

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 622**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **04785910 .3**
96 Fecha de presentación: **28.05.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1629088**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.03.2006**

54 Título: **Variantes del antígeno de células madre de próstata (PSCA) y subsecuencias de las mismas**

30 Prioridad:
30.05.2003 US 475064 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.07.2012

73 Titular/es:
**AGENSYS, INC.
2225 COLORADO BOULEVARD
SANTA MONICA CA 90404, US**

72 Inventor/es:
**JAKOBOVITS, Aya;
GE, Wangmao;
RAITANO, Arthur B. y
CHALLITA-EID, Pia M.**

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 384 622 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

Variantes del antígeno de células madre de próstata (PSCA) y subsecuencias de las mismas

Campo técnico

5 La invención descrita en el presente documento se refiere a genes y sus proteínas codificadas, denominadas PSCA, expresadas en ciertos cánceres, y a procedimientos de diagnóstico y terapéuticos y a composiciones útiles en el tratamiento de cánceres que expresan PSCA.

Antecedentes de la técnica

10 El cáncer es la segunda causa principal de muerte humana junto a enfermedades coronarias. En todo el mundo, miles de personas mueren de cáncer cada año. Solamente en los Estados Unidos, como ha notificado la Sociedad Americana del Cáncer, el cáncer provoca la muerte de más de medio millón de personas anualmente, con más de 1,2 millones de nuevos casos diagnosticados cada año. Mientras que las muertes de enfermedad coronaria han estado reduciéndose significativamente, las resultantes de cáncer generalmente están en aumento. Se predice que en la primera parte del próximo siglo el cáncer se convertirá en la principal causa de muerte.

15 En todo el mundo, varios cánceres destacan como los principales causante de muerte. En particular, carcinomas de pulmón, próstata, mama, colon, páncreas y ovario representan las principales causas de muerte por cáncer. Estos y virtualmente todos los demás carcinomas comparten una característica letal común. Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica de un carcinoma es letal. Además, incluso para los pacientes con cáncer que inicialmente sobreviven a sus cánceres primarios, la experiencia habitual ha mostrado que sus vidas se alteran de forma drástica. Muchos pacientes con cáncer experimentan fuertes ansiedades impulsadas por la consciencia del potencial de recurrencia o fallo de tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan debilidades físicas después del tratamiento. Además, muchos pacientes con cáncer experimentan recurrencia.

20 En todo el mundo, el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más prevalente en hombres. En Norteamérica y el Norte de Europa, es con diferencia el cáncer más habitual en hombres y es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres. En los Estados Unidos solamente, más de 30.000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad, superado sólo por el cáncer de pulmón. A pesar de la magnitud de estas cifras, no existe tratamiento eficaz para cáncer de próstata metastásico. La prostatectomía quirúrgica, radioterapia, terapia de ablación hormonal, castración quirúrgica y quimioterapia continúan siendo las principales modalidades del tratamiento. Desafortunadamente, estos tratamientos son ineficaces para muchos y con frecuencia están asociados con consecuencias no deseables.

25 Con respecto al diagnóstico, la falta de un marcador tumoral de próstata que pueda detectar de forma precisa tumores localizados de etapa temprana sigue siendo una limitación significativa en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad. Aunque el ensayo de antígeno específico de próstata de suero (PSA) ha sido una herramienta muy útil, sin embargo su especificidad y utilidad general se considera ampliamente insuficiente en varios aspectos importantes.

30 El progreso en la identificación de marcadores específicos adicionales para cáncer de próstata ha mejorado por la generación de xenotrasplantes de cáncer de próstata que pueden recapitular diferentes etapas de la enfermedad en ratones. Los xenotrasplantes de LAPC (Cáncer de Próstata de Los Ángeles) son xenotrasplantes de cáncer de próstata que han sobrevivido al pase en ratones inmunodeficientes combinados graves (SCID) y han mostrado la capacidad de imitar la transición de dependencia de andrógenos a independencia de andrógenos (Klein y col., 1997, Nat. Med. 3: 402). Marcadores de cáncer de próstata más recientemente identificados incluyen PCTA-1 (Su y col., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), antígeno de membrana específico de próstata (PSM) (Pinto y col., Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, y col., Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8) y antígeno de células madre de próstata (PSCA) (Reiter y col., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

35 Aunque marcadores previamente identificados tales como PSA, PSM, PCTA y PSCA han facilitado intentos de diagnosticar y tratar cáncer de próstata, existe la necesidad de identificación de marcadores adicionales y dianas terapéuticas para cánceres de próstata y relacionados para mejorar adicionalmente el diagnóstico y la terapia.

40 El carcinoma de células renales (RCC) representa aproximadamente el 3 por ciento de los tumores malignos adultos. Una vez que los adenomas alcanzan un diámetro de 2 a 3 cm, existe potencial de malignidad. En el adulto, los dos tumores renales malignos principales son adenocarcinoma de células renales y carcinoma de células transicionales de la pelvis renal o uréter. La incidencia de adenocarcinoma de células renales se estima en más de 29.000 casos en los Estados Unidos y más de 11.600 pacientes murieron de esta enfermedad en 1998. El carcinoma de células transicionales es menos frecuente, con una incidencia de aproximadamente 500 casos por año en los Estados Unidos.

45 La cirugía ha sido la terapia primaria para adenocarcinoma de células renales durante muchas décadas. Hasta recientemente, la enfermedad metastásica ha sido refractaria para cualquier terapia sistémica. Con los recientes desarrollos en terapias sistémicas, particularmente inmunoterapias, el carcinoma de células renales metastásico puede enfocarse de forma agresiva en pacientes apropiados con una posibilidad de respuestas duraderas. Sin

embargo, sigue existiendo una necesidad de terapias eficaces para estos pacientes.

De todos los nuevos casos de cáncer en los Estados Unidos, el cáncer de vejiga representa aproximadamente el 5 por ciento en los hombres (quinta neoplasia más habitual) y 3 por ciento en las mujeres (octava neoplasia más habitual). La incidencia está aumentando lentamente, de forma simultánea con una población crecientemente más vieja. En 1998, hubo una estimación de 54.500 casos, incluyendo 39.500 en hombres y 15.000 en mujeres. La incidencia ajustada por edad en los Estados Unidos es 32 por 100.000 para hombres y 8 por 100.000 en mujeres. La relación hombre/mujer histórica de 3:1 puede reducirse en relación con los patrones de tabaquismo en mujeres. Hubo una estimación de 11.000 muertes de cáncer de vejiga en 1998 (7.800 en hombres y 3.900 en mujeres). La incidencia del cáncer de vejiga y la mortalidad aumentan fuertemente con la edad y serán un problema creciente a medida que la población se hace más vieja.

La mayoría de los cánceres de vejiga recurren en la vejiga. El cáncer de vejiga se trata con una combinación de resección transuretral de la vejiga (TUR) y quimioterapia intravesicular o inmunoterapia. La naturaleza multifocal y recurrente del cáncer de vejiga señala las limitaciones de la TUR. La mayoría de los cánceres invasivos de músculo no se curan por TUR solamente. La cistectomía radical y derivación urinaria es el medio más eficaz para eliminar el cáncer pero porta un impacto innegable en la función urinaria y sexual. Continúa existiendo la necesidad de modalidades de tratamiento que sean beneficiosas para pacientes con cáncer de vejiga.

Se estima que 130.200 casos de cáncer colorrectal se produjeron en 2000 en los Estados Unidos, incluyendo 93.800 casos de cáncer de colon y 36.400 de cáncer rectal. Los cánceres colorrectales son los terceros cánceres más habituales en hombres y mujeres. Las tasas de incidencia se redujeron significativamente durante 1992-1996 (-2,1 % por año). La investigación sugiere que estas reducciones se han debido al aumento de la exploración y retirada de pólipos, evitando la progresión de pólipos a cánceres invasivos. Hubo una estimación de 56.300 muertes (47.700 de cáncer de colon, 8.600 de cáncer rectal) en 2000, lo que supone aproximadamente 11 % de todas las muertes por cáncer en Estados Unidos.

En la actualidad, la cirugía es la forma más habitual de terapia para cáncer colorrectal y para cánceres que no se han propagado, es con frecuencia curativa. Se administra quimioterapia, o quimioterapia más radiación, antes o después de la cirugía a la mayoría de los pacientes cuyo cáncer ha perforado en profundidad la pared del intestino o se ha propagado a los ganglios linfáticos. En ocasiones es necesaria una colostomía permanente (creación de una abertura abdominal para eliminación de residuos corporales) para cáncer de colon y se requiere de forma infrecuente para cáncer rectal. Continúa habiendo una necesidad de modalidades de diagnóstico y tratamiento eficaces para el cáncer colorrectal.

Se estima que hubo 164.100 nuevos casos de cáncer de pulmón y bronquios en 2000, lo que supone el 14 % de todos los diagnósticos de cáncer de Estados Unidos. La tasa de incidencia de cáncer de pulmón y bronquios se está reduciendo significativamente en hombres, de un máximo de 86,5 por 100.000 en 1984 a 70,0 en 1996. En los años 90, la tasa de aumento entre mujeres comenzó a ralentizarse. En 1996, la tasa de incidencia en mujeres fue del 42,3 por 100.000.

El cáncer de pulmón y de bronquios se estima que provocó 156.900 muertes en 2000, lo que supone el 28 % de todas las muertes por cáncer. Durante 1992-1996, la mortalidad de cáncer de pulmón se redujo significativamente entre hombres (-1,7 % por año) mientras que las tasas para mujeres aún estaban aumentando significativamente (0,9 % por año). Desde 1997, han muerto más mujeres cada año de cáncer de pulmón que de cáncer de mama, que, durante más de 40 años, fue la causa principal de muerte por cáncer en mujeres. La reducción de la incidencia de cáncer de pulmón y tasas de mortalidad resultó con más probabilidad de las tasas del tabaquismo reducidas durante los 30 años anteriores; sin embargo, la reducción de los patrones de tabaquismo entre mujeres queda por detrás de la de los hombres. Es preocupante que aunque las reducciones de uso del tabaco en adultos se han ralentizado, el uso del tabaco en jóvenes está aumentando de nuevo.

Las opciones de tratamiento para cáncer de pulmón y de bronquios se determinan por el tipo y etapa del cáncer e incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Para muchos cánceres localizados, la cirugía es habitualmente el tratamiento de elección. Debido a que la enfermedad ya se ha propagado cuando se descubre, con frecuencia se necesita radioterapia y quimioterapia en combinación con cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento de elección para el cáncer de pulmón de células pequeñas; en este régimen, un gran porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es de larga duración. Existe, sin embargo, una necesidad continuada de enfoques de tratamiento y diagnóstico eficaces para cánceres de pulmón y de bronquios.

Se estima que se produjeran 182.800 casos invasivos nuevos de cáncer de mama entre mujeres en los Estados Unidos durante el 2000. Adicionalmente, se esperaba diagnosticar aproximadamente 1.400 nuevos casos de cáncer de mama en hombres en 2000. Después de aumentar aproximadamente 4 % por año en los años 80, las tasas de incidencia de cáncer de mama en mujeres se han nivelado en los 90 a aproximadamente 110,6 casos por 100.000.

Solamente en los Estados Unidos, hubo una estimación de 41.200 muertes (40.800 mujeres, 400 hombres) en 2000 debido a cáncer de mama. El cáncer de mama se clasifica en segundo lugar entre las muertes por cáncer en mujeres. De acuerdo con los datos más recientes, las tasas de mortalidad se redujeron significativamente durante

1992-1996 con las mayores reducciones en mujeres jóvenes, tanto blancas como negras. Estas reducciones fueron probablemente el resultado de detección más temprana y tratamiento mejorado.

5 Teniendo en cuenta las circunstancias médicas y las preferencias de los pacientes, el tratamiento de cáncer de mama puede implicar lumpectomía (retirada local del tumor) y retirada de los ganglios linfáticos debajo del brazo; mastectomía (la retirada quirúrgica de la mama) y retirada de los ganglios linfáticos bajo el brazo; radioterapia; quimioterapia; o terapia hormonal. Con frecuencia, se usan dos o más procedimientos en combinación. Numerosos estudios han mostrado que, para enfermedad de etapa temprana, las tasas de supervivencia a largo plazo después de lumpectomía más radioterapia son similares a las tasas de supervivencia después de mastectomía radical modificada. Avances significativos en técnicas de reconstrucción proporcionan varias opciones para reconstrucción de mama después de la mastectomía. Recientemente, dicha reconstrucción se ha realizado a la vez que la mastectomía.

15 La escisión local de carcinoma ductal *in situ* (DCIS) con cantidades adecuadas de tejido de mama normal circundante pueden evitar la recurrencia local del DCIS. La radiación a la mama y/o tamoxifeno pueden reducir la probabilidad de que se produzca DCIS en el tejido de mama restante. Esto es importante por que DCIS, si se deja sin tratar, puede desarrollarse a cáncer de mama invasivo. Sin embargo, existen efectos secundarios graves o secuelas de estos tratamientos. Existe, por lo tanto, una necesidad de tratamientos de cáncer de mama eficaces.

20 Se estima que se produjeron 23.100 nuevos casos de cáncer de ovario en los Estados Unidos en 2000. Supone el 4 % de todos los cánceres entre mujeres y se clasifica el segundo entre los cánceres ginecológicos. Durante 1992-1996 las tasas de incidencia de cáncer de ovario estaban reduciéndose significativamente. Como consecuencia del cáncer de ovario, hubo una estimación de 14.000 muertes en 2000. El cáncer de ovario provoca más muertes que cualquier otro cáncer del sistema reproductor femenino.

25 Las cirugía, radioterapia y quimioterapia son opciones de tratamiento para cáncer de ovario. La cirugía habitualmente incluye la retirada de uno o ambos ovarios, las trompas de Falopio (salpingo-ooforectomía), y el útero (histerectomía). En algunos tumores muy tempranos, solamente el ovario implicado se retirará, especialmente en mujeres jóvenes que desean tener hijos. En enfermedad avanzada, se realiza un intento de retirar toda la enfermedad intraabdominal para potenciar el efecto de la quimioterapia. Continua existiendo una necesidad importante de opciones de tratamiento eficaces para cáncer de ovario.

30 Se estima que se produjeron 28.300 nuevos casos de cáncer pancreático en los Estados Unidos en 2000. Durante los pasados 20 años, las tasas de cáncer pancreático se han reducido en hombres. Las tasas entre mujeres han permanecido aproximadamente constantes pero pueden estar empezando a reducirse. El cáncer pancreático provocó una estimación de 28.200 muertes en 2000 en los Estados Unidos. Durante los últimos 20 años, ha habido una reducción ligera pero significativa de las tasas de mortalidad entre los hombres (aproximadamente -0,9 % por año) mientras que las tasas han aumentado ligeramente entre mujeres.

35 Las cirugía, radioterapia y quimioterapia son opciones de tratamiento para cáncer pancreático. Estas opciones de tratamiento pueden prolongar la supervivencia y/o aliviar síntomas en muchos pacientes pero no es probable que produzcan una cura para la mayoría. Existe una necesidad significativa de opciones terapéuticas y de diagnóstico adicionales para cáncer pancreático.

40 La presente invención se refiere a un gen, designado PSCA, que se ha descubierto que se sobreexpresa en cánceres. Los documentos WO 98/40403, WO 01/40309 y la Patente de Estados Unidos nº 6.258.939 describen variantes de PSCA, anticuerpos para las mismas y usos terapéuticos de las mismas. El análisis de expresión de transferencia de Northern de la expresión del gen de PSCA en tejidos normales muestra un patrón de expresión restringido en tejidos adultos. Se proporcionan las secuencias de nucleótidos (Figura 2) y aminoácidos (Figura 2 y Figura 3) de PSCA. El perfil relacionado con tejido de PSCA en tejidos adultos normales, combinado con la sobreexpresión observada en los tejidos enumerados en la Tabla I, muestra que PSCA se sobreexpresa de forma aberrante en al menos algunos cánceres y por lo tanto actúa como una diana de diagnóstico, profiláctica, de pronóstico y/o terapéutica útil para cánceres del tejido o tejidos tales como los enumerados en la Tabla I.

Sumario de la invención

45 La presente invención se refiere más particularmente a detección de una variante de transcrito específico no desvelada previamente, PSCA v. 4 (SEC ID N°: 11; véase Tabla V(c) y Figura 2D) y variantes de nucleótido sencillo identificadas de la misma. Por lo tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de un polinucleótido PSCA en una muestra de ensayo derivada de un individuo como un indicador de la presencia de cáncer que comprende:

poner en contacto la muestra con una sonda que se una específicamente al polinucleótido PSCA, y

55 detectar la unión de la sonda con el polinucleótido PSCA, seleccionándose el polinucleótido PSCA del grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico

número 424 hasta el 993;

(b) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 521 es T;

(c) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 578 es C;

(d) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 649 es G;

(e) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 653 es T;

(f) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 721 es A;

(g) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 781 es A;

(h) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 788 es G;

(i) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 hasta el 993, en la que el resto nucleotídico en 989 es A; y

(j) un polinucleótido completamente complementario de un polinucleótido de uno cualquiera de (a) a (i);

en el que la etapa de detección comprende comparar una cantidad de unión de la sonda que se une específicamente al polinucleótido PSCA con la cantidad de unión de la sonda con el polinucleótido en una muestra de tejido normal correspondiente y en el que la presencia de polinucleótido PSCA elevado en la muestra de ensayo en relación con la muestra tisular normal proporciona un indicio de la presencia de cáncer.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de una proteína PSCA que tenga una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 14, 11, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 en una muestra de ensayo derivada de un individuo como un indicador de la presencia de cáncer que comprende:

poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína PSCA y detectar una cantidad de unión del anticuerpo o fragmento del mismo con la proteína PSCA en la muestra de ensayo y comparar la unión del anticuerpo o fragmento del mismo con la proteína en una muestra de tejido normal, en la que la presencia de proteína PSCA elevada en la muestra de ensayo en relación con la muestra de tejido normal proporciona un indicio de la presencia de cáncer.

La Solicitud de Patente de Estados Unidos Publicada 2003/023054 (Genentech) desvela una proteína secretada humana PR0232, que tiene una secuencia 97 % idéntica a SEC ID N°: 14, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 y 96 % idéntica a SEC ID N°: 21 y 22. Aunque la expresión de polinucleótido PR0232 está indicada en epitelio prostático, no existe enseñanza en la misma memoria descriptiva de ningún medio de diagnóstico de cáncer. La proteína PR0232 se indica solamente para mostrar homología con un antígeno de superficie de células madre.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Omitida Intencionalmente.

Figura 2.

A) La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 1 (también llamada "PSCA v.1" o "PSCA variante 1") se muestra en la Figura 2A. La metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 18-389 incluyendo el codón de parada.

B) La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 2 (también llamada "PSCA v.2") se muestra en la Figura 2B. El codón para la metionina de partida está subrayado. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 56-427 incluyendo el codón de parada.

C) La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 3 (también llamada "PSCA v.3") se muestra en la Figura 2C. El codón para la metionina de partida está subrayado. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 423-707 incluyendo el codón de parada.

D) La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 4 (también llamada "PSCA v.4") se muestra en la Figura 2D. El codón para la metionina de partida está subrayado. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 424-993 incluyendo el codón de parada.

E) La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 5 (también llamada "PSCA v.5") se muestra en la Figura 2E. El codón para la metionina de partida está subrayado. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 910-1479 incluyendo el codón de parada.

F) La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 6 (también llamada "PSCA v.6") se muestra en la Figura 2F. El codón para la metionina de partida está subrayado. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 83-427 incluyendo el codón de parada.

G) **variantes de SNP de PSCA v.2, PSCA v.7 a v.18.** Las proteínas PSCA v.7 a v.18 tienen 123 aminoácidos. Las variantes PSCA v.7 a v.18 son variantes con diferencia de nucleótido sencillo de PSCA v.2 y codifican la misma proteína que v.2. Aunque estas variantes de SNP se muestran de forma separada, también pueden aparecer en cualquier combinación y en cualquiera de las variantes transcritas enumeradas anteriormente en las Figuras 2A a 2F.

