile	Gly	Asn
435								440				445			
Arg	Met	Leu	Gln	Asn	Met	Gly	Trp	Thr	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg
450								455				460			
Asp	Gly	Lys	Gly	Ile	Ser	Glu	Pro	Ile	Gln	Ala	Met	Gln	Arg	Pro	Lys
465								470				475			
Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Ser	Ala	Thr	Thr
485								490				495			
Thr	Pro	Asn	Ala	Gly	Lys	Ser	Ala								
500															

<210> 3

<211> 425

<212> DNA

5 <213> Homo Sapiens

<400> 3

```

gatcaagcct tttttttttt tttttttttt ttttggataa caacgatgag gtttattttt
60
gtcaaaacat ccaagggaaa cattaattgt tgtttgtcaa ctgtgaactt cacactacat
120
tgtctaagga tagaaaattg atgggtatca ctctgtcaga aaatcctcac caagaagcca
180
attcaaggaa tatgaaattg acaagccttt caaacaaaga tgtgttcgga cttcactgat
240
gcgatggtag gtcttttggg ttacaataga tagggatgat ataaaacaca atcttttctt
300
gtctattcca ttttagaaac tgggtgggtgt gtcacgttt gtctgggcat tgcagcactg
360
cacacatata tgaattaagc aaagcatcgg aaagtattga cacatgagac taaaataaat
420
aagag
425

```

$\langle 210 \rangle$ 4

 $\langle 211 \rangle$ 7

10 <212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 4

aacatgg

7

<210> 5

<211> 320

<212> PRT

5 <213> Homo Sapiens

<400> 5

```

Met Asp Glu Leu Val His Asp Leu Ala Ser Ala Leu Glu Gln Thr Ser
 1          5          10          15
Glu Gln Asn Lys Leu Gly Glu Leu Trp Glu Glu Met Ala Leu Ser Pro
          20          25          30
Arg Gln Gln Arg Arg Gln Leu Arg Lys Arg Arg Gly Arg Lys Arg Arg
          35          40          45
Ser Asp Phe Thr His Leu Ala Glu His Thr Cys Cys Tyr Ser Glu Ala
          50          55          60
Ser Glu Ser Ser Leu Asp Glu Ala Thr Lys Asp Cys Arg Glu Val Ala
65          70          75          80
Pro Val Thr Asn Phe Ser Asp Ser Asp Asp Thr Met Val Ala Lys Arg
          85          90          95
His Pro Ala Leu Asn Ala Ile Val Lys Ser Lys Gln His Ser Trp His
          100          105          110
Glu Ser Asp Ser Phe Thr Glu Asn Ala Pro Cys Arg Pro Leu Arg Arg
          115          120          125
Arg Arg Lys Val Lys Arg Val Thr Ser Glu Val Ala Ala Ser Leu Gln
          130          135          140
Gln Lys Leu Lys Val Ser Asp Trp Ser Tyr Glu Arg Gly Cys Arg Phe
145          150          155          160
Lys Ser Ala Lys Lys Gln Arg Leu Ser Arg Trp Lys Glu Asn Thr Pro
          165          170          175
Trp Thr Ser Ser Gly His Gly Leu Cys Glu Ser Ala Glu Asn Arg Thr
          180          185          190
Phe Leu Ser Lys Thr Gly Arg Lys Glu Arg Met Glu Cys Glu Thr Asp
          195          200          205
Glu Gln Lys Gln Gly Ser Asp Glu Asn Met Ser Glu Cys Glu Thr Ser
          210          215          220
Ser Val Cys Ser Ser Ser Asp Thr Gly Leu Phe Thr Asn Asp Glu Gly
225          230          235          240
Arg Gln Gly Asp Asp Glu Gln Ser Asp Trp Phe Tyr Glu Gly Glu Cys
          245          250          255
Val Pro Gly Phe Thr Val Pro Asn Leu Leu Pro Lys Trp Ala Pro Asp
          260          265          270
His Cys Ser Glu Val Glu Arg Met Asp Ser Gly Leu Asp Lys Phe Ser
          275          280          285
Asp Ser Thr Phe Leu Leu Pro Ser Arg Pro Ala Gln Arg Gly Tyr His
          290          295          300
Thr Arg Leu Asn Arg Leu Pro Gly Ala Ala Ala Arg Cys Leu Arg Lys
305          310          315          320

```

<210> 6

10 <211> 42

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 6

```

Ser Asn Ile Gly Asn Lys Met Leu Gln Ala Met Gly Trp Arg Glu Gly
 1           5           10          15
Ser Gly Leu Gly Arg Lys Cys Gln Gly Ile Thr Ala Pro Ile Glu Ala

                20                25                30
          Gln Val Arg Leu Lys Gly Ala Gly Leu Gly
                35                40