H) **variantes de SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 a v.30.** Las proteínas PSCA v.19 a v.30 tienen 189 aminoácidos. Las variantes PSCA v.19 a v.30 son variantes con diferencia de nucleótido sencillo de PSCA v.4. Las proteínas PSCA v.9, v. 10, v.11, v.24 y v.25 difieren de PSCA v.1 en un aminoácido. PSCA v.23, v.28, v.29 y v.30 codifican la misma proteína que v.4. Aunque estas variantes de SNP se muestran de forma separada, también pueden aparecer en cualquier combinación y en cualquiera de las variantes de transcrito v.3 y v.4.

Figura 3.

- A) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.1 se muestra en la Figura 3A; tiene 123 aminoácidos.
- B) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.3 se muestra en la Figura 3B; tiene 94 aminoácidos.
- C) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.4 se muestra en la Figura 3C; tiene 189 aminoácidos.
- D) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.6 se muestra en la Figura 3D; tiene 114 aminoácidos.
- E) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.19 se muestra en la Figura 3E; tiene 189 aminoácidos.
- F) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.20 se muestra en la Figura 3F; tiene 189 aminoácidos.
- G) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.21 se muestra en la Figura 3G; tiene 189 aminoácidos.
- H) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.22 se muestra en la Figura 3H; tiene 189 aminoácidos.
- I) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.24 se muestra en la Figura 3I; tiene 189 aminoácidos.
- J) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.25 se muestra en la Figura 3J; tiene 189 aminoácidos.
- K) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.26 se muestra en la Figura 3K; tiene 189 aminoácidos.
- L) La secuencia de aminoácidos de PSCA v.27 se muestra en la Figura 3L; tiene 189 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, una referencia a PSCA incluye todas las variantes de la misma, incluyendo las mostradas en las Figuras 2, 3, 10, 11 y 12 a no ser que el contexto claramente indique otra cosa.

Figura 4. Alineamiento de PSCA v.4 con Antígeno de Células Madre de Próstata Humana (gi 27482160).

Figura 5. Figuras 5(a)-(c): Perfil de hidrofilia de aminoácidos de PSCA v.1, v.3 y v.4 determinado por análisis de secuencia de algoritmo informático usando el procedimiento de Hopp y Woods (Hopp T. P., Woods K. R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828) al que se accede en el sitio web ProtScale localizado en Internet en (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 6. Figuras 6(a)-(c): Perfil hidropático de aminoácidos de PSCA v.1, v.3 y v.4 determinado por análisis de secuencia de algoritmo informático usando el procedimiento de Kyte y Doolittle (Kyte J., Doolittle R. F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132) a los que se accede en el sitio web ProtScale localizado en Internet en (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 7. Figuras 7(a)-(c): Perfil aminoacídico del porcentaje de restos accesibles de PSCA v.1, v.3 y v.4 determinado por análisis de secuencia de algoritmo informático usando el procedimiento de Janin (Janin J., 1979 Nature 277:491-492) al que se accede en el sitio web ProtScale localizado en Internet en (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 8. Figuras 8(a)-(c): Perfil aminoacídico de flexibilidad media de PSCA v.1, v.3 y v.4 determinado por análisis de secuencia de algoritmo informático usando el procedimiento de Bhaskaran y Ponnuswamy (Bhaskaran R., y Ponnuswamy P. K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255) al que se accede en el sitio web ProtScale localizado en Internet en (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 9. Figuras 9(a)-(c): Perfil aminoacídico de giro beta de PSCA v.1, v.3 y v.4 determinado por análisis de secuencia de algoritmo informático usando el procedimiento de Deleage y Roux (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294) al que se accede en el sitio web ProtScale localizado en Internet en (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 10. Composiciones de los exones de variantes de transcrito de PSCA. Los PSCA variantes v.2, v.3, v.4 y v.5 son variantes de transcrito de v.1. La variante v.2 inició la transcripción 47 pb más hacia el extremo 5' que v.1. La variante v.3 tenía un exón más corto 2 en comparación con v.2. Las variantes v.4 y v.5 tenían un primer exón alternativo. La variante 5 mantuvo el segundo intrón en comparación con v. 4. El orden de los exones potenciales en el genoma humano se muestra en la parte inferior. No se muestran las colas de Poli A en la Figura. Los extremos de los exones se muestran encima de las cajas. Los números en "()" debajo de las cajas corresponden a los de PSCA v.2. Las longitudes de los intrones y exones no son proporcionales.

Figura 11. Figura 11(a): Alineamiento esquemático de variantes proteicas de PSCA. Las variantes proteicas corresponden a variantes de nucleótidos. Las variantes de nucleótidos PSCA v.2, v.7 a v.18 codificaron la misma proteína que v.1. La variante v.5 codificaba la misma proteína que v.4 y la proteína v.3 era parte de v.4. Las

variantes de nucleótidos de PSCA v.2, v.3, v.4 y v.5 eran variantes de transcrito de v.1, como se muestra en la Figura 10. El SNP en v.2 que no provocó cambio de codón en v.2 provocó un cambio de codón en v.3, v.4 y v.5. Las diferencias de aminoácidos sencillos se indicaron encima de las cajas. Las cajas negras representan la misma secuencia que PSCA v.1. Los números debajo de la caja corresponden a PSCA v.1. **Figura 11(b):** Alineamiento esquemático de variantes proteicas traducidas de variantes SNP de PSCA v.4. Las variantes proteicas corresponden a variantes de nucleótidos. Las variantes de nucleótidos PSCA v.23, v.28, v.29 y v.30 codificaban la misma proteína que v.4. SNP en v.4 que dio como resultado un cambio de aminoácido en v.4 y también dio como resultado un cambio de aminoácido en v.5 y si aparece entre los aminoácidos 96-189, también en v.3. Las diferencias de aminoácidos sencillos se indicaron encima de las cajas. Las cajas negras representan la misma secuencia que PSCA v.4. Los números debajo de la caja corresponden a PSCA v.4.

Figura 12. Figura 12(a): Alineamiento esquemático de variantes de SNP de PSCA v.2. Las variantes PSCA v.6 a v.18 son variantes con diferencias de nucleótidos sencillos en comparación con variante v.2. La variante v.6 cambió la ORF de 56-427 a 83-427. Aunque estas variantes de SNP se mostraron por separado, también podrían aparecer en cualquier combinación y en cualquier variante de transcrito, tal como v.4 mostrada en la Figura 12, que contenía los pares de bases. Los números corresponden a los de PSCA v.2. La caja negra muestra la misma secuencia que PSCA v.2. Los SNP se indican encima de la caja. **Figura 12(b):** Alineamiento esquemático de variantes de SNP de PSCA v.4. Las variantes PSCA v.19 a v.30 son variantes con diferencias de nucleótido sencillo en comparación con variante v.4 (ORF: 424-993). Aunque estas variantes SNP se mostraron por separado, también podrían aparecer en cualquier combinación y en cualquier variante de transcrito que contuviera los pares de bases, tal como v.5 mostrado en la Figura 10. Los números corresponden a los de PSCA v.4. La caja negra muestra la misma secuencia que PSCA v.4. Los SNP se indican encima de la caja.

Figura 13. Predicción de estructura secundaria y dominios transmembrana para variantes proteicas de PSCA.

Figuras 13A, 13B, 13C y 13D: La estructura secundaria de proteína PSCA variante 1 (SEC ID N°: 6), variante 3 (SEC ID N°: 10), variante 4 (SEC ID N°: 14), y variante 6 (SEC ID N°: 20) (Figuras A-D, respectivamente) se predijeron usando el procedimiento de Red Neural Jerárquica, HNN (NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS marzo de 2000 Vol. 25, N° 3 [291]: 147-150 Combet C., Blanchet C., Geourjon C. y Deléage G., http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), al que se accede desde el servidor de biología molecular Expasy localizado en Internet en (.expasy.ch/tools/). Este procedimiento predice la presencia y localización de hélices alfa, hebras extendidas y bucles aleatorios a partir de la secuencia proteica primaria. También se enumera el porcentaje de cada proteína en una estructura secundaria dada.

Figuras 13E, 13G, 13I, y 13K: Representación esquemática de la probabilidad de existencia de regiones transmembrana de variantes de PSCA 1, 3, 4 y 6, respectivamente basándose en el algoritmo TMpred de Hofmann y Stoffel que utiliza TMBASE (K. Hofmann, W. Stoffel. TMBASE - A database of membrane spanning protein segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166, 1993). **Figuras 13F, 13H, 13J y 13L:** Representación esquemática de la probabilidad de existencia de regiones transmembrana de PSCA variante 1, basándose en el algoritmo TMHMM de Sonnhammer, von Heijne, y Krogh (Erik L. L. Sonnhammer, Gunnar von Heijne, y Anders Krogh: A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175-182 Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, y C. Sensen Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998). Se accede a los algoritmos TMpred y TMHMM desde el servidor de biología molecular Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/>).

Figura 14. Expresión de variantes de PSCA. Figura 14(A): Se diseñaron cebadores para diferenciar entre PSCA v.1/v.2/v.4, PSCA v.3 y PSCA v.5. PSCA v.1/v.2/v.4 conducen a un producto de PCR de 425 pb, PSCA v.3 conduce a un producto de PCR de 300 pb, mientras que PSCA v.5 conduce a un producto de PCR de 910 pb de tamaño. **Figura 14(B):** Se preparó ADNc de primera cadena a partir de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normal, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, metástasis cancerosa y cáncer de páncreas. Se realizó normalización por PCR usando cebadores para actina. Se realizó PCR semicuantitativa, usando los cebadores específicos variantes en 30 ciclos de amplificación. Los resultados muestran la expresión de PSCA v.5 principalmente en cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer de páncreas y a un nivel menor en cáncer de colon y cáncer de pulmón. El producto de PCR PSCA v.1/v.2/v.4 se detectó en cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer de páncreas. Entre los tejidos normales, se detectó producto de PCR PSCA v.1/v.2/v.4 solamente en próstata, estómago y a un nivel inferior en riñón y pulmón, mientras que no se detectó PSCA v.5 en ningún tejido normal. No se detectó producto detectado de PCR PSCA v.3 en ninguna de las muestras ensayadas.

Figura 15. Expresión de PSCA v.4 y PSCA v.5. **Figura 15(A):** Se diseñaron cebadores para diferenciar entre PSCA v.4 y PSCA v.5. PSCA v.4 conduce a un producto de PCR de 460 pb, mientras que PSCA v.5 conduce a un producto de PCR de 945 pb de tamaño. **Figura 15(B):** Se preparó ADNc de primera cadena a partir de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normal, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo multixenotrasplante (xenotrasplantes de cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de vejiga). Se realizó normalización por PCR usando cebadores para actina. Se

realizó PCR semicuantitativa, usando los cebadores específicos variantes en 30 ciclos de amplificación. Los resultados muestran la expresión de PSCA v.4 en cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo multixenotrasplante, riñón normal y próstata. Se detectó PSCA v.5 solamente en próstata normal y cáncer de vejiga.

Descripción detallada

5 **Definiciones:**

A no ser que se defina de otro modo, se pretende que todos los términos de la técnica, anotaciones y otros términos o terminología científica usados en el presente documento tengan los significados habitualmente entendidos por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. En algunos casos, se definen en el presente documento términos con significados habitualmente entendidos para mayor claridad y/o para una referencia fácil, y la inclusión de tales definiciones en el presente documento no debería interpretarse necesariamente que represente una diferencia sustancial frente a lo que se entiende generalmente en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o referidos en el presente documento se entienden bien y se emplean habitualmente usando metodología convencional por los expertos en la materia, tal como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2^o edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Según resulta apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se llevan a cabo generalmente de acuerdo con protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a no ser que se indique de otro modo.

Las expresiones “cáncer de próstata avanzado”, “cáncer de próstata localmente avanzado”, “enfermedad avanzada” y “enfermedad localmente avanzada” significan cánceres de próstata que se han extendido a través de la cápsula prostática y se pretende que incluyan enfermedad de etapa C según el sistema de la Asociación Urológica Americana (AUA), enfermedad de etapa C1 - C2 según el sistema Whitmore-Jewett y enfermedad de etapa T3 - T4 y N+ según el sistema TNM (tumor, ganglio, metástasis). En general, no se recomienda cirugía para pacientes con enfermedad localmente avanzada y estos pacientes tienen resultados sustancialmente menos favorables en comparación con pacientes que tienen cáncer de próstata clínicamente localizado (confinado a órgano). La enfermedad localmente avanzada se identifica clínicamente por pruebas palpables de induración más allá del borde lateral de la próstata, o asimetría o induración encima de la base de la próstata. El cáncer de próstata localmente avanzado se diagnostica en la actualidad patológicamente después de prostatectomía radical si el tumor invade o penetra la cápsula prostática, se extiende en el margen quirúrgico o invade las vesículas seminales.

Se pretende que “alterar el patrón de glucosilación nativo” para los fines del presente documento signifique suprimir uno o más restos de carbohidratos hallados en PSCA de secuencia nativa (retirando el sitio de glucosilación subyacente o suprimiendo la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadiendo uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en la secuencia nativa de PSCA. Además, la frase incluye cambios cualitativos en la glucosilación de las proteínas nativas, que implican un cambio en la naturaleza y proporciones de los diversos restos de carbohidratos presentes.

El término “análogo” se refiere a una molécula que es estructuralmente similar o comparte atributos similares o correspondientes con otra molécula (por ejemplo una proteína relacionada con PSCA). Por ejemplo, un análogo de una proteína de PSCA puede unirse específicamente con un anticuerpo o linfocito T que se une específicamente a PSCA.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio. Por lo tanto, un “anticuerpo” puede ser de origen natural o artificial tal como anticuerpos monoclonales producidos por tecnología de hibridoma convencional. Los anticuerpos anti-PSCA comprenden anticuerpos monoclonales y policlonales así como fragmentos que contienen el dominio de unión a antígeno y/o una o más regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos.

Un “fragmento de anticuerpo” se define como al menos una parte de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une a su diana, es decir, la región de unión a antígeno. En una realización abarca específicamente anticuerpos anti-PSCA sencillos y clones de los mismos (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizadores) y composiciones de anticuerpo anti-PSCA con especificidad poliepitópica.

La expresión “secuencias con codones optimizados” se refiere a secuencias de nucleótidos que se han optimizado para una especie huésped particular reemplazando cualquier codón que tenga una frecuencia de uso de menos de aproximadamente 20 %. Las secuencias de nucleótidos que se han optimizado para expresión en una especie huésped dada por eliminación de secuencias de poliadenilación espurias, eliminación de señales de corte y empalme de exones/intrones, eliminación de repeticiones de tipo transposón y/u optimización de contenido de GC además de optimización de codones se denominan en el presente documento “secuencias de expresión potenciada”.

Una “biblioteca combinatoria” es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica combinando varios “componentes básicos” químicos tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca química combinatoria lineal, tal como una biblioteca de polipéptidos (por ejemplo, muteína), se forma por combinación de un conjunto de componentes básicos químicos llamados aminoácidos de todas las maneras posibles para una longitud de compuesto dada (es decir, el número de aminoácidos en un compuesto polipeptídico).

Se sintetizan numerosos compuestos químicos a través de dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos (Gallop y col., J. Med. Chem. 37(9): 1233-1251 (1994)).

La preparación y exploración de bibliotecas combinatorias se conocen bien por los expertos en la materia. Tales bibliotecas químicas combinatorias incluyen, pero sin limitación, bibliotecas peptídicas (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.010.175, Furka, Pept. Prot. Res. 37: 487-493 (1991), Houghton y col., Nature, 354: 84-88 (1991)), peptoides (Publicación de PCT N° WO 91/19735), péptidos codificados (Publicación de PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios (Publicación de PCT WO 92/00091), benzodiazepinas (Patente de Estados Unidos N° 5.288.514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs y col., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)), polipéptido vinílogos (Hagihara y col., J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con un armazón de Beta-D-Glucosa (Hirschmann y col., J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen y col., J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho, y col., Science 261: 1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell y col., J. Org. Chem. 59: 658 (1994)). Véase, generalmente, Gordon y col., J. Med. Chem. 37: 1385 (1994), bibliotecas de ácidos nucleicos (véase, por ejemplo, Stratagene, Corp.), bibliotecas de ácidos péptido nucleicos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn, y col., Nature Biotechnology 14(3): 309-314 (1996), y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang y col., Science 274: 1520-1522 (1996), y Patente de Estados Unidos N° 5.593.853), y bibliotecas de moléculas orgánicas pequeñas (véase, por ejemplo, benzodiazepinas, Baum, C&EN, 18 de enero, página 33 (1993); isoprenoides, Patente de Estados Unidos N° 5.569.588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente de Estados Unidos N° 5.549.974; pirrolidinas, Patente de Estados Unidos N° 5.525.735 y 5.519.134; compuestos de morfolino, Patente de Estados Unidos N° 5.506.337; benzodiazepinas, Patente de Estados Unidos N° 5.288.514; y similares).

Están disponibles en el mercado dispositivos para la preparación de bibliotecas combinatorias (véase, por ejemplo, 357 NIPS, 390 NIPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050, Plus, Millipore, Bedford, NIA). También se han desarrollado varios sistemas robóticos bien conocidos para químicas de fase en solución. Estos sistemas incluyen estaciones de trabajo automáticas tales como el aparato de síntesis automática desarrollado por Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japón) y muchos sistemas robóticos que utilizan brazos robóticos (Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.), que imitan las operaciones sintéticas manuales realizadas por un químico. Cualquiera de los dispositivos anteriores es adecuado para su uso con la presente invención. La naturaleza e implantación de modificaciones a estos dispositivos (si los hubiera) de modo que puedan actuar como se analiza en el presente documento resultará evidente para los expertos en la materia relevante. Además, están disponibles en el mercado numerosas bibliotecas combinatorias en sí mismas (véase, por ejemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Asinex, Moscú, RU; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd, Moscú, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD; etc.).

La expresión "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o previene la actividad de expresión de células, función de células y/o provoca la destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya agentes quimioterapéuticos de isótopos radiactivos y toxinas tales como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación auristatinas, auroomicinas, maitansinoides, itrio, bismuto, ricina, cadena A de ricina, combrestatina, duocarmicinas, dolostatinas, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, cisplatino, cc1065, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxil antracina diona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de *Saponaria officinalis* y glucocorticoide y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos tales como At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² o ²¹³, P³² e isótopos radiactivos de Lu incluyendo Lu¹⁷⁷. Los anticuerpos también pueden conjugarse con una enzima activadora de profármaco antineoplásico capaz de convertir el profármaco a su forma activa.

Se hace referencia en ocasiones al "producto génico" en el presente documento como una proteína o ARNm. Por ejemplo, se hace referencia en ocasiones a un "producto génico de la invención" en el presente documento como una "secuencia de aminoácidos cancerosa", "proteína cancerosa", "proteína de un cáncer enumerado en la Tabla I", un "ARNm de cáncer", "ARNm de un cáncer enumerado en la Tabla I", etc. En una realización, la proteína de cáncer está codificada por un ácido nucleico de la Figura 2. La proteína de cáncer puede ser un fragmento o, como alternativa, puede ser la proteína de longitud completa para el fragmento codificado por los ácidos nucleicos de la Figura 2. En una realización, se usa una secuencia de aminoácidos de cáncer para determinar identidad o similitud de secuencia. En otra realización, las secuencias son variantes alélicas de origen natural de una proteína codificada por un ácido nucleico de la Figura 2. En otra realización, las secuencias son variantes de secuencia como se describen adicionalmente en el presente documento.

Se conocen bien por los expertos en la materia ensayos de "exploración de alto rendimiento" con respecto a la presencia, ausencia, cuantificación u otras propiedades de ácidos nucleicos o productos proteicos particulares. De forma similar, se conocen bien ensayos de unión y ensayos de gen indicador. Por lo tanto, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.559.410 desvela procedimientos de exploración de alto rendimiento para proteínas; la

Patente de Estados Unidos Nº 5.585.639 desvela procedimientos de exploración de alto rendimiento para unión de ácido nucleico (es decir, en matrices); mientras que las Patentes de Estados Unidos Nº 5.576.220 y 5.541.061 desvelan procedimientos de alto rendimiento de exploración con respecto a unión de ligando/anticuerpo.

Además, están disponibles en el mercado sistemas de exploración de alto rendimiento (véase, por ejemplo, 5 Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA; etc.). Estos sistemas típicamente automatizan procedimientos completos, incluyendo todo el pipeteo de muestra y reactivo, distribución de líquidos, incubaciones temporizadas y lecturas finales de la microplaca en detector o detectores apropiados para el ensayo. 10 Estos sistemas configurables proporcionan inicio rápido y de alto rendimiento así como un alto grado de flexibilidad y personalización. Los fabricantes de tales sistemas proporcionan protocolos detallados para diversos sistemas de alto rendimiento. Por lo tanto, por ejemplo, Zymark Corp. proporciona boletines técnicos que describen sistemas de exploración para detectar la modulación de transcripción génica, unión de ligando y similares.

El término "homólogo" se refiere a una molécula que muestra homología con otra molécula, por ejemplo, teniendo secuencias de restos químicos que son iguales o similares en posiciones correspondientes.

15 "Antígeno de Leucocitos Humanos" o "HLA" es una proteína del Complejo Mayor de Histocompatibilidad humano de clase I o clase II (MHC) (véase, por ejemplo, Stites, y col., Immunology, 8ª Ed., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994)).

Los términos "hibridar", "hibridación", "hibrida" y similares, usados en el contexto de polinucleótidos, pretenden referirse a condiciones de hibridación convencionales, preferentemente tales como hibridación en formamida 50 20 %/SSC 6X / SDS 0,1 % / ADNmc 100 µg/ml, en las que las temperaturas para hibridación están por encima de 37 grados C y las temperaturas para lavado en SSC 0,1X/SDS 0,1 % están por encima de 55 grados C.

Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente sin componentes que normalmente acompañan al material como se encuentra en su estado nativo. Por lo tanto, los péptidos aislados de acuerdo con la invención preferentemente no contienen materiales normalmente asociados con 25 los péptidos en su ambiente *in situ*. Por ejemplo, se dice que un polinucleótido está "aislado" cuando está sustancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que corresponden o son complementarios a genes distintos de los genes de PSCA o que codifican polipéptidos distintos del producto génico de PSCA o fragmentos del mismo. Un experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos para obtener un polinucleótido de PSCA aislado. Se dice que una proteína está "aislada", por ejemplo, cuando se 30 emplean procedimientos físicos, mecánicos o químicos para retirar las proteínas de PSCA de constituyentes celulares que normalmente están asociados con la proteína. Un experto en la materia puede emplear fácilmente procedimientos de purificación convencionales para obtener una proteína de PSCA aislada. Como alternativa, puede prepararse una proteína aislada por medios químicos.

El término "mamífero" se refiere a cualquier organismo clasificado como un mamífero, incluyendo ratones, ratas, 35 conejos, perros, gatos, vacas, caballos y seres humanos. En una realización de la invención, el mamífero es un ratón. En otra realización de la invención, el mamífero es un ser humano.

Las expresiones "cáncer de próstata metastásico" y "enfermedad metastásica" significan cánceres de próstata que se han propagado a ganglios linfáticos regionales o a sitios distantes y se pretende que incluyan enfermedad de 40 etapa D según el sistema AUA y etapa TxNxM+ según el sistema TNM. Como sucede con cáncer de próstata localmente avanzado, la cirugía generalmente no está indicada para pacientes con enfermedad metastásica y la terapia hormonal (ablación de andrógenos) es una modalidad de tratamiento preferida. Los pacientes con cáncer de próstata metastásico con el tiempo desarrollan un estado refractario de andrógenos en un periodo de 12 a 18 meses desde el inicio del tratamiento. Aproximadamente la mitad de esos pacientes refractarios para andrógenos mueren en un periodo de 6 meses después del desarrollo de ese estado. El sitio más habitual para metástasis de cáncer de 45 próstata es el hueso. Las metástasis de hueso de cáncer de próstata son con frecuencia osteoblásticas en lugar de osteolíticas (es decir, dan como resultado formación de hueso neta). Las metástasis de hueso se encuentran más frecuentemente en la espina dorsal, seguido del fémur, pelvis, caja torácica, cráneo y húmero. Otros sitios habituales para metástasis incluyen ganglios linfáticos, pulmón, hígado y cerebro. El cáncer de próstata metastásico típicamente se diagnostica por linfadenectomía pélvica abierta o laparoscópica, exploraciones de radionúclidos de 50 cuerpo completo, radiografías del esqueleto y/o biopsia de lesión ósea.

La expresión "modulador", "compuesto de ensayo" o "candidato a fármaco" o equivalentes gramaticales como se usan en el presente documento describen cualquier molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica 55 pequeña, polisacárido, polinucleótido, etc., para ensayar con respecto a la capacidad de alterar directa o indirectamente el fenotipo de cáncer o la expresión de una secuencia de cáncer, por ejemplo, una secuencia de proteína o de ácido nucleico, o efectos de secuencias cancerosas (por ejemplo, señalización, expresión génica, interacción proteica, etc.). En un aspecto, un modulador neutralizará el efecto de una proteína cancerosa de la invención. Por "neutralizar" se entiende que una actividad de una proteína se inhibe o bloquea, junto con el efecto consecuente en la célula. En otro aspecto, un modulador neutralizará el efecto de un gen, y su proteína correspondiente, de la invención normalizando los niveles de dicha proteína. En realizaciones preferidas, los

moduladores alteran los perfiles de expresión, o proteínas o ácidos nucleicos de perfil de expresión proporcionados en el presente documento, o rutas efectoras corriente abajo. En una realización, el modulador suprime un fenotipo de cáncer, por ejemplo a una identificación tisular normal. En otra realización, un modulador induce un fenotipo canceroso. Generalmente, se procesa una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones actúa como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los moduladores, candidatos a fármaco o compuestos de ensayo abarcan numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Son moléculas pequeñas preferidas las de menos de 2000, menos de 1500, menos de 1000 o menos de 500 D. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para interacción estructural con proteínas, particularmente enlace de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos con frecuencia comprenden carbono cíclico o estructuras heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los moduladores también comprenden biomoléculas tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Se prefieren particularmente péptidos. Una clase de moduladores son péptidos, por ejemplo de aproximadamente 5 a aproximadamente 35 aminoácidos, prefiriéndose de aproximadamente cinco a aproximadamente 20 aminoácidos y prefiriéndose particularmente de aproximadamente 7 a aproximadamente 15. Preferentemente, la proteína moduladora de cáncer es soluble, incluye una región no transmembrana y/o tiene una Cys N terminal para ayudar a la solubilidad. En una realización, el extremo C terminal del fragmento se mantiene como un ácido libre y el extremo N terminal es una amina libre para ayudar en el acoplamiento, es decir, a cisteína. En una realización, una proteína de cáncer de la invención se conjuga con un agente inmunogénico como se ha analizado en el presente documento. En una realización, la proteína de cáncer se conjuga con BSA. Los péptidos de la invención, por ejemplo, de longitudes preferidas pueden enlazarse entre sí o con otros aminoácidos para crear un péptido/proteína más largo. Los péptidos moduladores pueden ser productos de digestión de proteínas de origen natural como se ha perfilado anteriormente, péptidos aleatorios o péptidos aleatorios "parciales". En una realización preferida, los moduladores basados en proteína/péptido son anticuerpos, y fragmentos de los mismos, como se define en el presente documento.

Los moduladores de cáncer también pueden ser ácidos nucleicos. Los agentes moduladores de ácido nucleico pueden ser ácidos nucleicos de origen natural, ácidos nucleicos aleatorios o ácidos nucleicos aleatorios "parciales". Por ejemplo, las digestiones de genomas procariontas o eucariotas pueden usarse en un enfoque análogo al perfilado anteriormente para proteínas.

La expresión "anticuerpo monoclonal" se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que están presentes en cantidades menores.

Un "motivo", como en el motivo biológico de una proteína relacionada con PSCA, se refiere a cualquier patrón de aminoácidos que forme parte de la secuencia primaria de una proteína, que está asociada con una función particular, (por ejemplo interacción proteína-proteína, interacción proteína-ADN, etc.) o modificación (por ejemplo que se fosforila, glucosila o amida) o localización (por ejemplo secuencia secretora, secuencia de localización nuclear, etc.) o una secuencia que se correlaciona con ser inmunogénico, bien de forma humoral o bien de forma celular. Un motivo puede ser contiguo o capaz de alinearse con ciertas posiciones que generalmente se correlacionan con una cierta función o propiedad. En el contexto de motivos de HLA, "motivo" se refiere al patrón de restos en un péptido de longitud definida, habitualmente un péptido de aproximadamente 8 a aproximadamente 13 aminoácidos para un motivo de HLA de clase I y de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 aminoácidos para un motivo de HLA de clase II, que se reconoce por una molécula de HLA particular. Los motivos peptídicos para unión de HLA son típicamente diferentes para cada proteína codificada por cada alelo de HLA humano y difieren en el patrón de los restos de anclaje primarios y secundarios.

Un "excipiente farmacéutico" comprende un material tal como un adyuvante, un vehículo, agentes de ajuste de pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservante, y similares.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición no tóxica, inerte y/o composición que es fisiológicamente compatible con seres humanos u otros mamíferos.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases o pares de bases de longitud, bien ribonucleótidos o bien desoxinucleótidos o una forma modificada de uno de los tipos de nucleótidos, y pretende incluir formas mono y bicatenarias de ADN y/o ARN. En la técnica, este término con frecuencia se usa de forma intercambiable con "oligonucleótido". Un polinucleótido puede comprender una secuencia de nucleótidos desvelada en el presente documento en la que timidina (T), como se muestra por Ejemplo en la Figura 2, también puede ser uracilo (U); esta definición concierne a las diferencias entre las estructuras químicas de ADN y ARN, en particular la observación de que una de las cuatro bases principales en el ARN es uracilo (U) en lugar de timidina

(T).

El término "polipéptido" significa un polímero de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7 u 8 aminoácidos. A lo largo de la memoria descriptiva, se usan designaciones convencionales de tres letras o una letra para los aminoácidos. En la técnica, este término se usa con frecuencia de forma intercambiable con "péptido" o "proteína".

- 5 Un "resto de anclaje primario" del HLA es un aminoácido en una posición específica a lo largo de una secuencia peptídica que se entiende que proporciona un punto de contacto entre el péptido inmunogénico y la molécula de HLA. De uno a tres, habitualmente dos, restos de anclaje primarios de un péptido de longitud definida generalmente definen un "motivo" para un péptido inmunogénico. Se entiende que estos restos se ajustan en contacto cercano con el surco de unión a péptidos de una molécula de HLA, con sus cadenas laterales enterradas en bolsillos específicos del surco de unión. En una realización, por ejemplo, los restos de anclaje primarios para una molécula de HLA de clase I se localizan en la posición 2 (desde la posición amino terminal) y en la posición carboxilo terminal de un epítipo peptídico de 8, 9, 10, 11 ó 12 restos de acuerdo con la invención. Como alternativa, en otra realización, los restos de anclaje primarios de un péptido que se une a una molécula de clase II se espacian entre sí, en lugar de en relación con los extremos de un péptido, siendo el péptido generalmente de al menos 9 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, pueden crearse péptidos análogos alterando la presencia o ausencia de restos particulares en las posiciones de anclaje primarias y/o secundarias. Tales análogos se usan para modular la afinidad de unión y/o cobertura de la población de un péptido que comprende un motivo o supermotivo de HLA particular.

Los "radioisótopos" incluyen, pero sin limitación los siguientes (también se exponen usos ejemplares no limitantes):

****Ejemplos de isótopos médicos:**

Isótopo	Descripción de uso
Actinio-225 (Ac-225)	Véase Torio-229 (Th-229)
Actinio-227 (Ac-227)	Precursor de Radio-223 (Ra-223) que es un emisor alfa usado para tratar metástasis en el esqueleto resultantes de cáncer (es decir, cánceres de mama y próstata) y radioinmunoterapia de cáncer
Bismuto-212 (Bi-212)	Véase Torio-228 (Th-228)
Bismuto-213 (Bi-213)	Véase Torio-229 (Th-229)
Cadmio-109 (Cd-109)	Detección de cáncer
Cobalto-60 (Co-60)	Fuente de radiación para radioterapia de cáncer, para irradiadores de alimentos y para esterilización de suministros médicos
Cobre-64 (Cu-64)	Un emisor de positrones usado para terapia de cáncer y formación de imágenes de SPECT
Cobre-67 (Cu-67)	Emisor de beta/gamma usado en radioinmunoterapia de cáncer y estudios de diagnóstico (es decir, cánceres de mama y colon, y linfoma)
Disprosio-166 (Dy-166)	Radioinmunoterapia de cáncer
Erbio-169 (Er-169)	Tratamiento de artritis reumatoide particularmente para las articulaciones pequeñas asociadas con dedos
Europio-152 (Eu-152)	Fuente de radiación para irradiación de alimentos y para esterilización de suministros médicos
Europio-154 (Eu-154)	Fuente de radiación para irradiación de alimentos y para esterilización de suministros médicos
Gadolinio-153 (Gd-153)	Detección de osteoporosis y dispositivos de garantía de calidad médica nuclear
Oro-198 (Au-198)	Implante y terapia intracavitaria de cánceres de ovario, de próstata y de cerebro
Holmio-166 (Ho-166)	Tratamiento de mieloma múltiple en terapia esquelética dirigida, radioinmunoterapia de cáncer, ablación de médula ósea y tratamiento de artritis reumatoide

ES 2 384 622 T3

(continuación)

Isótopo	Descripción de uso
Yodo -125 (I-125)	Detección de osteoporosis, formación de imágenes de diagnóstico, fármacos indicadores, tratamiento de cáncer de cerebro, radiomarcadores, formadores de imágenes de tumores, mapeo de receptores en el cerebro, terapia de radiación intersticial, braquiterapia para tratamiento de cáncer de próstata, determinación de tasa de filtración glomerular (GFR), determinación de volumen de plasma, detección de trombosis de vena profunda de las piernas
Yodo -131 (I-131)	Evaluación de la función tiroidea, detección de enfermedad tiroidea, tratamiento de cáncer de tiroides así como otras enfermedades de tiroides no malignas (es decir, enfermedad de Graves, bocio e hipertiroidismo), tratamiento de leucemia, linfoma y otras formas de cáncer (por ejemplo, cáncer de mama) usando radioinmunoterapia
Iridio-192 (Ir-192)	Braquiterapia, tratamiento de tumor de la médula espinal y cerebro, tratamiento de arterias bloqueadas (es decir, arteriosclerosis y reestenosis), e implantes para tumores de mama y de próstata
Lutecio-177 (Lu-177)	Radioinmunoterapia de cáncer y tratamiento de arterias bloqueadas (es decir, arteriosclerosis y reestenosis)
Molibdeno-99 (Mo-99)	Precursor de Tecnecio-99m (Tc-99m) que se usa para formación de imágenes del cerebro, hígado, pulmones, corazón y otros órganos. En la actualidad, Tc-99m es el radioisótopo más ampliamente usado que se usa para formación de imágenes de diagnóstico de diversos cánceres y enfermedades que implican el cerebro, corazón, hígado, pulmones; también se usa en detección de trombosis de vena profunda de las piernas
Osmio-194 (Os-194)	Radioinmunoterapia de cáncer
Paladio-103 (Pd-103)	Tratamiento de cáncer de próstata
Platino-195m (Pt-195m)	Estudios de biodistribución y metabolismo de cisplatino, un fármaco quimioterapéutico
Fósforo-32 (P-32)	Tratamiento de policitemia rubra vera (enfermedad de células sanguíneas) y leucemia, diagnóstico/tratamiento de cáncer de hueso; tratamiento de cáncer de colon, pancreático y de hígado; radiomarcaje de ácidos nucleicos para investigación <i>in vitro</i> , diagnóstico de tumores superficiales, tratamiento de arterias bloqueadas (es decir, arteriosclerosis y reestenosis), y terapia intracavitaria
Fósforo-33 (P-33)	Tratamiento de leucemia, diagnóstico/tratamiento de enfermedad ósea, radiomarcaje y tratamiento de arterias bloqueadas (es decir, arteriosclerosis y reestenosis)
Radio-223 (Ra-223)	Véase Actinio-227 (Ac-227)
Renio-186 (Re-186)	Alivio del dolor de cáncer de hueso, tratamiento de artritis reumatoide y diagnóstico y tratamiento de linfoma y cánceres de hueso, mama, colon e hígado usando radioinmunoterapia
Renio-188 (Re-188)	Diagnóstico y tratamiento de cáncer usando radioinmunoterapia, alivio de dolor de cáncer de hueso, tratamiento de artritis reumatoide y tratamiento de cáncer de próstata
Rodio-105 (Rh-105)	Radioinmunoterapia de cáncer
Samarium-145 (Sm-145)	Tratamiento de cáncer ocular
Samarium-153 (Sm-153)	Radioinmunoterapia de cáncer y alivio de dolor de cáncer de hueso
Escandio-47 (Sc-47)	Radioinmunoterapia de cáncer y alivio de dolor de cáncer de hueso
Selenio-75 (Se-75)	Radioindicador usado en estudios del cerebro, formación de imágenes de la corteza suprarrenal por gamma-escintigrafía, localizaciones laterales de tumores que secretan esteroides, exploración pancreática, detección de glándulas paratiroides hiperactivas, medir la tasa de pérdida de ácido biliar del grupo endógeno
Estroncio-85 (Sr-85)	Detección de cáncer de hueso y exploraciones cerebrales

(continuación)

Isótopo	Descripción de uso
Estroncio-89 (Sr-89)	Alivio del dolor de cáncer de hueso, tratamiento de mieloma múltiple y terapia osteoblástica
Tecnecio-99m (Tc-99m)	Véase Molibdeno-99 (Mo-99)
Torio-228 (Th-228)	Precursor de Bismuto-212 (Bi-212) que es un emisor alfa usado en radioinmunoterapia de cáncer
Torio-229 (Th-229)	Precursor de Actinio-225 (Ac-225) y precursor previo de Bismuto-213 (Bi-213) que son emisores alfa usados en radioinmunoterapia de cáncer
Tulio-170 (Tm-170)	Fuente de gamma para irradiadores de sangre, fuente de energía para dispositivos médicos implantados
Estaño-117m (Sn-117m)	Inmunoterapia de cáncer y alivio de dolor de cáncer de huesos
Tungsteno-188 (W-188)	Precursor de Renio-188 (Re-188) que se usa para diagnóstico/tratamiento de cáncer, alivio de dolor de cáncer de hueso, tratamiento de artritis reumatoide y tratamiento de arterias bloqueadas (es decir, arteriosclerosis y reestenosis)
Xenón-127 (Xe-127)	Formación de imágenes neuronales de trastornos del cerebro, estudios de SPECT de alta resolución, ensayos de función pulmonar y estudios de flujo sanguíneo cerebral
Iterbio-175 (Yb-175)	Radioinmunoterapia de cáncer
Itrio-90 (Y-90)	Microsemillas obtenidas de irradiación con Itrio-89 (Y-89) para tratamiento de cáncer de hígado
Itrio-91 (Y-91)	Un marcador emisor de gamma para Itrio-90 (Y-90) que se usa para radioinmunoterapia de cáncer (es decir, linfoma, cánceres de mama, de colon, de riñón, de pulmón, de ovario, de próstata, pancreático y de hígado inoperable)

5 Por "aleatorio" o equivalentes gramaticales como se aplican en el presente documento a ácidos nucleicos y proteínas se entiende que cada ácido nucleico y péptido consiste en nucleótidos y aminoácidos esencialmente aleatorios, respectivamente. Estos péptidos aleatorios (o ácidos nucleicos, analizados en el presente documento) pueden incorporar cualquier nucleótido o aminoácido en cualquier posición. El procedimiento sintético puede diseñarse para generar proteínas o ácidos nucleicos aleatorios, para permitir la formación de todas o la mayoría de las combinaciones posibles sobre la longitud de la secuencia, formando de este modo una biblioteca de agentes proteicos bioactivos candidatos aleatorios.