```

<210> 7

<211> 44

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 7

```

ttttgatcaa gctttttttt tttttttttt tttttttttt tttt
44

```

10

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Adaptador

<400> 8

```

ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc ag
42

```

<210> 9

20 <211> 12

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Adaptador

25 <400> 9

ggcccgctcct ag
12

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Adaptador

<400> 10

gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcggccgag
40

10

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Adaptador

<400> 11

cggtcctag
10

20 <210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Cebador

<400> 12

ctaatacgac tcactatagg gc
22

<210> 13

<211> 22

30 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 13

tcgagcggcc gcccgggcag ga
22

5 <210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Cebador

<400> 14

agcgtggtcg cggccgagga
20

<210> 15

<211> 25

15 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 15

atategccgc gtcgtcgtc gacaa
25

20

<210> 16

<211> 26

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> Cebador

<400> 16

agccacacgc agtcattgt agaagg
26

<210> 17

30 <211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebador

<400> 17

gacttcactg atgcgatggt aggt
24

5

<210> 18

<211> 24

<212> DNA

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Cebador

<400> 18

gtcaatactt tccgatgctt tgct
24

<210> 19

15

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 19

Ser Ile Leu Thr Gly Ser Phe Pro Leu
1 5

20

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 20

Arg Met Leu Gln Asn Met Gly Trp Thr

25

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

Leu Val His Asp Leu Val Ser Ala Leu
1 5

<210> 22

<211> 9

5 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

Ser Leu Ser Ser Thr Asp Ala Gly Leu
1 5

<210> 23

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 23

Lys Ile Gln Asp Glu Gly Val Val Leu
1 5

15 <210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 24

Phe Val Gly Glu Asn Ala Gln Pro Ile
1 5

20

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

25 <400> 25

Ile Leu Thr Gly Ser Phe Pro Leu Met
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

Lys Met Glu Cys Glu Glu Gln Lys Val
1 5

5 <400> 26

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

10 <400> 27

Lys Gly Leu Gly Leu Gly Phe Pro Leu
1 5

<210> 28

<211> 9

15 <212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 28

Gly Leu Gly Arg Asp Gly Lys Gly Ile
1 5
1

REIVINDICACIONES

1. El uso de un vector viral que comprende el polinucleótido de secuencia SEC. ID N°: 1 para la preparación de un medicamento para originar una respuesta inmune frente a la proteína de SEC ID N°: 2.
2. El uso de la reivindicación 1, en el que el vector viral se deriva de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la vacuna, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus de la gripe, virus de la polio, virus adenoasociados, lentivirus y virus sindbus.
3. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la respuesta inmune induce activación de las células B que tiene como resultado la producción de anticuerpos, donde los anticuerpos producidos se unen específicamente a la proteína de SEC ID N°:2.
4. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la respuesta inmune es la activación de una célula T que es una célula citotóxica (CTL), a través de lo cuál la CTL activada elimina una célula autóloga que expresa la proteína de SEC ID N°: 2.
5. El uso de las reivindicaciones 1 o 2, en el que la respuesta inmune es la activación de una célula T que es una célula T auxiliar (HTL), a través de lo cuál la HTL activada secreta citoquinas que facilitan la actividad citotóxica de una CTL o la actividad productora de anticuerpos de una célula B.
6. Una composición farmacéutica que comprende un vector viral que comprende el polinucleótido de SEC ID N°: 1 para la preparación de un medicamento para generar una respuesta inmune frente a la proteína de SEC ID N°: 2.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que el vector viral deriva de un virus seleccionado del grupo que consiste en virus de la vacuna, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del canario, adenovirus, virus de la gripe, virus de la polio, virus adenoasociados, lentivirus y virus sindbus.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en el que el vector viral deriva del virus de la viruela del canario.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en el que el vector viral deriva del adenovirus.

FIG. 1

GATCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATAACAACGATGAGGTTTATTTTTGTCAAAACA
TCCAAGGGAAACATTAATTGTTGTTTGTCAACTGTGAACTTCACACTACATTGTCTAAGGATAGAAAAT
TGATGGGTATCACTCTGTCAGAAAATCCTCACCAAGAAGCCAATTCAAGGAATATGAAATTGACAAGCC
TTTCAAACAAAGATGTGTTTCGGACTTCACTGATGCGATGGTAGGTCTTTTGGGTTACAATAGATAGGGA
TGATATAAAACACAATCTTTTCCTGTCTATTCCATTTTAGAAACTGGTGGGTGTGCTCACGTTTGTCTG
GGCATTGCAGCACTGCACACATACATGAATTAAGCAAAGCATCGGAAAGTATTGACACATGAGACTAAA
ATAAATAAGAG