10 En una realización, una biblioteca es "completamente aleatoria", sin preferencias de secuencia o constantes en ninguna posición. En otra realización, a biblioteca es una biblioteca "aleatoria parcial". Es decir, algunas posiciones dentro de la secuencia se mantienen constantes, o se seleccionan de un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, los restos nucleotídicos o aminoacídicos se seleccionan de forma aleatoria dentro de una clase definida, por ejemplo, de aminoácidos hidrófobos, restos hidrófilos, restos estéricamente parciales (grandes o pequeños), para la creación de dominios de unión a ácido nucleico, la creación de cisteínas, para reticulación, prolinas para dominios de SH-3, serinas, treoninas, tirosinas o histidinas para sitios de fosforilación, etc., o a purinas, etc.

15 Una molécula de ADN o ARN "recombinante" es una molécula de ADN o ARN que se ha sometido a manipulación molecular *in vitro*.

20 Los ejemplos no limitantes de moléculas pequeñas incluyen compuestos que se unen o interaccionan con PSCA, ligandos que incluyen hormonas, neuropéptidos, quimiocinas, odorantes, fosfolípidos y equivalentes funcionales de los mismos que se unen y preferentemente inhiben la función de la proteína PSCA. Tales moléculas pequeñas no limitantes preferentemente tienen un peso molecular de menos de aproximadamente 10 kDa, más preferentemente por debajo de aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5 o aproximadamente 4 kDa. En ciertas realizaciones, las moléculas pequeñas se asocian físicamente con, o se unen a, proteína PSCA; no se encuentran en rutas metabólicas de origen natural; y/o son más solubles en soluciones acuosas que en no acuosas.

30 La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación se puede determinar fácilmente por un experto en la materia, y generalmente es un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, temperatura de lavado y concentración salina. En general, sondas más largas requieren temperaturas más altas para hibridación apropiada, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende en general de la capacidad de las secuencias de ácido nucleico desnaturalizadas para volver a hibridar cuando están presentes hebras

complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor es la temperatura relativa que puede usarse. Como resultado, se deduce que temperaturas relativas más altas tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas más bajas las harían menos. Para detalles adicionales y explicación de rigurosidad de las reacciones de hibridación, véase Ausubel y col., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

Las “condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se definen en el presente documento, se identifican, pero sin limitación, por las que: (1) emplean fuerza iónica baja y temperatura alta para lavado, por ejemplo cloruro sódico 0,015 M/citrato sódico 0,0015 M/dodecil sulfato sódico 0,1 % a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente desnaturizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1 %/Ficoll 0,1 %/polivinilpirrolidona 0,1 %/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro sódico 750 mM, citrato sódico 75 mM a 42 °C; o (3) emplean formamida al 50 %, SSC 5 x (NaCl 0,75 M, citrato sódico 0,075 M), fosfato sódico 50 mM (pH 6,8), pirofosfato sódico 0,1 %, solución de Denhardt 5 x, ADN de esperma de salmón sonificado (50 µg/ml), SDS 0,1 % y dextran sulfato 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1x que contiene EDTA a 55 °C. Las “condiciones moderadamente rigurosas” se describen por, pero sin limitación, las de Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Nueva York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (por ejemplo, temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos rigurosas que las descritas anteriormente. Un ejemplo de condiciones moderadamente rigurosas es incubación durante una noche a 37 °C con una solución que comprende: formamida 20 %, SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), solución de Denhardt 5 x, dextran sulfato 10 % y ADN de esperma de salmón cortado desnaturizado 20 mg/ml, seguido de lavado de los filtros en SSC 1 x a aproximadamente 37-50 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para ajustar los factores tales como longitud de sonda y similares.

Como se usa en el presente documento “para tratar” o “terapéutico” y términos gramaticalmente relacionados, se refieren a cualquier mejora de cualquier consecuencia de enfermedad, tal como supervivencia prolongada, menor morbilidad, y/o una reducción de los efectos secundarios que son los productos secundarios de una modalidad terapéutica alternativa; no se requiere completa erradicación de la enfermedad.

Un “animal transgénico” (por ejemplo, un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, habiéndose introducido el transgén en el animal o un antecesor del animal en una etapa prenatal, por ejemplo, embrionaria. Un “transgén” es un ADN que está integrado en el genoma de una célula de la que se desarrolla un animal transgénico.

Como se usa en el presente documento, una “vacuna” de respuesta inmune celular o HLA es una composición que contiene o codifica uno o más péptidos de la invención. Existen numerosas realizaciones de tales vacunas, tales como un cóctel de uno o más péptidos individuales; uno o más péptidos de la invención comprendidos por un péptido poliepitópico; o ácidos nucleicos que codifican tales péptidos o polipéptidos individuales, por ejemplo, un minigen que codifica un péptido poliepitópico. El “uno o más péptidos” puede incluir cualquier número entero de unidad completa de 1-150 o más, por ejemplo, al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 ó 150 o más péptidos de la invención. Los péptidos o polipéptidos pueden opcionalmente modificarse, tal como por lipídación, adición de dirección u otras secuencias. Los péptidos de HLA de clase I de la invención pueden mezclarse con, o ligarse con, péptidos de HLA de clase II, para facilitar la activación tanto de linfocitos T citotóxicos como de linfocitos T auxiliares. Las vacunas de HLA también pueden comprender células presentadoras de antígenos pulsadas con péptidos, por ejemplo, células dendríticas.

El término “variante” se refiere a una molécula que muestra una variación de un tipo descrito o norma, tal como una proteína que tiene uno o más restos aminoácidos diferentes en la posición o posiciones correspondientes de una proteína específicamente descrita (por ejemplo, la proteína PSCA mostrada en la Figura 2 o Figura 3. Un análogo es un ejemplo de una proteína variante. Son ejemplos adicionales de variantes isoformas de corte y empalme y polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP).

Las “proteínas relacionadas con PSCA” incluyen las identificadas específicamente en el presente documento, así como variantes alélicas, variantes de sustitución conservativa, análogos y homólogos que pueden aislarse/generarse y caracterizarse sin experimentación indebida siguiendo los procedimientos perfilados en el presente documento o fácilmente disponibles en la técnica. Las proteínas de fusión que combinan partes de diferentes proteínas PSCA o fragmentos de las mismas, así como proteínas de fusión de una proteína PSCA y un polipéptido heterólogo también están incluidas. Tales proteínas de PSCA se denominan colectivamente proteínas relacionadas con PSCA, las proteínas de la invención o PSCA. La expresión “proteína relacionada con PSCA” se refiere a un fragmento polipeptídico o una secuencia de proteína de PSCA de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más de 25 aminoácidos; o, al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 ó 576 o más aminoácidos.

Polinucleótidos de PSCA

Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, los polinucleótidos de PSCA de interés en relación con la presente invención son el grupo que consiste en

- 5 (a) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993;
- (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 521 es T;
- (c) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 578 es C;
- 10 (d) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 649 es G;
- (e) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 653 es T;
- 15 (f) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 721 es A;
- (g) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 781 es A;
- (h) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 788 es G;
- 20 (i) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 989 es A; y
- (j) un polinucleótido completamente complementario de un polinucleótido de una cualquiera de (a) a (i);

Estos se corresponden con la variante de transcrito PSCA v.4 (véase Figura 2D), variantes de nucleótidos sencillo de las mismas como se identifica en la Figura 2H y los complementos de la misma.

25 El gen de PSCA humano se mapea en la localización cromosómica expuesta en el ejemplo titulado "Mapeo Cromosómico de PSCA". Por ejemplo, debido a que el gen de PSCA se mapea en este cromosoma, los polinucleótidos que codifican diferentes regiones de las proteínas PSCA se usan para caracterizar anomalías citogenéticas de esta localización cromosómica, tales como anomalías que se identifican como asociadas con diversos cánceres. En ciertos genes, se ha identificado una diversidad de anomalías cromosómicas incluyendo reordenamientos como anomalías citogenéticas frecuentes en varios cánceres diferentes (véase, por ejemplo, 30 Krajinovic, y col., *Mutat. Res.* 382(3-4): 81-83 (1998); Johansson, y col., *Blood* 86(10): 3905-3914 (1995) y Finger, y col., *P.N.A.S.* 85(23): 9158-9162 (1988)). Por lo tanto, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de las proteínas PSCA proporcionan nuevas herramientas que pueden usarse para delinear, con mayor precisión de lo que era posible previamente, anomalías citogenéticas en la región cromosómica que codifica PSCA que pueden 35 contribuir al fenotipo maligno. En este contexto, estos polinucleótidos satisfacen una necesidad de la técnica para expandir la sensibilidad de exploración cromosómica para identificar anomalías cromosómicas más sutiles y menos habituales (véase, por ejemplo, Evans y col., *Am. J. Obstet. Gynecol* 171(4): 1055-1057 (1994)).

Como se ha observado anteriormente, puesto que se mostró que PSCA se expresaba en gran medida en próstata y otros cánceres, se usan polinucleótidos de PSCA en procedimientos que evalúan el estado de los productos génicos de PSCA en tejidos cancerosos frente a normales. Típicamente, los polinucleótidos que codifican regiones 40 específicas de las proteínas PSCA se usan para evaluar la presencia de perturbaciones (tales como deleciones, inserciones, mutaciones puntuales o alteraciones que dan como resultado pérdida de un antígeno, etc.) en regiones específicas del gen de PSCA, tales como regiones que contienen uno o más motivos. Los ensayos ejemplares incluyen ensayos de RT-PCR así como análisis de polimorfismo de conformación monocatenaria (SSCP) (véase, por 45 ejemplo, Marrogi, y col., *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378 (1999), ambos de los cuales utilizan polinucleótidos que codifican regiones específicas de una proteína para examinar estas regiones dentro de la proteína.

Cebadores y pares de cebadores

Pueden usarse cebadores y pares de cebadores para amplificar polinucleótidos para detección de acuerdo con la invención. Pueden marcarse sondas para dicha detección con un marcador detectable, tal como, por ejemplo, un 50 radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Tales sondas y cebadores se usan para detectar la presencia de un polinucleótido de PSCA en una muestra y como medio para detectar una célula que expresa una proteína PSCA.

Los ejemplos de tales sondas incluyen polinucleótidos que comprenden toda o parte de la secuencia de ADNc de PSCA humana mostrada en la Figura 2. Los ejemplos de pares de cebadores capaces de amplificar específicamente 55 ARNm de PSCA también se describen en los ejemplos. Como se entenderá por el experto en la materia, pueden prepararse muchos cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento y usarse de forma eficaz para amplificar y/o detectar un ARNm de PSCA.

Aislamiento de moléculas de ácido nucleico que codifican PSCA.

Las secuencias de ADNc de PSCA descritas en el presente documento permiten el aislamiento de otros polinucleótidos que codifican producto o productos génicos de PSCA, así como el aislamiento de polinucleótidos que codifican homólogos del producto génico de PSCA, isoformas de corte y empalme alternativo, variantes alélicas y formas mutantes de un producto génico de PSCA así como polinucleótidos que codifican análogos de proteínas relacionadas con PSCA. Se conocen bien diversos procedimientos de clonación molecular que pueden emplearse para aislar ADNc de longitud completa que codifican un gen de PSCA (véase, por ejemplo, Sambrook, J. y col., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel y col., Eds., Wiley y Sons, 1995). Por Ejemplo, pueden emplearse de forma conveniente metodologías de clonación de fago lambda, usando sistemas de clonación disponibles en el mercado (por ejemplo, Lambda ZAP Express, Stratagene). Pueden identificarse clones de fagos que contienen ADNc del gen de PSCA explorando con un ADNc de PSCA marcado o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, puede sintetizarse un ADNc de PSCA (por ejemplo, Figura 2) o una parte del mismo y usarse como una sonda para recuperar ADNc de longitud completa y solapantes correspondientes a un gen de PSCA. Un gen de PSCA en sí mismo puede aislarse por exploración de bibliotecas de ADN genómico, bibliotecas de cromosomas artificiales de bacterias (BAC), bibliotecas de cromosomas artificiales de levadura (YAC), y similares, con sondas o cebadores de ADN de PSCA.

Proteínas relacionadas con PSCA

Como se ha indicado anteriormente en el presente documento, las proteínas relacionadas con PSCA de interés en relación con la presente invención son el grupo representado por las secuencias de SEC ID N^o: 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 (véase Figura 3C y Figuras 3E y 3L).

Pueden generarse proteínas relacionadas con PSCA usando tecnología de síntesis peptídica convencional o usando procedimientos de escisión química bien conocidos en la materia. Como alternativa, pueden usarse procedimientos recombinantes para generar moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína relacionada con PSCA.

Una diversidad de referencias refleja la técnica con respecto a la identificación de epítomos en una proteína de interés. Véase, por ejemplo, documento WO 97/33602 de Chesnut, y col.; Sette, Immunogenetics 1999 50(3-4): 201-212; Sette, y col., J. Immunol. 2001 166(2): 1389-1397; Sidney y col., Hum. Immunol. 1997 58(1): 12-20; Kondo y col., Immunogenetics 1997 45(4): 249-258; Sidney y col., J. Immunol. 1996 157(8): 3480-90; y Falk y col., Nature 351: 290-6 (1991); Hunt y col., Science 255: 1261-3 (1992); Parker y col., J. Immunol. 149:3580-7 (1992); Parker y col., J. Immunol. 152:163-75 (1994); Kast y col., 1994 152(8): 3904-12; Borrás-Cuesta y col., Hum. Immunol. 2000 61(3): 266-278; Alexander y col., J. Immunol. 2000 164(3); 164(3): 1625-1633; Alexander y col., PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan, y col., J. Immunol. 1991 147(8): 2663-2669; Alexander y col., Immunity 1994 1(9): 751-761 y Alexander y col., Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92.

Usos de proteínas relacionadas con PSCA

Puesto que PSCA está altamente expresado en próstata y otros cánceres, se usan proteínas relacionadas con PSCA como se ha observado anteriormente en procedimientos que evalúan el estado de los productos génicos de PSCA en tejidos cancerosos frente a normales, elucidando de este modo el fenotipo maligno. Típicamente, se usan polipéptidos de regiones específicas de una proteína de PSCA para evaluar la presencia de perturbaciones (tales como deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, etc.) en esas regiones (tales como regiones que contienen uno o más motivos). Ensayos ejemplares utilizan anticuerpos.

Los fragmentos/subsecuencias de proteína PSCA son particularmente útiles en la generación y caracterización de anticuerpos específicos de dominio (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítomo extracelular o intracelular de una proteína PSCA), para identificar agentes o factores celulares que se unen a PSCA o un dominio estructural particular del mismo, y en diversos contextos terapéuticos y de diagnóstico, incluyendo pero sin limitación, ensayos de diagnóstico, vacunas de cáncer y procedimientos para preparar tales vacunas.

Las proteínas codificadas por los genes de PSCA, o por análogos, homólogos o fragmentos de los mismos, tienen una diversidad de usos, incluyendo pero sin limitación generar anticuerpos y en procedimientos para identificar ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se unen a producto génico de PSCA. Los anticuerpos inducidos contra una proteína PSCA o fragmentos de la misma son útiles en los ensayos de diagnóstico y pronóstico, y las metodologías de formación de imágenes en el tratamiento de cánceres humanos caracterizados por expresión de proteína PSCA, tales como los enumerados en la Tabla I. Tales anticuerpos pueden expresarse de forma intracelular y usarse en procedimientos para tratar pacientes con tales cánceres. También se usan proteínas o ácidos nucleicos relacionados con PSCA en la generación de respuestas HTL o CTL.

Se usan diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas PSCA, incluyendo pero sin limitación diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), procedimientos inmunocitoquímicos y similares. Los anticuerpos pueden marcarse y usarse como reactivos de formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar células que expresan PSCA (por ejemplo en procedimientos de formación de imágenes radioescintigráficas). También son

particularmente útiles proteínas PSCA en la generación de vacunas de cáncer, como se describe adicionalmente en el presente documento.

Anticuerpos de PSCA

5 Los anticuerpos de interés en relación con presente invención se unen específicamente a PSCA v.4 o una variante de la misma como se ha observado anteriormente y no se unen (o se unen débilmente) a péptidos o proteínas que no son proteínas relacionadas con PSCA en condiciones fisiológicas. En este contexto, los ejemplos de condiciones fisiológicas incluyen: 1) solución salina tamponada con fosfato; 2) solución salina tamponada con Tris que contiene Tris 25 mM y NaCl 150 mM, o solución salina normal (NaCl 0,9 %); 4) suero animal tal como suero humano; o 5) una combinación de cualquiera de 1) a 4); teniendo lugar preferentemente estas reacciones a pH 7,5, como alternativa en un intervalo de pH de 7,0 a 8,0 o como alternativa en un intervalo de pH de 6,5 a 8,5; teniendo lugar además estas reacciones a una temperatura entre 4 °C y 37 °C.

Los anticuerpos de PSCA son particularmente útiles en ensayos de pronósticos y diagnóstico de cáncer (véase, por ejemplo, Tabla I), y metodologías de formación de imágenes.

15 Los ensayos inmunológicos de acuerdo con la invención pueden comprender uno o más anticuerpos de PSCA capaces de reconocer y unir una proteína relacionada con PSCA, según sea apropiado. Estos ensayos se realizan dentro de diversos formatos de ensayo inmunológicos bien conocidos en la técnica, incluyendo pero sin limitación diversos tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), y similares.

20 Además, también se proporcionan procedimientos de formación de imágenes inmunológicas capaces de detectar cáncer de próstata y otros cánceres que expresan PSCA por la invención, incluyendo pero sin limitación procedimientos de formación de imágenes radioescintigráficas usando anticuerpos de PSCA marcados. Tales ensayos son clínicamente útiles en la detección, control y pronóstico de cánceres que expresan PSCA tales como cáncer de próstata.

25 También se usan anticuerpos de PSCA en procedimientos para purificar una proteína relacionada con PSCA y para aislar homólogos de PSCA y moléculas relacionadas. Por ejemplo, un procedimiento para purificar una proteína relacionada con PSCA comprende incubar un anticuerpo de PSCA, que se ha acoplado a una matriz sólida, con un lisado u otra solución que contenga una proteína relacionada con PSCA en condiciones que permitan al anticuerpo de PSCA unirse a la proteína relacionada con PSCA; lavar la matriz sólida para eliminar impurezas; y eluir la proteína relacionada con PSCA del anticuerpo acoplado. Otros usos de anticuerpos de PSCA incluyen generar anticuerpos antiidiotípicos que imitan una proteína de PSCA.

30 Se conocen bien en la técnica diversos procedimientos para la preparación de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos inmunizando un huésped mamífero adecuado usando una proteína relacionada con PSCA, péptido o fragmento en forma aislada o inmunoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow y Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Además, también pueden usarse proteínas de fusión de PSCA, tales como una proteína de fusión de PSCA con GST. En una realización particular, se produce una proteína de fusión de GST que comprende toda o la mayoría de la secuencia de aminoácidos de la Figura 2 o Figura 3, después se usa como un inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. En otra realización, se sintetiza y se usa una proteína relacionada con PSCA como un inmunógeno.

35 Además, se usan técnicas de inmunización de ADN desnudo conocidas en la materia (con o sin proteína relacionada con PSCA purificada o células que expresan PSCA) para generar una respuesta inmune al inmunógeno codificado (para revisión, véase Donnelly y col., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

40 La secuencia de aminoácidos de una proteína PSCA como se muestra en la Figura 2 o Figura 3 puede analizarse para seleccionar regiones específicas de la proteína PSCA para generar anticuerpos. Por ejemplo, se usan análisis de hidrofobicidad e hidrofilia de una secuencia de aminoácidos de PSCA para identificar regiones hidrófilas en la estructura de PSCA. Las regiones de una proteína PSCA que muestran estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, pueden identificarse fácilmente usando otros procedimientos diversos conocidos en la técnica, tales como análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf. Pueden generarse perfiles de hidrofilia usando el procedimiento de Hopp, T.P. y Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828. Pueden generarse perfiles hidropáticos usando el procedimiento de Kyte, J. y Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132. Pueden generarse perfiles de porcentaje (%) de restos accesibles usando el procedimiento de Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Pueden generarse perfiles de flexibilidad media usando el procedimiento de Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Pueden generarse perfiles de giro beta usando el procedimiento de Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. Por lo tanto, cada región identificada por cualquiera de estos programas o procedimientos está dentro del alcance de la presente invención. Los procedimientos para la generación de anticuerpos de PSCA se ilustran adicionalmente por medio de los ejemplos proporcionados en el presente documento. Se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar una proteína o polipéptido para su uso como un inmunógeno. También se conocen bien en la técnica procedimientos para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo, tal

como BSA, KLH u otra proteína vehículo. En algunas circunstancias, se usa conjugación directa usando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otros casos son eficaces reactivos de ligación tales como los proporcionados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL. La administración de un inmunógeno de PSCA con frecuencia se realiza por inyección durante un periodo de tiempo adecuado y con uso de un adyuvante adecuado, como se entiende en la técnica. Durante el programa de inmunización, pueden tomarse las titulaciones de anticuerpos para determinar la adecuación de la formación de anticuerpos.

Pueden producirse anticuerpos monoclonales de PSCA por diversos medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, se preparan líneas celulares inmortalizadas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado usando la tecnología de hibridoma convencional de Kohler y Milstein o modificaciones que inmortalizan los linfocitos B productores de anticuerpos, como se conoce generalmente. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados se exploran mediante inmunoensayo en el que el antígeno es una proteína relacionada con PSCA. Cuando se identifica el cultivo celular inmortalizado apropiado, las células pueden expandirse y pueden producirse anticuerpos a partir de cultivos *in vitro* o de fluido ascítico.

Los anticuerpos o fragmentos para su uso de acuerdo con la invención también pueden producirse por medios recombinantes. También pueden producirse regiones que se unen específicamente a la regiones deseadas de una proteína PSCA en el contexto de anticuerpos a los que se ha injertado región determinante de complementariedad (CDR) o quiméricos de origen de múltiples especies. También pueden producirse anticuerpos de PSCA humanizados o humanos y se prefieren para su uso en contextos terapéuticos. Se conocen bien procedimientos para humanizar anticuerpos murinos u otros no humanos, sustituyendo secuencias de anticuerpos humanos correspondientes con una o más CDR de anticuerpo no humano (véase por ejemplo, Jones y col., 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann y col., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen y col., 1988, Science 239: 1534-1536). Véase también, Carter y col., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 y Sims y col., 1993, J. Immunol. 151: 2296.

Los procedimientos para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos incluyen procedimientos de presentación de fagos y transgénicos (para revisión, véase Vaughan y col., 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539). Pueden generarse anticuerpos monoclonales de PSCA completamente humanos usando tecnologías de clonación que emplean grandes bibliotecas combinatorias de genes de Ig humanos (es decir, presentación de 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 in Man, Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, pág. 45-64 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. *Id.*, pág. 65-82). También pueden producirse anticuerpos monoclonales de PSCA completamente humanos usando ratones transgénicos modificados por ingeniería genética para contener loci de genes de inmunoglobulina humana como se describe en la Solicitud de Patente de PCT WO 98/24893, Kucherlapati y Jakobovits y col., publicada el 3 de diciembre de 1997 (véase también, Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs 7(4): 607-614; Patentes de Estados Unidos 6.162.963 presentada el 19 de diciembre de 2000; 6.150.584 presentada el 12 de noviembre de 2000; y 6.114.598 presentada el 5 de septiembre de 2000). Este procedimiento evita la manipulación *in vitro* requerida con tecnología de presentación de fagos y produce eficazmente anticuerpos humanos auténticos de alta afinidad.

La reactividad de anticuerpos de PSCA con una proteína relacionada con PSCA puede establecerse por varios medios bien conocidos, incluyendo transferencia de Western, inmunoprecipitación, análisis de ELISA y FACS usando, según sea apropiado, proteínas relacionadas con PSCA, células que expresan PSCA o extractos de las mismas. Puede marcarse un anticuerpo de PSCA o fragmento del mismo con un marcador detectable o conjugarse con una segunda molécula. Los marcadores detectables adecuados incluyen, pero sin limitación, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente, compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima. Además, se generan anticuerpos biespecíficos específicos para dos o más epítopos de PSCA usando procedimientos generalmente conocidos en la técnica. También pueden generarse anticuerpos homodiméricos por técnicas de entrecruzamiento conocidas en la materia (por ejemplo, Wolff y col., Cancer Res. 53: 2560-2565).

Procedimientos para la detección de PSCA

El perfil de expresión de PSCA lo hace un marcador de diagnóstico para enfermedad metastatizada. En consecuencia, el estado de productos génicos de PSCA proporciona información útil para predecir una diversidad de factores incluyendo susceptibilidad a enfermedad de etapa avanzada, tasa de progresión y/o agresividad del tumor. Como se ha analizado en detalle en el presente documento, el estado de los productos génicos de PSCA en las muestras de los pacientes puede analizarse por una diversidad de protocolos que se conocen bien en la técnica incluyendo análisis inmunohistoquímico, la diversidad de técnicas de transferencia de Northern incluyendo hibridación *in situ*, análisis de RT-PCR (por ejemplo en muestras microdisecionadas de captura de láser), análisis de transferencia de Western y análisis de matriz tisular.

Más particularmente, la invención proporciona ensayos para la detección de polinucleótidos de PSCA en una muestra biológica, tal como suero, hueso, próstata y otros tejidos, orina, semen, preparaciones celulares y similares. Los polinucleótidos de PSCA detectables incluyen, por ejemplo, un gen de PSCA o fragmento del mismo, ARNm de PSCA, ARNm de PSCA variante de corte y empalme alternativo y moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido de PSCA. Se conocen bien en la técnica varios procedimientos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos de PSCA y pueden emplearse en la práctica de este aspecto de la

invención.

En una realización, un procedimiento para detectar un ARNm de PSCA en una muestra biológica comprende producir ADNc de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando un polinucleótido de PSCA como cebadores sentido y antisentido para amplificar ADNc de PSCA en el mismo; y detectar la presencia del ADNc de PSCA amplificado. Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del ADNc de PSCA amplificado.

En otra realización, un procedimiento para detectar un gen de PSCA en una muestra biológica comprende primero aislar ADN genómico de la muestra; amplificar el ADN genómico aislado usando polinucleótidos de PSCA como cebadores sentido y antisentido; y detectar la presencia del gen de PSCA amplificado. Puede diseñarse cualquier variedad de combinaciones de sonda sentido y antisentido apropiadas a partir de una secuencia de nucleótidos de PSCA (véase, por ejemplo, Figura 2) y usarse para este fin.

La invención también proporciona ensayos para detectar la presencia de una proteína de PSCA en un tejido u otra muestra biológica tal como suero, semen, hueso, próstata, orina, preparaciones celulares y similares. Los procedimientos para detectar una proteína relacionada con PSCA también se conocen bien e incluyen, por ejemplo, inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de transferencia de Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, un procedimiento para detectar la presencia de una proteína relacionada con PSCA en una muestra biológica comprende primero poner en contacto la muestra con un anticuerpo de PSCA, un fragmento sensible a PSCA del mismo, o una proteína recombinante que contiene una región de unión a antígeno de un anticuerpo de PSCA; y después detectar la unión de proteína relacionada con PSCA en la muestra.

Los procedimientos para identificar una célula que expresa PSCA también están dentro del alcance de la invención. En una realización, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen de PSCA comprende detectar la presencia de ARNm de PSCA en la célula. Se conocen bien procedimientos para la detección de ARNm particulares e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación que usan sondas de ADN complementario (tal como hibridación *in situ* usando ribosondas de PSCA marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácido nucleico (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para PSCA y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares. Como alternativa, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen de PSCA comprende detectar la presencia de proteína relacionada con PSCA y en la célula o secretada por la célula. Se conocen bien en la técnica diversos procedimientos para la detección de proteínas y se emplean para la detección de proteínas relacionadas con PSCA y células que expresan proteínas relacionadas con PSCA.

El análisis de expresión de PSCA también es útil como una herramienta para identificar y evaluar agentes que modulan la expresión génica de PSCA. Por ejemplo, la expresión de PSCA se regula positivamente de forma significativa en cáncer de próstata, y se expresa en cánceres de los tejidos enumerados en la Tabla I. La identificación de una molécula o agente biológico que inhibe la expresión de PSCA o su sobreexpresión en células cancerosas es de valor terapéutico. Por ejemplo, un agente tal puede identificarse usando una exploración que cuantifica expresión de PSCA por RT-PCR, hibridación de ácidos nucleicos o unión de anticuerpos.

Procedimientos para Controlar el Estado de Genes relacionados con PSCA y Sus Productos

Se sabe que la oncogénesis es un proceso multietapa en el que el crecimiento celular se desregula progresivamente y las células progresan de un estado fisiológico normal a un estado precanceroso y después canceroso (véase, por ejemplo, Alers y col., Lab Invest. 77(5): 437-438 (1997) e Isaacs y col., Cancer Surv. 23: 19-32 (1995)). En este contexto, la examinación de una muestra biológica con respecto a pruebas de crecimiento celular desregulado (tal como expresión de PSCA aberrante en cánceres) permite detección temprana de una fisiología aberrante tal, antes de que un estado patológico tal como cáncer haya progresado a una etapa en la que las opciones terapéuticas son más limitadas y/o el pronóstico es peor. En tales examinaciones, el estado de PSCA en una muestra biológica de interés puede compararse, por ejemplo, con el estado de PSCA en una muestra normal correspondiente (por ejemplo, una muestra de ese individuo o como alternativa otro individuo que no está afectado por una patología). Una alteración en el estado de PSCA en la muestra biológica (en comparación con la muestra normal) proporciona pruebas de crecimiento celular desregulado. Además de usar una muestra biológica que no está afectada por una patología como una muestra normal, también puede usarse un valor normativo predeterminado tal como un nivel normal predeterminado de expresión de ARNm (véase, por ejemplo, Grever y col., J. Comp. Neurol. 1996 9 Dic; 376(2): 306-14 y Patente de Estados Unidos N° 5.837.501) para comparar el estado de PSCA en una muestra.

El término "estado" en este contexto se usa de acuerdo con su significado aceptado en la técnica y se refiere a la condición o estado de un gen y sus productos. Típicamente, los expertos en la materia usan varios parámetros para evaluar la condición o estado de un gen y sus productos. Estos incluyen, pero sin limitación la localización de productos génicos expresados (incluyendo la localización de células que expresan PSCA) así como el nivel, y actividad biológica de productos génicos expresados (tales como ARNm, polinucleótidos y polipéptidos de PSCA). Típicamente, una alteración en el estado de PSCA comprende un cambio en la localización de PSCA y/o células que expresan PSCA y/o un aumento de la expresión de ARNm y/o proteínas de PSCA.

El estado de PSCA en una muestra puede analizarse por varios medios bien conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación, análisis inmunohistoquímico, hibridación *in situ*, análisis de RT-PCR en muestras microdisseccionadas por captura de láser, análisis de transferencia de Western y análisis de matriz tisular. Se encuentran protocolos típicos para evaluar el estado de un gen de PSCA y productos génicos, por ejemplo en Ausubel y col. eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, unidades 2 (Transferencia de Northern), 4 (Transferencia de Southern), 15 (Inmunotransferencia) y 18 (Análisis de PCR). Por lo tanto, el estado de PSCA en una muestra biológica se evalúa por diversos procedimientos utilizados por los expertos en la materia incluyendo, pero sin limitación análisis genómico de Southern (para examinar, por ejemplo perturbaciones en un gen de PSCA), análisis de Northern y/o análisis de PCR de ARNm de PSCA (para examinar, por ejemplo alternaciones en las secuencias polinucleotídicas o niveles de expresión de ARNm de PSCA), y análisis inmunohistoquímicos y/o de Western (para examinar, por ejemplo, alteraciones en secuencias polipeptídicas, alteraciones en la localización de los polipéptidos dentro de una muestra, alteraciones en los niveles de expresión de proteínas de PSCA y/o asociaciones de proteínas de PSCA con compañeros de unión polipeptídicos). Los polinucleótidos de PSCA detectables incluyen, por ejemplo, un gen de PSCA o fragmento del mismo, ARNm de PSCA, variantes de corte y empalme alternativo, ARNm de PSCA y moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido de PSCA.

El perfil de expresión de PSCA lo hace un marcador de diagnóstico para enfermedad local y/o metastatizada, y proporciona información sobre el crecimiento o el potencial oncogénico de una muestra biológica. En particular, el estado de PSCA proporciona información útil para predecir susceptibilidad a etapas de enfermedad particulares, progresión y/o agresividad tumoral. La invención proporciona procedimientos y ensayos para determinar el estado de PSCA y diagnosticar cánceres que expresen PSCA, tales como cánceres de los tejidos enumerados en la Tabla I. Por ejemplo, debido a que el ARNm de PSCA está tan altamente expresado en próstata y otros cánceres en relación con tejido protático normal, pueden usarse ensayos que evalúen los niveles de transcritos de ARNm o proteínas de PSCA en una muestra biológica para diagnosticar una enfermedad asociada con desregulación de PSCA y pueden proporcionar información de pronóstico útil en la definición de opciones terapéuticas apropiadas.

El estado de expresión de PSCA proporciona información que incluye la presencia, etapa y localización de células displásicas, precancerosas y cancerosas, que predicen la susceptibilidad a diversas etapas de enfermedad, y/o para calibrar la agresividad del tumor. Además, el perfil de expresión lo hace útil como un reactivo de formación de imágenes para enfermedad metastatizada. En consecuencia, un aspecto de la invención se refiere a los diversos procedimientos de pronóstico y diagnóstico moleculares para examinar el estado de PSCA en muestras biológicas tales como las de individuos que padecen, o se sospecha que padecen, una patología caracterizada por crecimiento celular desregulado, tal como cáncer.

Como se ha descrito anteriormente, el estado de PSCA en una muestra biológica puede examinarse por varios procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el estado de PSCA en una muestra biológica tomada de una localización específica en el cuerpo puede examinarse evaluando la muestra con respecto a la presencia o ausencia de células que expresan PSCA (por ejemplo, las que expresan proteínas o ARNm de PSCA). Esta examinación puede proporcionar pruebas de crecimiento celular desregulado, por ejemplo, cuando se encuentran células que expresan PSCA en una muestra biológica que normalmente no contiene tales células (tal como un ganglio linfático), debido a que tales alteraciones en el estado de PSCA en una muestra biológica con frecuencia se asocian con crecimiento celular desregulado. Específicamente, un indicador de crecimiento desregulado es la metástasis de células cancerosas desde un órgano de origen (tal como la próstata) a un área diferente del cuerpo (tal como un ganglio linfático). En este contexto, las pruebas de crecimiento celular desregulado son importantes por ejemplo porque pueden detectarse metástasis de ganglios linfáticos ocultas en una proporción sustancial de pacientes con cáncer de próstata y tales metástasis se asocian con predictores conocidos de progresión de enfermedad (véase, por ejemplo, Murphy y col., Prostate 42(4): 315-317 (2000); Su y col., Semin. Surg. Oncol. 18(1): 17-28 (2000) y Freeman y col., J Urol ago 195 154(2 Pt 1): 474-8).

En un aspecto, la invención proporciona procedimientos para controlar los productos génicos de PSCA determinando el estado de los productos génicos de PSCA expresados por células de un individuo sospechoso de tener una enfermedad asociada con crecimiento celular desregulado (tal como hiperplasia o cáncer) y comparando después el estado determinado de este modo con el estado de productos génicos de PSCA en una muestra normal correspondiente. La presencia de productos génicos de PSCA aberrantes en la muestra de ensayo en relación con la muestra normal proporciona un indicio de la presencia de crecimiento celular desregulado dentro de las células del individuo.

De forma más general como se ha indicado anteriormente en el presente documento, la invención proporciona ensayos útiles para determinar la presencia de cáncer en un individuo, que comprende detectar un aumento significativo de la expresión de proteína o ARNm de PSCA en una muestra tisular o celular de ensayo en relación con los niveles de expresión en el tejido o célula normal correspondiente. La presencia de ARNm de PSCA puede, por ejemplo, evaluarse en tejidos incluyendo pero sin limitación los enumerados en la Tabla I. La presencia de expresión de PSCA significativa en cualquiera de estos tejidos es útil para indicar la aparición, presencia y/o gravedad de un cáncer, puesto que los tejidos normales correspondientes no expresan ARNm de PSCA o lo expresan a niveles más bajos.

En una realización relacionada, el estado de PSCA se determina en el nivel proteico en lugar de en el nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, un procedimiento tal comprende determinar el nivel de proteína PSCA expresada por células en una muestra de tejido de ensayo y comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de PSCA expresado en una muestra normal correspondiente. En una realización, la presencia de proteína PSCA se evalúa, por ejemplo, usando procedimientos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos de PSCA o compañeros de unión capaces de detectar expresión de proteína PSCA se usan en una diversidad de formatos de ensayo bien conocidos en la técnica para este fin.

Adicionalmente, puede examinarse el estado de metilación de un gen de PSCA en una muestra biológica. Con frecuencia se produce desmetilación y/o hipermetilación aberrante de islas de CpG en regiones reguladoras génicas 5' en células inmortalizadas y transformadas, y puede dar como resultado expresión alterada de diversos genes. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de la glutatión S-transferasa de clase pi (una proteína expresada en próstata normal pero no expresada en >90 % de carcinomas de próstata) parece silenciar de forma permanente la transcripción de este gen y es la alteración genómica más frecuentemente detectada en carcinomas de próstata (De Marzo y col., *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985-1992 (1999)). Además, esta alteración está presente en al menos el 70 % de los casos de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) (Brooks y col., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, 7: 531-536). En otro ejemplo, la expresión del gen específico de tumor LAGE-I (que no se expresa en próstata normal pero se expresa en 25-50 % de cánceres de próstata) se induce por desoxiazacitidina en células linfoblastoides, lo que sugiere que la expresión tumoral se debe a desmetilación (Lethe y col., *Int. J. Cancer* 76(6): 903-908 (1998)). Se conoce bien en la técnica una diversidad de ensayos para examinar el estado de metilación de un gen. Por ejemplo, se puede utilizar, en enfoques de hibridación de Southern, enzimas de restricción sensibles a metilación que no pueden escindir secuencias que contienen sitios CpG metilados para evaluar el estado de metilación de islas CpG. Además, la MSP (PCR específica de metilación) puede perfilar rápidamente el estado de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla de CpG de un gen dado. Este procedimiento implica modificación inicial de ADN por bisulfito sódico (que convertirá todas las citosinas no metiladas a uracilo) seguido de amplificación usando cebadores específicos para ADN no metilado frente a metilado. Pueden encontrarse protocolos que implican interferencia de metilación por ejemplo en *Current Protocols In Molecular Biology*, unidad 12, Frederick M. Ausubel y col. eds., 1995.

La amplificación génica es un procedimiento adicional para evaluar el estado de PSCA. La amplificación génica se mide en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Northern o transferencia de Southern convencional para cuantificar la transcripción de ARNm (Thomas, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205), transferencia puntual (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada de forma apropiada, basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento. Como alternativa, se emplean anticuerpos que reconocen dobles cadenas específicas, incluyendo dobles cadenas de ADN, dobles cadenas de ARN y dobles cadenas híbridas de ADN-ARN o dobles cadenas de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez se marcan y el ensayo se lleva a cabo cuando la doble cadena está unida a una superficie de modo que tras la formación de la doble cadena en la superficie, la presencia de anticuerpo unido a la doble cadena puede detectarse.

Puede ensayarse convenientemente tejido biopsiado o sangre periférica con respecto a la presencia de células cancerosas usando por ejemplo, análisis de Northern, transferencia puntual o RT-PCR para detectar expresión de PSCA. La presencia de ARNm de PSCA amplificable por RT-PCR proporciona un indicio de la presencia de cáncer. Los ensayos de RT-PCR se conocen bien en la técnica. Los ensayos de detección de RT-PCR para células tumorales en sangre periférica se están evaluando actualmente para su uso en el diagnóstico y tratamiento de varios tumores sólidos humanos. En el campo de cáncer de próstata, estos incluyen ensayos de RT-PCR para la detección de células que expresan PSA y PSM (Verkaik y col., 1997, *Urol. Res.* 25: 373-384; Ghossein y col., 1995, *J. Clin. Oncol.* 13:1195-2000; Heston y col., 1995, *Clin. Chem.* 41:1687-1688).