FIG. 2A

[illegible]

FIG. 2B

		713			722			731			740			749			758
ACC	AAG	AAC	AAA	GTC	AAA	AAA	AGA	AAG	TTG	AAA	ATA	ATC	AGA	CAA	GGA	CCA	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	K	N	K	V	K	K	R	K	L	K	I	I	R	Q	G	P	K
		767			776			785			794			803			812
ATC	CAA	GAT	GAA	GGA	GTA	GTT	TTA	GAA	AGT	GAG	GAA	ACG	AAC	CAG	ACC	AAT	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	Q	D	E	G	V	V	L	E	S	E	E	T	N	Q	T	N	K
		821			830			839			848			857			866
GAC	AAA	ATG	GAA	TGT	GAA	GAG	CAA	AAA	GTC	TCA	GAT	GAG	CTC	ATG	AGT	GAA	AGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	K	M	E	C	E	E	Q	K	V	S	D	E	L	M	S	E	S
		875			884			893			902			911			920
GAT	TCC	AGC	AGT	CTC	AGC	AGC	ACT	GAT	GCT	GGA	TTG	TTT	ACC	AAT	GAT	GAG	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	S	S	S	L	S	S	T	D	A	G	L	F	T	N	D	E	G
		929			938			947			956			965			974
AGA	CAA	GGT	GAT	GAT	GAA	CAG	AGT	GAC	TGG	TTC	TAC	GAA	AAG	GAA	TCA	GGT	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	Q	G	D	D	E	Q	S	D	W	F	Y	E	K	E	S	G	G
		983			992			1001			1010			1019			1028
GCA	TGT	GGT	ATC	ACT	GGA	GTT	GTG	CCC	TGG	TGG	GAA	AAG	GAA	GAT	CCT	ACT	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	C	G	I	T	G	V	V	P	W	W	E	K	E	D	P	T	E
		1037			1046			1055			1064			1073			1082
CTA	GAC	AAA	AAT	GTA	CCA	GAT	CCT	GTC	TTT	GAA	AGT	ATC	TTA	ACT	GGT	TCT	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	D	K	N	V	P	D	P	V	F	E	S	I	L	T	G	S	F
		1091			1100			1109			1118			1127			1136
CCC	CTT	ATG	TCA	CAC	CCA	AGC	AGA	AGA	GGT	TTC	CAA	GCT	AGA	CTC	AGT	CGC	CTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	L	M	S	H	P	S	R	R	G	F	Q	A	R	L	S	R	L
		1145			1154			1163			1172			1181			1190
CAT	GGA	ATG	TCT	TCA	AAG	AAT	ATT	AAA	AAA	TCT	GGA	GGG	ACT	CCA	ACT	TCA	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	G	M	S	S	K	N	I	K	K	S	G	G	T	P	T	S	M
		1199			1208			1217			1226			1235			1244
GTA	CCC	ATT	CCT	GGC	CCA	GTG	GGT	AAC	AAG	AGA	ATG	GTT	CAT	TTT	TCC	CCG	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	P	I	P	G	P	V	G	N	K	R	M	V	H	F	S	P	D
		1253			1262			1271			1280			1289			1298
TCT	CAT	CAC	CAT	GAC	CAT	TGG	TTT	AGC	CCT	GGG	GCT	AGG	ACA	GAG	CAT	GAC	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	H	H	H	D	H	W	F	S	P	G	A	R	T	E	H	D	Q
		1307			1316			1325			1334			1343			1352
CAT	CAG	CTT	CTG	AGA	GAT	AAT	CGA	GCT	GAA	AGA	GGA	CAC	AAG	AAA	AAT	TGT	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	Q	L	L	R	D	N	R	A	E	R	G	H	K	K	N	C	S

FIG. 2C

		1361		1370		1379		1388		1397		1406					
GTG	AGA	ACA	GCC	AGC	AGG	CAA	ACA	AGC	ATG	CAT	TTA	GGA	TCC	TTA	TGC	ACG	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	R	T	A	S	R	Q	T	S	M	H	L	G	S	L	C	T	G
		1415		1424		1433		1442		1451		1460					
GAT	ATC	AAA	CGG	AGA	AGA	AAA	GCT	GCA	CCT	TTG	CCT	GGA	CCT	ACT	ACT	GCA	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	I	K	R	R	R	K	A	A	P	L	P	G	P	T	T	A	G
		1469		1478		1487		1496		1505		1514					
TTT	GTA	GGT	GAA	AAT	GCC	CAG	CCA	ATC	CTA	GAA	AAT	AAT	ATT	GGA	AAC	CGA	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F	V	G	E	N	A	Q	P	I	L	E	N	N	I	G	N	R	M
		1523		1532		1541		1550		1559		1568					
CTT	CAG	AAT	ATG	GGC	TGG	ACG	CCT	GGG	TCA	GGC	CTT	GGA	CGA	GAT	GGC	AAG	GGG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	Q	N	M	G	W	T	P	G	S	G	L	G	R	D	G	K	G
		1577		1586		1595		1604		1613		1622					
ATC	TCT	GAG	CCA	ATT	CAA	GCC	ATG	CAG	AGG	CCA	AAG	GGA	TTA	GGA	CTT	GGA	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	S	E	P	I	Q	A	M	Q	R	P	K	G	L	G	L	G	F
		1631		1640		1649		1658		1667		1676					
CCT	CTA	CCA	AAA	AGT	ACT	TCC	GCA	ACT	ACT	ACC	CCC	AAT	GCA	GGA	AAA	TCC	GCC
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	L	P	K	S	T	S	A	T	T	T	P	N	A	G	K	S	A
		1685		1694		1703		1712		1721		1730					
TAA	GAA	AAG	CAA	AGA	AGA	AAT	GTT	TTA	CAG	ACT	TTA	TTC	ACT	ATG	TCC	CAT	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
*																	
		1739		1748		1757		1766		1775		1784					
TCT	AAA	ATG	ATA	ACA	TGA	CTT	CTG	TTT	TTG	AAG	CAA	AAA	TCT	ACA	TTG	CCT	CAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		1793		1802		1811		1820		1829		1838					
ACA	CAT	CAC	TCT	AGC	TTC	CTT	ACT	GCA	TAC	AGT	CCT	GCC	ATA	GTG	AGA	GAA	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		1847		1856		1865		1874		1883		1892					
GGA	TTT	CAT	CAC	AAT	TCA	TGG	TGC	TAA	AAT	GAA	AAC	CTC	TGC	ACT	TTA	ATT	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		1901		1910		1919		1928		1937		1946					
TTC	AGT	AAT	TTC	CAG	CTA	TTT	CTA	GGT	ATA	AAG	AGC	AGC	TCG	TTT	CTC	TTA	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		1955		1964		1973		1982		1991		2000					
ATT	TTA	GTC	TCA	TGT	GTC	AAT	ACT	TTC	CGA	TGC	TTT	GCT	TAA	TTC	ATG	TAT	GTG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		2009		2018		2027		2036		2045		2054					
TGC	AGT	GCT	GCA	ATG	CCC	AGA	CAA	ACG	TGA	GCA	CAC	CCA	CCA	GTT	TCT	AAA	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		2063		2072		2081		2090		2099		2108					
GAA	TAG	ACA	GGA	AAA	GAT	TGT	GTT	TTA	TAT	CAT	CCC	TAT	CTA	TTG	TAA	CCC	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
		2117		2126		2135		2144		2153		2162					
AGA	CCT	ACC	ATC	GCA	TCA	GTG	AAG	TCC	GAA	CAC	ATC	TTT	GTT	TGA	AAG	GCT	TGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

FIG. 2D

	2171		2180		2189		2198		2207		2216						
CAA	TTT	CAT	ATT	CCT	TGA	ATT	GGC	TTC	TTG	GTG	AGG	ATT	TTC	TGA	CAG	AGT	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	2225		2234		2243		2252		2261		2270						
ACC	CAT	CAA	TTT	TCT	ATC	CTT	AGA	CAA	TGT	AGT	GTG	AAG	TTC	ACA	GTT	GAC	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	2279		2288		2297		2306		2315		2324						
CAA	CAA	TTA	ATG	TTT	CCC	TTG	GAT	GTT	TTG	ACA	AAA	ATA	AAC	CTC	ATC	GTT	GTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
	2333		2342														
ATC	ACC	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AA	3'									
---	---	---	---	---	---	---	---	---									