Un aspecto adicional de la invención es una evaluación de la susceptibilidad que un individuo tiene para desarrollar cáncer. En una realización, un procedimiento para predecir la susceptibilidad de cáncer comprende detectar ARNm de PSCA o proteína de PSCA en una muestra tisular, indicando su presencia susceptibilidad a cáncer, en el que el grado de expresión de ARNm de PSCA se correlaciona con el grado de susceptibilidad. En una realización específica, la presencia de PSCA en próstata u otro tejido se examina, proporcionando la presencia de PSCA en la muestra un indicio de susceptibilidad a cáncer de próstata (o la aparición o existencia de un tumor prostático). De forma similar, se puede evaluar la integridad de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PSCA en una muestra biológica, para identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares. La presencia de una o más perturbaciones en los productos génicos de PSCA en la muestra es un indicio de susceptibilidad a cáncer (o la aparición o existencia de un tumor).

La invención también comprende procedimientos para calibrar la agresividad del tumor. En una realización, un procedimiento para calibrar la agresividad de un tumor comprende determinar el nivel de ARNm de PSCA o proteína de PSCA expresada por células tumorales, comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de ARNm de PSCA o proteína de PSCA expresada en un tejido normal correspondiente tomado del mismo individuo o una muestra de referencia de tejido normal, en el que el grado de expresión de ARNm de PSCA o proteína de PSCA en la muestra tumoral en relación con la muestra normal indica el grado de agresividad. En una realización específica, la agresividad de un tumor se evalúa determinando el grado en que se expresa PSCA en las células tumorales, indicando los niveles de expresión más altos tumores más agresivos. Otra realización es la evaluación de la

integridad de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos de PSCA en una muestra biológica, para identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares. La presencia de una o más perturbaciones indica tumores más agresivos.

5 Otra realización de la invención se refiere a procedimientos para observar la progresión de un tumor maligno en un individuo a lo largo del tiempo. En una realización, los procedimientos para observar la progresión de un tumor maligno en un individuo a lo largo del tiempo comprenden determinar el nivel de ARNm de PSCA o proteína de PSCA expresado por células en una muestra del tumor, comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de ARNm de PSCA o proteína de PSCA expresado en una muestra tisular equivalente tomada del mismo individuo en un momento diferente, en los que el grado de expresión de ARNm de PSCA o proteína de PSCA en la muestra tumoral 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 expresión de PSCA en las células tumorales a lo largo del tiempo, indicando un aumento de la expresión a lo largo del tiempo una progresión del cáncer. Además, se puede evaluar la integridad de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PSCA en una muestra biológica para identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas de estas moléculas tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, indicando la presencia de una o más perturbaciones una progresión del cáncer.

Los enfoques de diagnóstico anteriores pueden combinarse con uno cualquiera de una amplia diversidad de protocolos de pronóstico y diagnóstico conocidos en la materia. Por ejemplo, otra realización de la invención se refiere a procedimientos para observar una coincidencia entre la expresión de productos génicos de PSCA y gen de PSCA (o perturbaciones en el gen de PSCA y productos génicos de PSCA) y un factor que se asocia con tumor maligno, como medio para diagnosticar y pronosticar el estado de una muestra tisular. Puede utilizarse una amplia diversidad de factores asociados con tumores malignos, tales como la expresión de genes asociados con tumor maligno (por ejemplo expresión de PSA, PSCA y PSM para cáncer de próstata, etc.) así como observaciones citológicas globales (véase, por ejemplo, Bocking y col., 1984, Anal. Quant Cytol. 6(2): 74-88; Epstein, 1995, Hum. Pathol. 26 (2): 223-9; Thorson y col., 1998, Mod Pathol. 11(6): 543-51; Baisden y col., 1999, Am. J. Surg. Pathol. 23(8): 918-24). Los procedimientos para observar una coincidencia entre la expresión de gen de PSCA y productos génicos de PSCA (o perturbaciones en el gen de PSCA y productos génicos de PSCA) y otro factor que se asocia con tumor maligno son útiles, por ejemplo, porque la presencia de un conjunto de factores específicos que coinciden con enfermedad proporciona información crucial para diagnosticar y pronosticar el estado de una muestra tisular.

30 En una realización, los procedimientos para observar una coincidencia entre la expresión de gen de PSCA y productos génicos de PSCA (o perturbaciones en gen de PSCA y productos génicos de PSCA) y de otro factor asociado con tumor maligno implican detectar la sobreexpresión de ARNm o proteína de PSCA en una muestra tisular, detectar la sobreexpresión de ARNm o proteína de PSA en una muestra tisular (o expresión de PSCA o PSM) y observar una coincidencia de sobreexpresión de ARNm o proteína de PSCA y ARNm o proteína de PSA (o expresión de PSCA o PSM). En una realización específica, la expresión de ARNm de PSA y PSCA en tejido de próstata se examina, indicando la coincidencia de sobreexpresión de ARNm de PSCA y PSA en la muestra la existencia de cáncer de próstata, susceptibilidad a cáncer de próstata o la aparición o estado de un tumor prostático.

Se describen en el presente documento procedimientos para detectar y cuantificar la expresión de ARNm o proteína de PSCA y se conocen bien en la técnica tecnologías de detección y cuantificación de proteínas y ácidos nucleicos convencionales. Los procedimientos convencionales para la detección y cuantificación de ARNm de PSCA incluyen hibridación *in situ* usando ribosondas de PSCA marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas usando sondas de polinucleótidos de PSCA, análisis de RT-PCR usando cebadores específicos para PSCA y otros procedimientos de detección de tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares. En una realización específica, se usa RT-PCR semicuantitativa para detectar y cuantificar la expresión de ARNm de PSCA. Puede usarse cualquier variedad de cebadores capaces de amplificar PSCA para este fin, incluyendo pero sin limitación los diversos conjuntos de cebadores específicamente descritos en el presente documento. En una realización específica, pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales específicamente reactivos con la proteína de PSCA de tipo silvestre en un ensayo inmunohistoquímico de tejido biopsiado.

Realizaciones de diagnóstico y pronóstico de PSCA.

50 Como se desvela en el presente documento, los polinucleótidos, polipéptidos y anticuerpos antipolipéptidos de PSCA se usan en ensayos de diagnóstico bien conocidos que examinan las condiciones asociadas con crecimiento celular desregulado tal como cáncer, en particular los cánceres enumerados en la Tabla I (véase, por ejemplo, tanto su patrón específico de expresión tisular como su sobreexpresión en ciertos cánceres como se describe por ejemplo en el ejemplo titulado "análisis de expresión de PSCA en tejidos normales y muestras de ensayo de pacientes").

55 Puede realizarse analogía de PSCA con un antígeno asociado a próstata PSA, el marcador arquetípico que se ha usado por los practicantes médicos durante años para identificar y controlar la presencia de cáncer de próstata (véase, por ejemplo, Merrill y col., J. Urol. 163(2): 503-5120 (2000); Polascik y col., J. Urol. Aug; 162(2): 293-306 (1999) y Fortier y col., J. Nat. Cancer Inst. 91 (19): 1635-1640(1999)). También se usa una diversidad de otros marcadores de diagnóstico en contextos similares incluyendo p53 y K-ras (véase, por ejemplo, Tulchinsky y col., Int J Mol Med 4 Jul 1999 (1): 99-102 y Minimoto y col., Cancer Detect Prev 2000; 24(1): 1-12). Por lo tanto, la presente

divulgación de polinucleótidos y polipéptidos de PSCA (así como sondas polinucleotídicas de PSCA y anticuerpos anti-PSCA usados para identificar la presencia de estas moléculas) y sus propiedades permite a los expertos en la materia utilizar estas moléculas en procedimientos que son análogos a los usados, por ejemplo, en una diversidad de ensayos de diagnóstico dirigidos a examinar afecciones asociadas con cáncer.

- 5 Las realizaciones típicas de procedimientos de diagnóstico que utilizan los polinucleótidos, polipéptidos, linfocitos T sensibles y anticuerpos de PSCA son análogas a los procedimientos de ensayos de diagnóstico bien establecidos, que emplean, por ejemplo, polinucleótidos, polipéptidos, linfocitos T sensibles y anticuerpos de PSA. Por ejemplo, al igual que se usan polinucleótidos de PSA como sondas (por ejemplo en análisis de Northern, véase, por ejemplo, Sharief y col., *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33(3): 567-74(1994)) y cebadores (por ejemplo en análisis de PCR, véase, por ejemplo Okegawa y col., *J. Urol.* 163(4): 1189-1190 (2000)) para observar la presencia y/o el nivel de ARNm de PSA en procedimientos de control de la sobreexpresión de PSA o la metástasis de cánceres de próstata, los polinucleótidos de PSCA descritos en el presente documento pueden utilizarse de la misma manera para detectar sobreexpresión de PSCA o la metástasis de cánceres de próstata y otros que expresan este gen. Como alternativa, al igual que se usan polipéptidos de PSA para generar anticuerpos específicos para PSA que después pueden usarse para observar la presencia y/o el nivel de proteínas de PSA en procedimientos para controlar la sobreexpresión de proteína de PSA (Stephan y col., *Urology* 55(4): 560-3 (2000)) o la metástasis de células de próstata (véase, por ejemplo, Alanen y col., *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-7 (1996)), los polipéptidos de PSCA descritos en el presente documento pueden utilizarse para generar anticuerpos para su uso en la detección de sobreexpresión de PSCA o la metástasis de células de próstata y células de otros cánceres que expresan este gen.
- 20 Específicamente, debido a que las metástasis implican el movimiento de células cancerosas de un órgano de origen (tal como el pulmón o la glándula prostática, etc.) a un área diferente del cuerpo (tal como un ganglio linfático), pueden usarse ensayos que examinan una muestra biológica con respecto a la presencia de células que expresan polinucleótidos y/o polipéptidos de PSCA para proporcionar pruebas de metástasis. Por ejemplo, cuando se descubre que una muestra biológica de tejido que normalmente no contiene células que expresan PSCA (ganglio linfático) contiene células que expresan PSCA tal como la expresión de PSCA vista en LAPC4 y LAPC9, xenotransplantes aislados de ganglio linfático y metástasis de hueso, respectivamente, este hallazgo es indicativo de metástasis.

- Como alternativa, pueden usarse polinucleótidos y/o polipéptidos de PSCA para proporcionar pruebas de cáncer, por ejemplo, cuando se descubre que células en una muestra biológica que normalmente no expresa PSCA o expresa PSCA a nivel diferente expresan PSCA o tienen una expresión aumentada de PSCA (véase, por ejemplo, la expresión de PSCA en los cánceres enumerados en la Tabla I y en muestras de paciente, etc. mostrada en las Figuras adjuntas). En tales ensayos, los expertos pueden desear generar adicionalmente pruebas complementarias de metástasis ensayando la muestra biológica con respecto a la presencia de un segundo marcador restringido a tejido (además de PSCA) tal como PSA, PSCA etc. (véase, por ejemplo, Alanen y col., *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)).

- El uso de inmunohistoquímica para identificar la presencia de un polipéptido de PSCA dentro de una sección tisular puede indicar un estado alterado de ciertas células dentro de ese tejido. Se entiende bien en la técnica que la capacidad de un anticuerpo para localizarse en un polipéptido que se expresa en células cancerosas es una manera de diagnosticar presencia de enfermedad, etapa de enfermedad, progresión y/o agresividad del tumor. Un anticuerpo tal también puede detectar una distribución alterada del polipéptido dentro de las células cancerosas, en comparación con tejido no maligno correspondiente.

- El polipéptido de PSCA y las composiciones inmunogénicas también son útiles a la vista de los fenómenos de localización de proteína subcelular alterada en patologías. La alteración de células de estado normal a enfermo provoca cambios en la morfología celular y con frecuencia se asocia con cambios de la localización/distribución de proteínas subcelulares. Por ejemplo, las proteínas de membrana celular que se expresan de una manera polarizada en células normales pueden alterarse en enfermedad, dando como resultado distribución de la proteína de una manera no polar sobre la superficie celular completa.

- El fenómeno de localización de proteínas subcelulares alteradas en una patología se ha demostrado con expresión de proteína MUC1 y Her2 mediante el uso de medios inmunohistoquímicos. Las células epiteliales normales tienen una distribución apical típica de MUC1, además de cierta localización supranuclear de la glucoproteína, mientras que las lesiones malignas con frecuencia demuestran un patrón de tinción apolar (Diaz y col, *The Breast Journal*, 7: 40-45 (2001); Zhang y col, *Clinical Cancer Research*, 4: 2669-2676 (1998); Cao, y col, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45: 1547-1557 (1997)). Además, el epitelio de mama normal es negativo para proteína Her2 o muestra solamente una distribución basolateral mientras que las células malignas pueden expresar la proteína sobre la superficie celular completa (De Potter, y col, *International Journal of Cancer*, 44: 969-974 (1989); McCormick, y col, 117: 935-943 (2002)). Como alternativa, la distribución de la proteína puede alterarse de una localización solamente en superficie hasta incluir expresión citoplásmica difusa en el estado enfermo. Un ejemplo tal puede verse con MUC1 (Diaz, y col, *The Breast Journal*, 7: 40-45 (2001)).

- La alteración de la localización/distribución de una proteína en la célula, como se detecta por procedimientos inmunohistoquímicos, también puede proporcionar información valiosa con respecto a la conveniencia de ciertas

modalidades de tratamiento. Este último punto se ilustra por una situación en la que una proteína puede ser intracelular en tejido normal, pero de superficie celular en células malignas; la localización en superficie celular hace a las células favorablemente susceptibles a regímenes de tratamiento y diagnóstico basado en anticuerpos. Cuando se produce una alteración tal de la localización de la proteína para PSCA, la proteína PSCA y las respuestas inmunes relacionadas con la misma son muy útiles. En consecuencia, la capacidad para determinar si la alteración de la localización de proteína subcelular se produjo para 24P4C12 hace a la proteína PSCA y respuestas inmunes relacionadas con la misma muy útiles. El uso de las composiciones de PSCA permite a los expertos en la materia realizar importantes decisiones de diagnóstico y terapéuticas.

Los reactivos inmunohistoquímicos específicos para PSCA también son útiles para detectar metástasis de tumores que expresan PSCA cuando el polipéptido aparece en tejidos en los que normalmente no se produce PSCA.

Al igual que los fragmentos de polinucleótidos de PSA y variantes de polinucleótidos se emplean por los expertos en la materia para su uso en procedimientos para controlar PSA, se usan fragmentos de polinucleótidos y variantes de polinucleótidos de PSCA de una manera análoga. En particular, los polinucleótidos de PSA típicos usados en procedimientos para controlar PSA son sondas o cebadores que consisten en fragmentos de la secuencia de ADNc de PSA. Ilustrando esto, los cebadores usados para amplificar por PCR un polinucleótido de PSA deben incluir menos de la secuencia de PSA completa para actuar en la reacción en cadena de la polimerasa. En el contexto de dichas reacciones de PCR, los expertos en la materia generalmente crean una diversidad de fragmentos polinucleotídicos diferentes que pueden usarse como cebadores para amplificar diferentes partes 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 y col., *Methods Mol. Biol.* 98: 121-154 (1998)). Una ilustración adicional del uso de tales fragmentos se proporciona en el ejemplo titulado "Análisis de expresión de PSCA en tejidos normales y muestras de ensayo de pacientes", en el que se usa un fragmento de polinucleótido de PSCA como una sonda para mostrar la expresión de ARN de PSCA en células cancerosas. Además, se usan típicamente secuencias polinucleotídicas variantes como cebadores y sondas para los ARNm correspondientes en PCR y análisis de Northern (véase, por ejemplo, Sawai y col., *Fetal Diagn. Ther.* Nov-Dic 1996 11(6): 407-13 y *Current Protocols In Molecular Biology*, Volumen 2, Unidad 2, Frederick M. Ausubel y col. eds., 1995). Los fragmentos de polinucleótidos y variantes son útiles en este contexto cuando son capaces de unirse a una secuencia polinucleotídica diana (por ejemplo, un polinucleótido de PSCA mostrado en la Figura 2 o una variante del mismo) en condiciones de alta rigurosidad.

Además, los polipéptidos de PSA que contienen un epítipo que puede reconocerse por un anticuerpo o linfocito T que se une específicamente a ese epítipo se usan en procedimientos para controlar PSA. Los fragmentos de polipéptidos y análogos de polipéptidos de PSCA o variantes también pueden usarse de una manera análoga. Esta práctica de usar fragmentos polipeptídicos o variantes polipeptídicas para generar anticuerpos (tales como anticuerpos anti-PSA o linfocitos T) es típica en la técnica usándose una amplia diversidad de sistemas tales como proteínas de fusión por los practicantes (véase, por ejemplo, *Current Protocols In Molecular Biology*, Volumen 2, Unidad 16, Frederick M. Ausubel y col. eds., 1995). En este contexto, cada epítipo actúa para proporcionar la arquitectura con la que es reactivo un anticuerpo o linfocito T. Típicamente, los expertos en la materia crean una diversidad de diferentes fragmentos polipeptídicos que pueden usarse para generar respuestas inmunes específicas para diferentes partes de un polipéptido de interés (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 5.840.501 y Patente de Estados Unidos Nº 5.939.533). Por ejemplo puede ser preferible utilizar un polipéptido que comprende uno de los motivos biológicos de PSCA analizados en el presente documento o una subsecuencia que porta motivo que se identifica fácilmente por un experto en la materia basándose en motivos disponibles en la técnica. Los fragmentos, variantes o análogos de polipéptidos son típicamente útiles en este contexto siempre que comprendan un epítipo capaz de generar un anticuerpo o un linfocito T específico para una secuencia polipeptídica diana (por ejemplo, un polipéptido de PSCA mostrado en la Figura 3).

Como se muestra en el presente documento, los polinucleótidos y polipéptidos de PSCA (así como las sondas polinucleotídicas de PSCA y anticuerpos anti-PSCA o linfocitos T usados para identificar la presencia de estas moléculas) muestran propiedades específicas que los hacen útiles en el diagnóstico de cánceres tales como los enumerados en la Tabla I. Los ensayos de diagnóstico que miden la presencia de productos génicos de PSCA, para evaluar la presencia o aparición de una enfermedad descrita en el presente documento, tal como cáncer de próstata, se usan para identificar pacientes con respecto a medidas preventivas o control adicional, como se ha hecho de forma exitosa con PSA. Además, estos materiales satisfacen una necesidad de la técnica de moléculas que tengan características similares o complementarias a PSA en situaciones en las que, por ejemplo, no pueda realizarse un diagnóstico definitivo de metástasis de origen prostático basándose en un ensayo solamente para PSA (véase, por ejemplo, Alanen y col., *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)), y en consecuencia, necesitan emplearse materiales tales como polinucleótidos y polipéptidos de PSCA (así como las sondas polinucleotídicas de PSCA y anticuerpos anti-PSCA usados para identificar la presencia de estas moléculas) para confirmar una metástasis de origen prostático.

Finalmente, además de su uso en ensayos de diagnóstico, los polinucleótidos de PSCA desvelados en el presente documento tienen varias otras utilidades tales como su uso en la identificación de anomalías cromosómicas asociadas oncogénicas en la región cromosómica en la que se mapea el gen de PSCA (véase el Ejemplo titulado "Mapeo Cromosómico de PSCA" posteriormente). Además, aparte de su uso en ensayos de diagnóstico, los

polinucleótidos y proteínas relacionadas con PSCA desveladas en el presente documento tienen otras utilidades tales como su uso 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).