FIG. 3A

```

4 MDLVHDLVLSALEQTSEQNKLIG--ELWEEMALSPRQRRQLRKRRGRKRS-DFTHLAEH
1 MEELVHDLVLSALEESSEQARCGFAETGDHSRSISCPLKRQARKRRGRKRRSYNVHHPWET
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
61 TCCYSEASESSLDEATKDCREVAPVT--NFSDSDDTM-VAKRHPA--LNAIVKSKQHSWH
61 GHCLSEGSDSSLLEEPSKDYRENHNNKKDHSDSDQMLVAKRRPSSNLNNVNRGRPLWH
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
116 ESDSFTENAPCRPLRRRRKVVRTSEVAASLQQLKLVSDWSYERGCRFKSAKKQLRSRWK
121 ESDFAVDNVGNRTLRRRRKVKRMAVDLPQDISNKRTMT--QPPEGCRDQMDSDRAYQYQ
  *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
176 ENTPWTSSGH-----GLCESAENRTFLSKTGRKERMECETDEQKQGSDENMSECETSS
179 EFTKNKVKRKLKIIIRQGPKIQDEGVVLESEETNQTKDKMECEBQKVSDELMSESDESSS
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
229 VCSSSDTGLFTNDEGRQGDDEQSDWFYEGECVPGFTVPNLLPKWAPDHCSEVERM--DSG