Kits

5 Para llevar a cabo un procedimiento de diagnóstico de la invención, puede proporcionarse un kit. Tales kits pueden comprender un vehículo, envase, o recipiente que está compartimentalizado para recibir uno o más recipientes tales como frascos, tubos, y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados para usar en el procedimiento, junto con una etiqueta o prospecto que comprende instrucciones para su uso, tal como un
 10 uso descrito en el presente documento. Por ejemplo, el recipiente o recipientes pueden comprender una sonda que está marcada o puede marcarse de forma detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico de una proteína o un gen o mensaje de la invención, respectivamente. Cuando el procedimiento utiliza hibridación de ácido nucleico para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen nucleótido o nucleótidos para amplificación de la secuencia de ácido nucleico diana. Los kits pueden comprender un recipiente que comprende un indicador, tal como una proteína de unión a biotina, tal como avidina o
 15 estreptavidina unida a una molécula indicadora, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioisótopo; puede usarse un indicador tal con, por ejemplo, un ácido nucleico o anticuerpo. El kit puede incluir todas o parte de las secuencias de aminoácidos apropiadas de la Figura 2 o Figura 3, o una molécula de ácido nucleico que codifique tales secuencias de aminoácidos.

20 Un kit comprenderá típicamente el recipiente descrito anteriormente y uno o más otros recipientes asociados con el mismo que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo por ejemplo, tampones, diluyentes, etiquetas de tubo que enumeran los contenidos y/o instrucciones de uso, y prospectos con instrucciones de uso.

Ejemplos

25 Los siguientes ejemplos ilustran la invención en la medida en que se refiere a PSCA v.4 y procedimientos de diagnóstico como se reivindican ahora.

Ejemplo 1: Aislamiento Generado por SSH de Fragmento de ADNc del Gen de PSCA

Omitido intencionalmente

Ejemplo 2: Aislamiento de ADNc que Codifica PSCA de Longitudinal Completa

Omitido intencionalmente

30 **Ejemplo 3: Mapeo Cromosómico de PSCA**

Omitido intencionalmente

Ejemplo 4:

Análisis de Expresión de Variantes de PSCA en Tejidos Normales y Muestras de Ensayo de Pacientes

35 Previamente, PSCA, denominado en el presente documento PSCA v.1, se identificó como un antígeno expresado en cáncer de próstata. Su expresión se detectó en más del 80 % de cánceres de próstata primarios y la mayoría de metástasis de próstata. También se ha mostrado que se expresa en cáncer de vejiga, cáncer de ovario y cáncer pancreático; estos cánceres se enumeran en la Tabla I. Por análisis inmunohistoquímicos se ha mostrado que PSCA se sobreexpresa en la superficie celular de la mayoría de carcinomas transicionales uroteliales, y en el 60 % de los adenocarcinomas pancreáticos primarios. Los datos de expresión de PSCA se han presentado en publicaciones de
 40 patente (PCT/US98/04664, PCT/US/28883, PCT/US00/19967) y en artículos con revisión por pares (Saffran y col., Proc Natl Acad Sci USA. 27 Feb 2001; 98(5): 2658-2663; Amara y col., Cancer Res. 15 Jun 2001; 61(12): 4660-65; Reiter y col., Proc Natl Acad Sci USA. 17 Feb 1998; 95(4): 1735-40; Argani y col., Cancer Res. 1 Jun 2001; 61(11): 4320-24).

45 La expresión específica de diferentes variantes de PSCA se estudió en muestras de ensayo de pacientes de cáncer y normales (Figura 14 y Figura 15). Se diseñaron cebadores para diferenciar entre PSCA v.1/v.2/v.4, PSCA v.3 y PSCA v.5. PSCA v.1/v.2/v.4 conducen a un producto de PCR de 425 pb, PSCA v.3 conduce a un producto PCR de 300 pb, mientras que PSCA v.5 conduce a un producto de PCR de 910 pb de tamaño (Figura 14A).

50 Se preparó ADNc de primera cadena a partir de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normal, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer de páncreas (Figura 14B). Se realizó normalización por PCR usando cebadores para actina. Se realizó PCR semicuantitativa, usando los cebadores específicos de variantes a 30 ciclos de amplificación.

Los resultados muestran expresión de PSCA v.5 principalmente en cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer de páncreas, y a nivel más bajo en cáncer de colon y cáncer de pulmón. Se detectó producto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 en cáncer de próstata, cáncer de vejiga, cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer de páncreas. Entre los tejidos normales, se detectó producto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 solamente en próstata, estómago y a nivel más bajo en riñón y pulmón, mientras que no se detectó PSCA v.5 en ningún tejido normal. No se detectó producto detectado por PCR de PSCA v.3 en ninguna de las muestras ensayadas.

Se diseñaron cebadores para diferenciar entre PSCA v.4 y PSCA v.5 (Figura 15A). PSCA v.4 conduce a un producto de PCR de 460 pb, mientras que PSCA v.5 conduce a un producto de PCR de 945 pb de tamaño.

Se preparó ADNc de primera cadena de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normal, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo de multixenotransplante (xenotransplantes de cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de vejiga) (Figura 15B). Se realizó normalización por PCR usando cebadores para actina. Se realizó PCR semicuantitativa, usando los cebadores específicos variantes a 30 ciclos de amplificación.

Los resultados muestran expresión de PSCA v.4 en cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo multixenotransplante, riñón y próstata normales. Se detectó PSCA v.5 solamente en próstata normal y cáncer de vejiga.

La expresión restringida de variantes de PSCA en tejidos normales y la expresión detectada en muestras de ensayo de pacientes de cáncer indican que las variantes de PSCA son dianas terapéuticas, de pronóstico, de laboratorio, profilácticas y de diagnóstico para cánceres humanos.

Ejemplo 5: Variantes de Transcrito de PSCA

Como se usa en el presente documento, el término variante incluye variantes de transcrito y polimorfismos de nucleótido sencillo (SNP). Las variantes de transcrito son variantes de ARNm maduro del mismo gen que surgen por transcripción alternativa o corte y empalme alternativo. Los transcritos alternativos son transcritos del mismo gen pero inician la transcripción en puntos diferentes. Las variantes de corte y empalme son variantes de ARNm cortadas y empalmadas de forma diferente a partir del mismo transcrito. En eucariotas, cuando se transcribe un gen multiexónico a partir de ADN genómico, el ARN inicial se corta y empalma para producir ARNm funcional, que solamente tiene exones y se usa para traducción en una secuencia de aminoácidos. En consecuencia, un gen dado puede tener de cero a muchos transcritos alternativos y cada transcrito puede tener de cero a muchas variantes de corte y empalme. Cada variante de transcrito tiene una composición exónica única y puede tener diferentes partes codificantes y/o no codificantes (extremo 5' o 3'), del transcrito original. Las variantes de transcrito pueden codificar las mismas, similares o diferentes proteínas, teniendo dichas proteínas la misma o una función similar o una función diferente. Las proteínas variantes pueden expresarse en el mismo tejido a la vez, en un tejido diferente a la vez o en el mismo tejido en momentos diferentes o en un tejido diferente en un momento diferente. Las proteínas codificadas por una variante de transcrito pueden tener localizaciones subcelulares o extracelulares similares o diferentes (por ejemplo, secretada frente a intracelular).

Se identifican variantes de transcrito por una diversidad de procedimientos aceptados en la técnica. Por ejemplo, se identifican transcritos alternativos y variantes de corte y empalme por clonación de longitud completa o mediante el uso de transcrito de longitud completa y secuencias de EST. En primer lugar todos los EST humanos se agruparon en grupos que muestran identidad directa o indirecta entre sí. En segundo lugar, los EST en el mismo grupo se agruparon adicionalmente en subgrupos y se ensamblaron en una secuencia consenso. La secuencia génica original se compara con la secuencia o secuencias consenso u otras secuencias de longitud completa. Cada secuencia consenso es una variante de corte y empalme potencial para ese gen. Se conocen en la técnica varias modalidades de confirmación, tales como identificación de la variante por análisis de Northern, clonación de longitud completa o mediante el uso de bibliotecas de sondas, etc. Incluso cuando se identifica una variante que no es aún un clon de longitud completa, esa parte de la variante es muy útil como una herramienta de investigación, por ejemplo, para generación de antígenos o para clonación adicional de la variante de corte y empalme de longitud completa, usando técnicas conocidas en la materia.

Además, están disponibles en la técnica programas informáticos que identifican variantes de transcrito basándose en secuencias genómicas. Los programas de identificación de variantes de transcritos con base genómica incluyen FgenesH (A. Salamov y V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA," *Genome Research*. Abril de 2000; 10(4): 516-22); Grail (URL compbio. ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm) y GenScan (LTRI, genes.mit.edu/GENSCAN.html). Para un análisis general de protocolos de identificación de variantes de corte y empalme véase, por ejemplo, Southan, C., A genomic perspective on human proteases, *FEBS Lett.* 8 Jun 2001; 498(2-3): 214-8; de Souza, S.J., y col., Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags, *Proc. Natl Acad Sci USA.* 7 Nov 2000; 97(23): 12690-3.

Para confirmar adicionalmente los parámetros de una variante de transcrito, están disponibles en la materia una diversidad de técnicas, tales como clonación de longitud completa, validación proteómica, validación basada en PCR

y validación de RACE 5', etc. (véase por ejemplo, Validación Proteómica: Brennan, S.O., y col., Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, *Biochem Biophys Acta*. 17 Ago 1999;1433(1-2): 321-6; Ferranti P, y col., Differential splicing of premessenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, *EurJBiochem*. 1997 Oct 1;249(1):1-7. Para validación basada en PCR: Wellmann S, y col., Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology, *Clin Chem*. Abr 2001;47(4): 654-60; Jia, H.P., y col., Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, *Gene*. 24 Ene 2001; 263(1-2): 211-8. Para validación basada en PCR y de RACE 5': Validation: Brigle, K.E., y col., Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, *Biochem Biophys Acta*. 7 Ago 1997; 1353(2): 191-8).

10 Se conoce en la técnica que las regiones genómicas están moduladas en cánceres. Cuando la región genómica en la que se mapea un gen está modulada en un cáncer particular, los transcritos alternativos o las variantes de corte y empalme del gen también se modulan. Se desvela en el presente documento que PSCA tiene un perfil de expresión particular en relación con cáncer (véase, por ejemplo, Tabla I). También están implicados transcritos alternativos y variantes de corte y empalme de PSCA en cánceres, por ejemplo en uno o más de estos tejidos y también en ciertos tejidos adicionales. Las variantes actúan por lo tanto como marcadores/antígenos asociados con tumor.

15 Usando el gen de PSCA de longitud completa junto con secuencias de EST, se identificaron cuatro variantes de transcrito adicionales, designadas PSCA v.2, v.3, v.4 y v.5. Los límites de los exones en el transcrito original, PSCA v.1 se mostraron en la Tabla IV. Las estructuras esquemáticas de las secuencias de ácidos nucleicos variantes del transcrito se muestran en la Figura 10. En la Figura 10, las barras con el mismo patrón gráfico representan tramos de material genético contiguo, por ejemplo, las barras negras designan secuencia genómica hallada en la variante 1.

20 Tablas V(a) - (d) a VIII(a) - (d) se exponen variante a variante. V(a) - (d) muestra las secuencias de nucleótidos de las variantes de transcrito. La Tabla VI(a) - (d) muestra el alineamiento de las variantes de transcrito con secuencia de ácido nucleico de PSCA v.1 (para v.2 solamente) o con PSCA v.2 (para todas las otras variantes). La Tabla VII(a) - (d) presenta la traducción de aminoácidos de las variantes de transcrito para la orientación de fase de lectura identificada. La Tabla VIII(a) - (d) presenta alineamientos de la secuencia de aminoácidos codificada por la variante de corte y empalme con la de PSCA v.1.

Ejemplo 6: Polimorfismos de Nucleótidos Sencillo de PSCA

30 Un Polimorfismo de Nucleótido Sencillo (SNP) es una variación de par de bases sencillo en una secuencia de nucleótidos en una localización específica. En cualquier punto dado del genoma, hay cuatro posibles pares de bases nucleotídicas: A/T, C/G, G/C y T/A. Como se usa en el presente documento, un alelo es uno de una serie de formas alternativas de un gen dado, que difiere en secuencia de ADN y que afecta a un producto (ARN y/o proteína).

35 Un SNP que se produce en un ADNc se denomina un SNPc. Este SNPc puede cambiar aminoácidos de la proteína codificada por el gen y de este modo cambiar la función de la proteína. Algunos SNP provocan enfermedades hereditarias; otros contribuyen a variaciones cuantitativas de fenotipo y reacciones a factores ambientales incluyendo dieta y fármacos entre individuos. Por lo tanto, la existencia de un SNP y/o combinaciones de alelos (llamados haplotipos) tienen muchas aplicaciones útiles, tales como diagnóstico de enfermedades hereditarias, determinación de reacciones farmacológicas y dosificación, identificación de genes responsables de enfermedades y análisis de la relación genética ente individuos (P. Nowotny, J. M. Kwon y A. M. Goate, "SNP analysis to dissect human traits," *Curr. Opin. Neurobiol*. Oct 2001; 11(5):637-641; M. Pirmohamed y B. K. Park, "Genetic susceptibility to adverse drug reactions," *Trends Pharmacol. Sci*. Jun 2001; 22(6): 298-305; J. H. Riley, C. J. Allan, E. Lai y A. Roses, "The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes," *Pharmacogenomics*. Feb 2000; 1(1): 39-47; R. Judson, J. C. Stephens y A. Windemuth, "The predictive power of haplotypes in clinical response," *Pharmacogenomics*. Feb 2000; 1(1): 15-26).

45 Los SNP se identifican por una diversidad de procedimientos aceptados en la técnica (P. Bean, "The promising voyage of SNP target discovery," *Am. Clin. Lab*. Oct-Nov 2001; 20(9): 18-20; K. M. Weiss, "In search of human variation," *Genome Res*. Jul 1998; 8(7):691-697; M. M. She, "Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies," *Clin. Chem*. Feb 2001; 47(2): 164-172). Por ejemplo, los SNP se identifican secuenciando fragmentos de ADN que muestran polimorfismo por procedimientos basados en gel tales como polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) y electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). También se descubren por secuenciación directa de muestras de ADN agrupadas de diferentes individuos o comparando secuencias de diferentes muestras de ADN. Con la rápida acumulación de datos de secuencias en bases de datos públicas y privadas, también se descubre SNP comparando secuencias usando programas informáticos (Z. Gu, L. Hillier y P. Y. Kwok, "Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace," *Hum. Mutat*. 1998; 12(4): 221-225). Los SNP pueden verificarse y el genotipo o haplotipo de un individuo puede determinarse por una diversidad de procedimientos incluyendo secuenciación directa y micromatrices de alto rendimiento (P. Y. Kwok, "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet*. 2001; 2: 235-258; M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Mathis, B. Erwin, P. Grass, B. Hines y A. Duesterhoeft, "High-throughput SNP genotyping with the Masscode system," *Mol. Diagn*. Dic 2000; 5(4): 329-340).

Usando los procedimientos descritos anteriormente, se identificaron trece SNP en el transcrito para PSCA v.2. Se usó la variante 2, en lugar de por ejemplo la variante 1, porque tenía menos bases ambiguas que la variante 1. En consecuencia, se identificaron SNP en PSCA v.2, en las posiciones 57 (t/c), 367 (c/t), 424 (a/c), 495 (c/g), 499 (c/t), 563 (c/t), 567 (g/a), 627 (g/a), 634 (t/g), 835 (g/a), 847 (g/a), 878 (g/a) y 978 (c/g). Los transcritos o proteínas con alelos alternativos se designaron como PSCA variante v.6 a v.18, como se muestra en la Tabla IX y Figura 12a.

El cambio de nucleótidos en v.6 cambió el codón de partida de v.1 y por lo tanto, la traducción no comenzaría hasta el siguiente ATG (AUG en ARNm), dando como resultado una proteína 9 aminoácidos más corta que la proteína v.1 (Figura 11a). Los cambios de nucleótidos para v.7 y v.8 fueron silenciosos al nivel proteico.

Doce de estos 13 SNP también estaban presentes en la variante 4 como se expone en la Figura 12b y la Tabla IX. Las 12 variantes de SNP en relación con PSCA v.4 se designan PSCA v.19 a v.30. Las variantes 19 a 27 codifican aminoácidos alternativos (Figura 11b y Tabla IX).

La Tabla IX también muestra los cambios de aminoácidos de secuencia proteica. Estos SNP, aunque mostrados individualmente de forma separada en el presente documento, pueden aparecer en diferentes combinaciones y en una cualquiera de las variantes de transcrito que contienen el sitio del SNP.

15 Ejemplo 7: Producción de PSCA Recombinante en Sistemas Procariotas

Para expresar PSCA y variantes de PSCA recombinante en células procariotas, las secuencias de ADNc de PSCA y variante de PSCA de longitud completa o parcial se clonan en uno cualquiera de una diversidad de vectores de expresión conocidos en la técnica. Se expresa una o más de las siguientes regiones de variantes de PSCA: la secuencia de longitud completa presentada en las Figuras 2 y 3 o cualesquiera 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o más aminoácidos contiguos de PSCA, variantes o análogos de los mismos.

A. Construcciones de transcripción y traducción *in vitro*:

pCRII: Para generar sondas de ARN sentido y antisentido de PSCA para investigaciones *in situ* de ARN, se generan construcciones de pCRII (Invitrogen, Carlsbad CA) que codifican todo o fragmentos del ADNc de PSCA. El vector pCRII tiene promotores Sp6 y T7 que flanquean el inserto para dirigir la transcripción de ARN de PSCA para su uso como sondas en experimentos de hibridación *in situ* de ARN. Estas sondas se usan para analizar la expresión celular y tisular de PSCA en el nivel de ARN. El ARN de PSCA transcrito que representa la región codificante de aminoácidos de ADNc del gen de PSCA se usa en sistemas de traducción *in vitro* tales como el Sistema de Lisado Reticular Acoplado TnT™ (Promega, Corp., Madison, WI) para sintetizar proteína PSCA.

B. Construcciones bacterianas:

Construcciones de pGEX: Para generar proteínas PSCA recombinantes en bacterias que se fusionan con la proteína Glutación S-transferasa (GST), toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSC se clona en la familia de pGEX de vectores de fusión de GST (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Estas construcciones permiten la expresión controlada de secuencias proteicas de PSCA recombinantes con GST fusionadas en el extremo amino terminal y un epitopo de seis histidinas (His 6X) en el extremo carboxilo terminal. Los marcadores de GST e His 6X permiten purificación de la proteína de fusión recombinante de bacterias inducidas con la matriz de afinidad apropiada y permiten el reconocimiento de la proteína de fusión con anticuerpos anti-GST y anti-His. El marcador His 6X se genera añadiendo 6 codones de histidina al cebador de clonación en el extremo 3', por ejemplo, de la fase abierta de lectura (ORF). Puede emplearse un sitio de escisión proteolítico, tal como el sitio de reconocimiento PreScission™ en pGEX-6P-1, de modo que permita la escisión del marcador GST de la proteína relacionada con PSCA. El gen de resistencia a ampicilina y origen de pBR322 permite la selección y mantenimiento de los plásmidos pGEX en *E. coli*.

Construcciones de pMAL: Para generar, en bacterias, proteínas de PSCA recombinantes que se fusionan con proteína de unión a maltosa (MBP), toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA se fusionan con el gen de MBP clonando en los vectores pMAL-c2X y pMAL-p2X (New England Biolabs, Beverly, MA). Estas construcciones permiten la expresión controlada de secuencias proteicas de PSCA recombinantes con MBP fusionada en el extremo amino terminal y un marcador epitópico His 6X en el extremo carboxilo terminal. Los marcadores MBP e His 6X permiten la purificación de la proteína recombinante de bacterias inducidas con la matriz de afinidad apropiada y permiten el reconocimiento de la proteína de fusión con anticuerpos anti-MBP y anti-His. El marcador epitópico His 6X se genera añadiendo 6 codones de histidina al cebador de clonación 3'. Un sitio de reconocimiento de factor Xa permite la escisión del marcador pMAL de PSCA. Los vectores pMAL-c2X y pMAL-p2X se optimizan para expresar la proteína recombinante en el citoplasma o periplasma respectivamente. La expresión en periplasma potencia el plegamiento de proteínas con enlaces disulfuro.

Construcciones de pET: Para expresar PSCA en células bacterianas, toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA se clonan en la familia pET de vectores (Novagen, Madison, WI). Estos vectores permiten expresión estrechamente controlada de proteína PSCA recombinante en bacterias con y sin fusión con proteínas que potencian la solubilidad, tales como NusA y tiorredoxina (Trx) y marcadores epitópicos, tales como His

6X y S-Tag™ que ayudan a la purificación y detección de la proteína recombinante. Por ejemplo, se realizan construcciones utilizando el sistema de fusión pET NusA 43.1 de modo que se expresan regiones de la proteína PSCA como fusiones amino terminales con NusA.