239 L-SSTDAGLFTNDEGRQGDDEQSDWFYEKESGGACGITGVVPWWEKEDPTELDKNVPDPV
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
287 LDKFSDSTFLLPSRPAQRGYHTRLNRLPGAAARCLRK
298 FESILTGSPFLMSPRRRGFQARLSRLHGMSSKNIKK
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIG. 3B

744 SNIGNKMLQAMGWREGSLGRKCGITAPIEAQVRLKGAGLG
444 NNIGNRMLQNMGWTPGSGSLGRDGKGISEPIQAMQRPKGLGLG

FIG. 4A

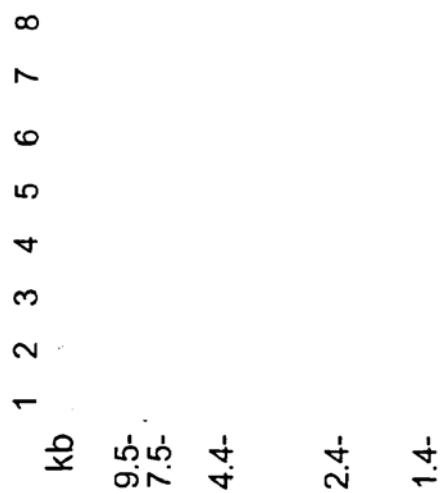


FIG. 4B

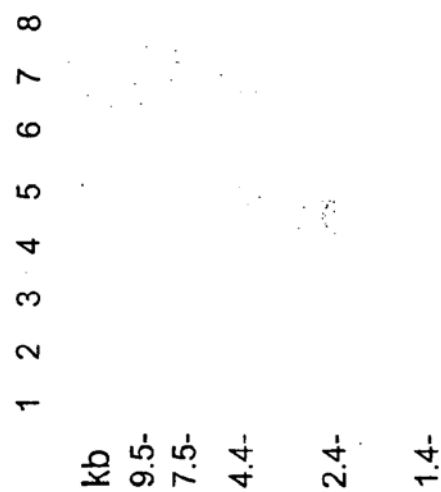
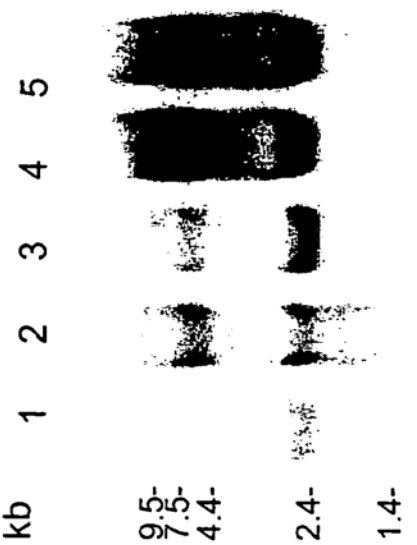


FIG. 4C



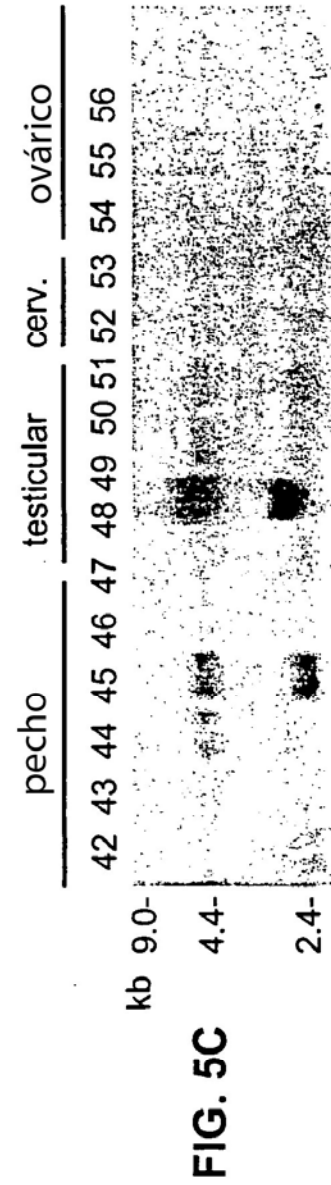
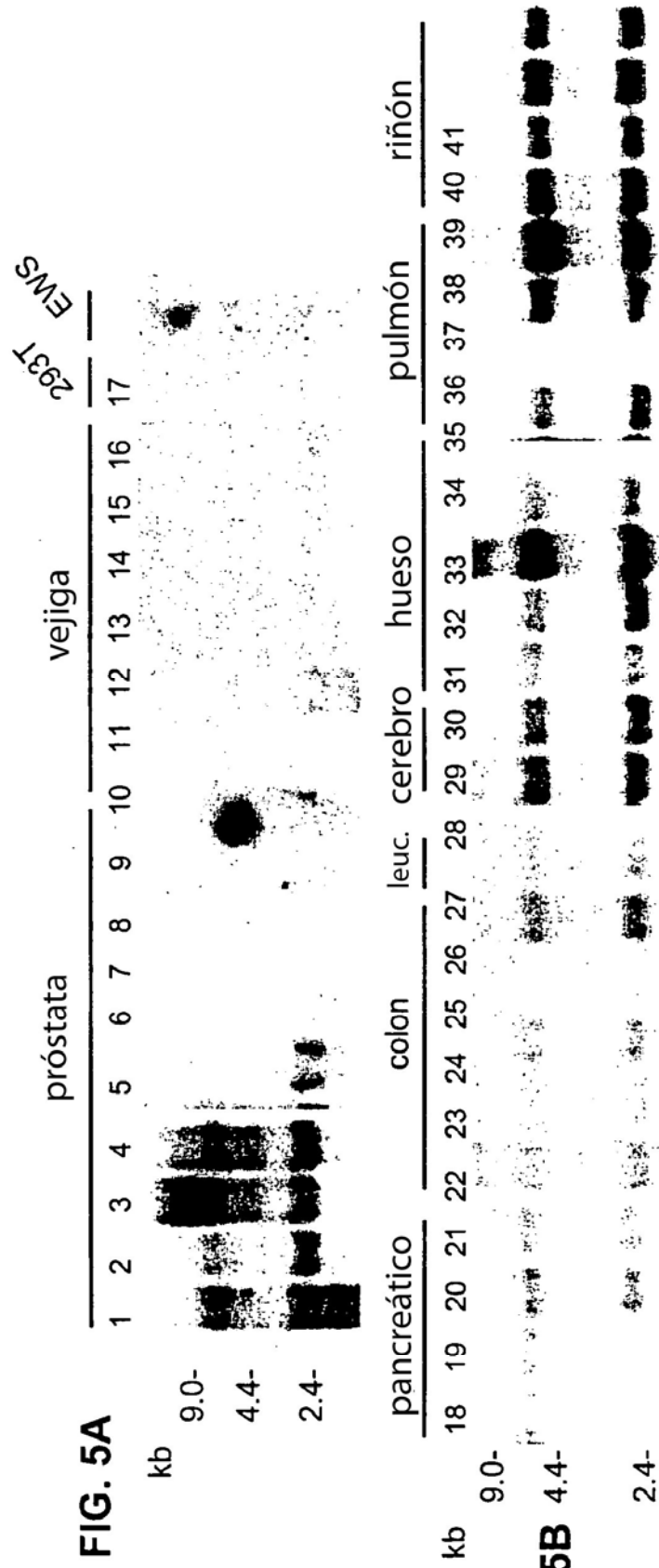


FIG. 6

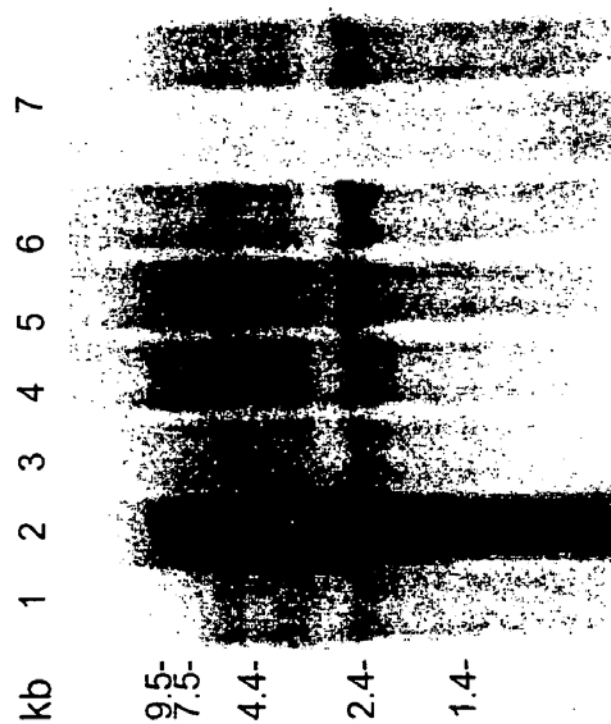


FIG. 7

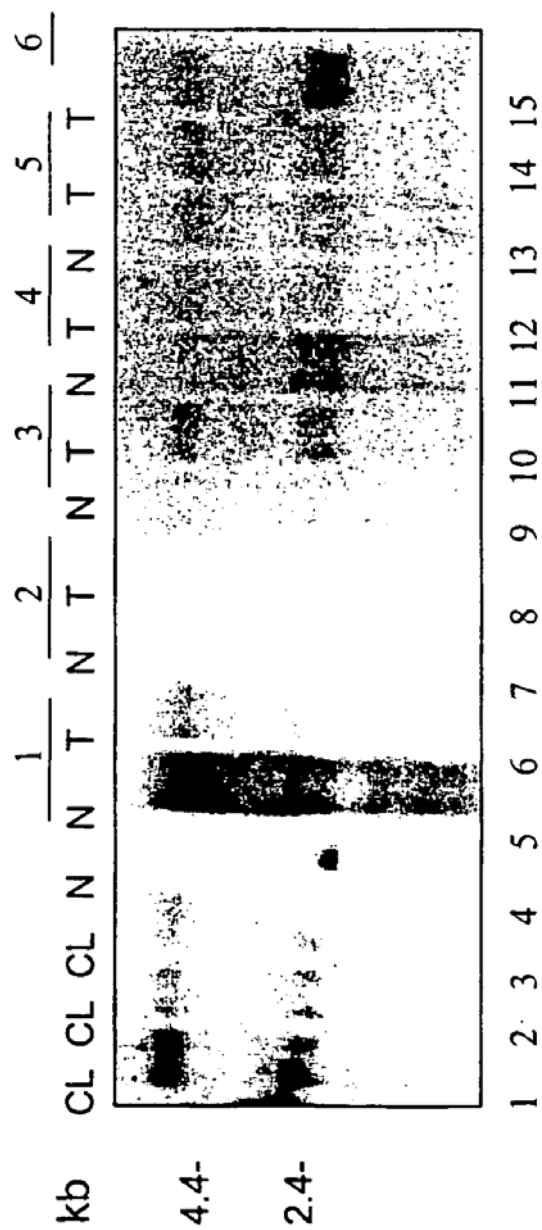


FIG. 8

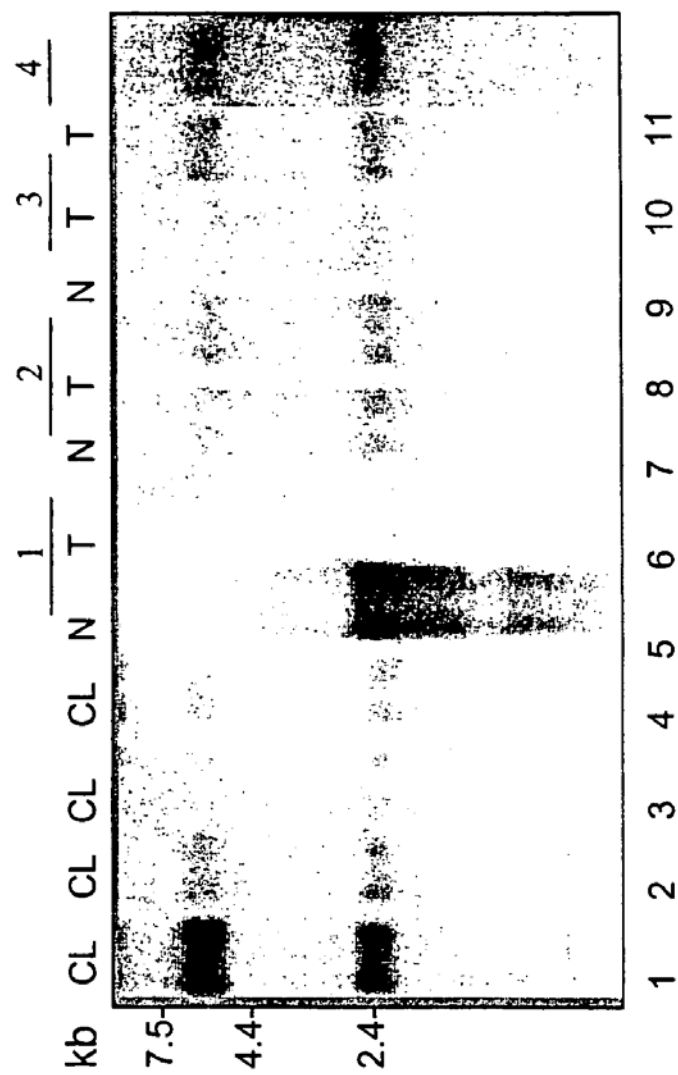


FIG. 9

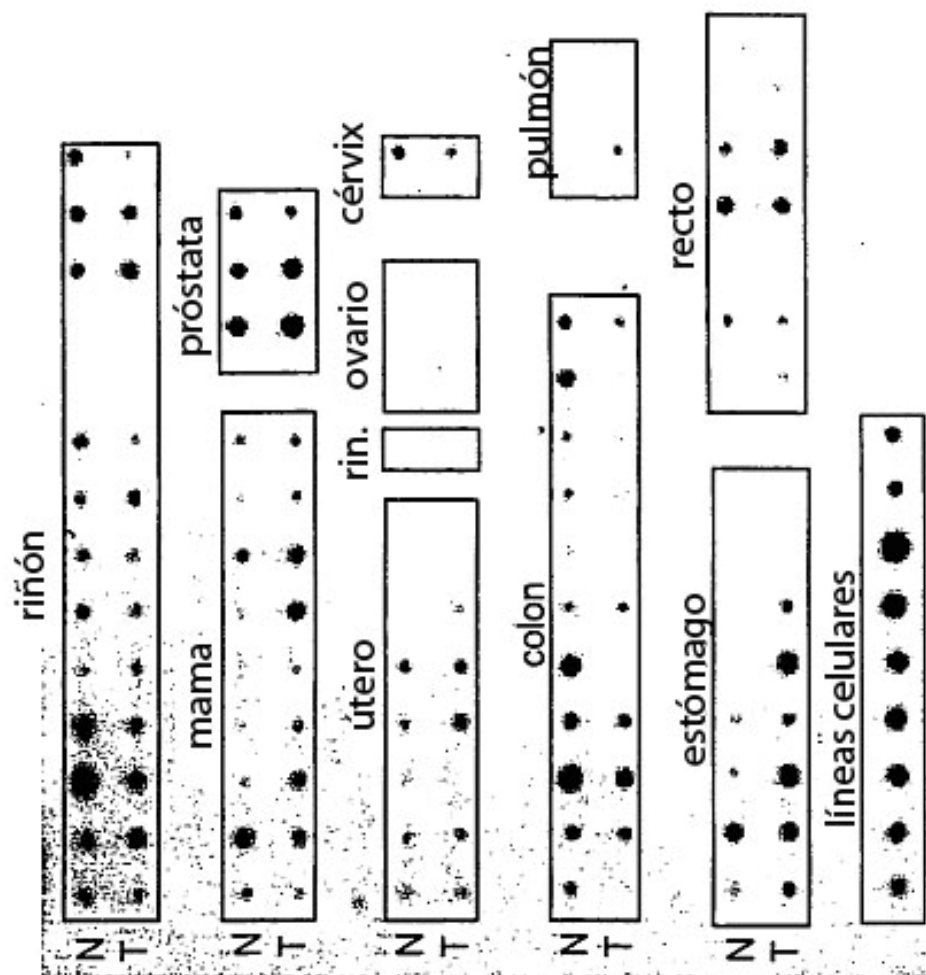


FIG. 10

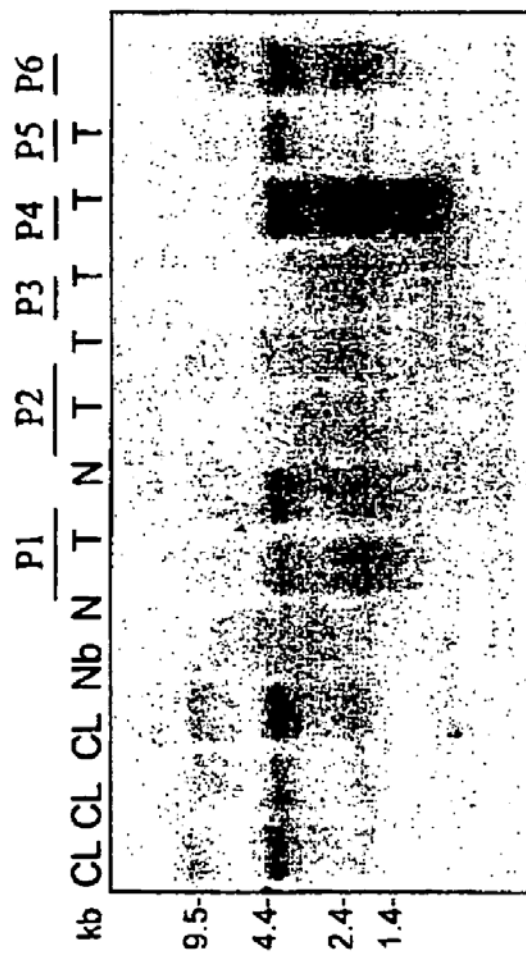


FIG. 11