C. Construcciones de Levadura:

5 Construcciones de pESC: Para expresar PSCA en la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para generación de proteína recombinante y estudios funcionales, toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA se clonan en la familia de vectores de pESC cada uno de los cuales contiene 1 de 4 marcadores seleccionables, HIS3, TRP1, LEU2 y URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). Estos vectores permiten la expresión controlada del mismo plásmido de hasta 2 genes diferentes o secuencias clonadas que contienen marcadores
10 epítópicos Flag™ o Myc en la misma célula de levadura. Este sistema es útil para confirmar interacciones proteína-proteína de PSCA. Además, la expresión en levadura produce modificaciones post-traduccionales similares, tales como glucosilaciones y fosforilaciones, que se encuentran cuando se expresan en células eucariotas.

Construcciones de pESP: Para expresar PSCA en la especie de levadura *Saccharomyces pombe*, toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA se clonan en la familia de pESP de vectores. Estos vectores
15 permiten alto nivel de expresión controlado de una secuencia proteica de PSCA que se fusiona en uno de los extremos amino terminal o en el extremo carboxilo terminal con GST que ayuda a la purificación de la proteína recombinante. Un marcador epítópico Flag™ permite la detección de la proteína recombinante con anticuerpo anti-flag™.

Ejemplo 8: Producción de PSCA recombinante en Sistemas Eucariotas Superiores

20 Omitido Intencionalmente

Ejemplo 9: Perfiles de Antigenicidad y Estructura Secundaria

La Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C y Figura 9A-C representan gráficamente cinco perfiles de aminoácidos de variantes de PSCA 1, 3 y 4, cada evaluación disponible accediendo al sitio web ProtScale (dirección web www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) en el servidor de biología molecular ExPasy.

25 Estos perfiles: Figura 5, Hidrofilia (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828); Figura 6, Hidropático, (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132); Figura 7, Porcentaje de Restos Accesibles (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); Figura 8, Flexibilidad Media, (Bhaskaran R., y Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); Figura 9, Giro beta (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294); y opcionalmente otros disponibles en la técnica, tales como en el sitio web ProtScale, se usaron para
30 identificar regiones antigénicas de cada una de las proteínas variantes de PSCA. Cada uno de los perfiles de aminoácidos anteriores de variantes de PSCA se generaron usando los siguientes parámetros de ProtScale para análisis: 1) Un tamaño de ventana de 9; 2) 100 % de peso de los extremos de la ventana en comparación con el centro de la ventana; y 3) valores de perfil de aminoácidos normalizados para quedar entre 0 y 1.

35 Se usaron perfiles de Hidrofilia (Figura 5), Hidropáticos (Figura 6) y Porcentaje de Restos Accesibles (Figura 7) para determinar tramos de aminoácidos hidrófilos (es decir, valores mayores de 0,5 en el perfil de Hidrofilia y de Porcentaje de Restos Accesibles y valores menores de 0,5 en el perfil Hidropático). Tales regiones están probablemente expuestas al ambiente acuoso, están presentes en la superficie de la proteína y por lo tanto disponibles para reconocimiento inmune, tal como por anticuerpos.

40 Los perfiles de Flexibilidad Media (Figura 8) y Giro beta (Figura 9) determinan tramos de aminoácidos (es decir, valores mayores de 0,5 en el perfil de Giro beta y el perfil de Flexibilidad Media) que no están restringidos en estructuras secundarias tales como láminas beta y hélices alfa. Tales regiones también tienen más probabilidad de estar expuestas en la proteína y por lo tanto accesibles a reconocimiento inmune, tal como por anticuerpos.

45 Las secuencias antigénicas de las proteínas variantes de PSCA indicadas, por ejemplo, por los perfiles expuestos en Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C y/o Figura 9A-C se usan para preparar inmunógenos, péptidos o ácidos nucleicos que los codifican, para generar anticuerpos anti-PSCA terapéuticos y de diagnóstico. El inmunógeno puede ser de cualquiera de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más de 50 aminoácidos contiguos, o los ácidos nucleicos correspondientes que los codifican, de las variantes de proteína PSCA enumeradas en las Figuras 2 y 3 de las que se muestran los perfiles de aminoácidos en la Figura 9 o pueden inferirse debido a que la variante contiene secuencia que es la misma que una variante
50 representada en la figura 9. En particular, los inmunógenos peptídicos de la invención pueden comprender una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en los perfiles de Hidrofilia de la Figura 5; una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor menor de 0,5 en el perfil Hidropático de la Figura 6; una
55 región peptídica de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en los perfiles de Porcentaje de Restos Accesibles de la Figura 7; una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier

incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en los perfiles de Flexibilidad Media en la Figura 8; y, una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en el Perfil de giro beta de la Figura 9. Los inmunógenos peptídicos de la invención pueden también comprender ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anteriores.

Todos los inmunógenos de la invención, péptido o ácido nucleico, pueden realizarse en forma de dosis unitaria humana, o comprender una composición que incluya un excipiente farmacéutico compatible con la fisiología humana.

La estructura secundaria de las variantes de proteína PSCA 1, 3, 4 y 6, concretamente la presencia y localización predichas de las hélices alfa, hebras extendidas y bucles aleatorios, se predice a partir de la secuencia de aminoácidos primarios usando el procedimiento de Red Neural Jerárquica HNN (NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS Marzo 2000 Vol. 25, Nº 3 [291]:147-150 Combet C., Blanchet C., Geourjon C. y Deléage G., <http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa-nn.html>), al que se accede desde el servidor de biología molecular ExPasy (<http://www.expasy.ch/tools/>). El análisis indica que la variante de PSCA 1 está compuesta de 30,89 % de hélice alfa, 21,95 % de hebra extendida y 47,15 % de bucle aleatorio (Figura 13A). La variante de proteína PSCA 3 está compuesta de 14,89 % de hélice alfa, 8,51 % de hebra extendida y 76,60 % de bucle aleatorio (Figura 13B). La variante de proteína PSCA 4 está compuesta de 9,52 % de hélice alfa, 8,99 % de hebra extendida y 81,48 % de bucle aleatorio (Figura 13C). La variante de proteína PSCA 6 está compuesta de 24,56 % de hélice alfa, 21,93 % de hebra extendida y 53,51 % de bucle aleatorio (Figura 13D).

Se llevó a cabo análisis con respecto a la presencia potencial de dominios transmembrana en las proteínas variantes de PSCA usando una diversidad de algoritmos de predicción transmembrana a los que se accede desde el servidor de biología molecular ExPasy (<http://www.expasy.ch/tools/>). Se muestran gráficamente en la figura 13E, G, I y K los resultados de los análisis de variantes 1, 3, 4 y 6, respectivamente, usando el programa TMPred. Se muestran gráficamente en la figura 13F, H, J y L los resultados de análisis de variantes 1, 3, 4 y 6, respectivamente usando el programa TMHIVIM. Es probable que las proteínas PSCA variante 1 y variante 6 codifiquen proteínas ligadas a GPI. Es probable que las variantes 3 y 4 codifiquen proteínas solubles puesto que no contienen predicciones significativas de dominios transmembrana.

Ejemplo 10: Generación de Anticuerpos Policlonales de PSCA

Puede inducirse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, por una o mas inyecciones de un agente inmunizador y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizador y/o adyuvante se inyectará en el mamífero por múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Además de inmunizar con una variante de proteína PSCA de longitud completa, se emplean algoritmos informáticos en el diseño de inmunógenos que, basándose en el análisis de secuencia de aminoácidos contienen características de ser antigénicos y estar disponibles para reconocimiento por el sistema inmune del huésped inmunizado (véase el ejemplo titulado "Perfiles de Antigenicidad y Estructura Secundaria"). Se predeciría que tales regiones son hidrófilas, flexibles, en conformaciones de giro beta y están expuestas en la superficie de la proteína (véase, por ejemplo, Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C o Figura 9A-C para perfiles de aminoácidos que indican tales regiones de variante de proteína PSCA 1).

Por ejemplo, se usan proteínas o péptidos de fusión bacterianos recombinantes que contienen regiones de giro beta, flexibles, hidrófilas de variantes de proteína PSCA como antígenos para generar anticuerpos policlonales en conejos blancos New Zealand o anticuerpos monoclonales como se describe en el Ejemplo 11. Por ejemplo, en la variante de PSCA 1, tales regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 28-56 y aminoácidos 66-94. Para la variante 3, tales regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 7-39 y aminoácidos 70-94. Para la variante 4, tales regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 6-18, aminoácidos 27-39, aminoácidos 103-133 y 177-189. Para la variante 6, tales regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 19-35 y aminoácidos 57-85. Es útil conjugar el agente inmunizador con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero sin limitación, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina e inhibidor de tripsina de soja. En una realización, un péptido que codifica los aminoácidos 103-133 de la variante de PSCA 4 se conjuga con KLH y se usa para inmunizar un conejo. Como alternativa el agente inmunizador puede incluir todas o partes de las proteínas variantes de PSCA, análogos o proteínas de fusión de las mismas. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de variantes de PSCA pueden fusionarse usando técnicas de ADN recombinante con uno cualquiera de una diversidad de compañeros de proteína de fusión que se conocen bien en la técnica, tales como glutatión-S-transferasa (GST) y proteínas de fusión marcadas con HIS. En una realización, los aminoácidos 18-98 de la secuencia de variante de PSCA 1 se fusionaron con GST usando técnicas recombinantes en el vector de expresión pGEX, se expresaron, se purificaron y se usaron para inmunizar tanto conejos como ratones para generar anticuerpos policlonales y monoclonales respectivamente. Tales proteínas de fusión se purifican a partir de bacterias inducidas usando la matriz de afinidad apropiada.

Otras proteínas de fusión bacteriana recombinantes que pueden emplearse incluyen proteína de unión a maltosa, LacZ, tiorredoxina, NusA o una región constante de inmunoglobulina (véase la sección titulada "Producción de PSCA en Sistemas Procariotas" y Current Protocols In Molecular Biology, Volumen 2, Unidad 16, Frederick M. Ausubul y

col. eds., 1995; Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N. y Ledbetter, L. (1991) *J. Exp. Med* 174, 561-566).

Además de proteínas de fusión derivadas de bacterias, también se usan antígenos proteicos expresados en mamíferos. Estos antígenos se expresan a partir de vectores de expresión de mamíferos tales como los vectores Tag5 y de fusión de Fc (véase la sección titulada "Producción de PSCA Recombinante en Sistemas Eucariotas"), y conservan modificaciones post-traduccionales tales como glucosilaciones halladas en la proteína nativa. En una realización, el ADNc de PSCA variante 1, sin el péptido líder N-terminal y anclaje GPI C-terminal se clonó en el vector de secreción de mamífero Tag5, y se expresó en células 293T. La proteína recombinante se purificó por cromatografía de quelado metálico a partir de sobrenadantes de cultivo tisular de células 293T que expresaban de forma estable el vector recombinante. La proteína PSCA de Tag5 purificada se usó después como inmunógeno.

Durante el protocolo de inmunización, es útil mezclar o emulsionar el antígeno en adyuvantes que potencian la respuesta inmune del animal huésped. Los ejemplos de adyuvantes incluyen, pero sin limitación, adyuvante completo de Freund (CFA) y adyuvante MPL-TDM (monofosforil Lípido A, trehalosa dicorinomicolato sintético).

En un protocolo típico, los conejos se inmunizan inicialmente por vía subcutánea con hasta 200 µg, típicamente 100-200 µg, de proteína de fusión o péptido conjugado con KLH mezclado en adyuvante completo de Freund (CFA). Se inyecta después por vía subcutánea a los conejos cada dos semanas hasta 200 µg, típicamente 100-200µg, del inmunógeno en adyuvante incompleto de Freund (IFA). Se toman extracciones de sangre de ensayo aproximadamente 7-10 días después de cada inmunización y se usan para controlar la titulación del suero por ELISA.

Para ensayar la reactividad y especificidad del suero inmune, tal como suero de conejo derivado de inmunización con una fusión con GST de proteína PSCA variante 3 ó 4, el ADNc de la variante de PSCA de longitud completa respectiva se clona en vector de expresión pCDNA 3.1 myc-his (Invitrogen, véase el Ejemplo titulado "Producción de PSCA Recombinante en Sistemas Eucariotas"). Después de la transfección de las construcciones en células 293T, se exploran lisados celulares con el suero antivariante y con anticuerpo anti-His (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) para determinar la reactividad específica a proteína variante desnaturalizada usando la técnica de transferencia de Western. Además, el suero inmune se ensaya por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo e inmunoprecipitación frente a 293T y otras células que expresan variante de PSCA recombinante para determinar el reconocimiento específico de la proteína nativa. También se llevan a cabo técnicas de transferencia de Western, inmunoprecipitación, microscopía fluorescente y citometría de flujo usando células que expresan de forma endógena PSCA para ensayar la reactividad y especificidad.

Se purifica antisuero de conejos inmunizados con proteínas de fusión variantes de PSCA, tales como proteínas de fusión GST y MBP, por agotamiento de anticuerpos reactivos a la secuencia compañera de fusión por pase sobre una columna de afinidad que contiene el compañero de fusión solo o en el contexto de una proteína de fusión irrelevante. Por ejemplo, se purifica en primer lugar antisuero derivado de una proteína de fusión GST-PSCA variante 1 por pase sobre una columna de proteína GST acoplada covalentemente con matriz de AffiGel (BioRad, Hercules, Calif.). El antisuero se purifica por afinidad después mediante pase sobre una columna compuesta de proteína de fusión MBP-PSCA acoplada covalentemente a matriz de Affigel. El suero se purifica adicionalmente después por cromatografía de afinidad por proteína G para aislar la fracción de IgG. Se purifican por afinidad sueros de otros antígenos marcados con His y conejos inmunizados con péptidos así como sueros con agotamiento de compañero de fusión por pase sobre una matriz de columna compuesta del inmunógeno proteico original o péptido libre.

Ejemplo 11: Generación de Anticuerpos Monoclonales (mAb) de PSCA

En una realización, los mAb terapéuticos para variantes de PSCA comprenden los que reaccionan con epítomos específicos para cada proteína variante o específicos para secuencias en común entre las variantes que interrumpirían o modularían la función biológica de las variantes de PSCA, por ejemplo las que interrumpirían la interacción con ligandos y compañeros de unión. Los inmunógenos para generación de tales mAb incluyen los diseñados para codificar o contener la secuencia de la variante de proteína PSCA completa, regiones de las variantes de proteína PSCA que se predice que son antigénicas a partir de análisis informático de la secuencia de aminoácidos (véase, por ejemplo, Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C o Figura 9A-C, y el Ejemplo titulado "Perfiles de Antigenicidad"). Los inmunógenos incluyen péptidos, proteínas bacterianas recombinantes y proteínas Tag5 expresadas en mamíferos y proteínas de fusión de FC de IgG murinas y humanas. Además, se usan células modificadas por ingeniería genética para expresar altos niveles de una variante de PSCA respectiva, tal como células Pre-B murinas de 300.19-PSCA variante 4 o 293T-PSCA variante 4, para inmunizar ratones.

Para generar mAb para una variante de PSCA, se inmunizaron en primer lugar por vía intraperitoneal (IP) a los ratones con, típicamente, 10-50 µg de inmunógeno proteico o 10^7 células que expresan PSCA mezcladas en adyuvante completo de Freund. Después los ratones se inmunizan posteriormente IP cada 2-4 semanas con, típicamente, 10-50 µg de inmunógeno proteico o 10^7 células mezcladas en adyuvante incompleto de Freund. Como alternativa, se usa adyuvante MPL-TDM en inmunizaciones. Además de las estrategias de inmunización basadas en células y proteínas anteriores, se emplea un protocolo de inmunización basado en ADN en el que se usa un vector

de expresión de mamíferos que codifica una secuencia de variante de PSCA para inmunizar ratones por inyección directa del ADN plasmídico. Por ejemplo, el ADNc completo de PSCA de la variante 4 se clona en el vector de secreción de mamíferos Tag5 y el vector recombinante se usará después como inmunógeno. En otro ejemplo se clonan los mismos aminoácidos en un vector de secreción de fusión de Fc en el que la secuencia de PSCA variante 4 se fusiona en el extremo amino terminal con una secuencia líder de IgK y en el extremo carboxilo terminal con la secuencia codificante de la región Fc de IgG humana o murina. Este vector recombinante se usa después como inmunógeno. Los protocolos de inmunización de plásmidos se usan en combinación con proteínas purificadas expresadas a partir del mismo vector y con células que expresan la variante de PSCA respectiva.

Durante el protocolo de inmunización, se toman extracciones de sangre de ensayo 7-10 días después de una inyección para controlar la titulación y especificidad de la respuesta inmune. Una vez que se ha obtenido reactividad y especificidad apropiadas según se determina por análisis de ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, microscopía de fluorescencia y citometría de flujo, se lleva a cabo después fusión y generación de hibridoma con procedimientos establecidos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

En una realización para generar anticuerpos monoclonales de PSCA, se expresa una fusión de GST del antígeno de la variante 4 que codifica los aminoácidos 1-189 y después se purifica a partir de células 293T transfectadas de forma estable. Se inmunizan inicialmente por vía intraperitoneal ratones Balb C con 25 µg de la proteína GST-PSCA variante 4 mezclada en adyuvante completo de Freund. Se inmunizan posteriormente los ratones cada dos semanas con 25 µg del antígeno mezclado en adyuvante incompleto de Freund durante un total de tres inmunizaciones. El ELISA que usa el antígeno de fusión GST y un producto de escisión del que se retira la parte GST determina la titulación del suero de ratones inmunizados. La reactividad y especificidad del suero a proteína PSCA variante 4 de longitud completa se controla por transferencia de Western, inmunoprecipitación y citometría de flujo usando células 293T transfectadas con un vector de expresión que codifica el ADNc de PSCA variante 1 (véase por ejemplo, el Ejemplo titulado "Producción de PSCA Recombinante en Sistemas Eucariotas"). También se usan otras células que expresan PSCA variante 4 recombinante o células que expresan de forma endógena PSCA variante 4. Se deja reposar a los ratones que muestran la reactividad más fuerte y se les proporciona una inyección final de antígeno Tag5 en PBS y después se sacrifican 4 días más tarde. Los bazo de los ratones sacrificados se recogen y se fusionan con células de mieloma SPO/2 usando procedimientos convencionales (Harlow y Lane, 1988). Los sobrenadantes de pocillos de crecimiento seleccionados con HAT se exploran por ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, microscopía fluorescente y citometría de flujo para identificar clones productores de anticuerpo específico de PSCA.

Para generar anticuerpos monoclonales que sean específicos para proteína PSCA variante 4, se diseñan inmunógenos para codificar la secuencia única de esa variante. Por ejemplo, se sintetiza un péptido que codifica los aminoácidos 6-18 de PSCA variante 4, conjugado con KLH y se usa como inmunógeno. Se exploran después sobrenadantes de hibridoma en el antígeno peptídico y después se exploran adicionalmente en células que expresan la proteína PSCA variante 4 y se exploran de forma cruzada en células que expresan las otras variantes de PSCA para derivar anticuerpos monoclonales específicos de variante 4.

La afinidad de unión de un anticuerpo monoclonal de PSCA variante se determina usando tecnologías convencionales. Las mediciones de afinidad cuantifican la fuerza de unión de anticuerpo con epítipo y se usan para ayudar a definir qué anticuerpos monoclonales de PSCA variante preferidos para uso de diagnóstico o terapéutico se usan, según apreciará un experto en la materia. El sistema BIAcore (Uppsala, Suecia) es un procedimiento preferido para determinar la afinidad de unión. El sistema BIAcore usa resonancia de plasmón superficial (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23: 1; Morton y Myszka, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) para controlar interacciones biomoleculares en tiempo real. El análisis de BIAcore genera convenientemente constantes de tasa de asociación, constantes de tasa de disociación, constantes de disociación en equilibrio y constantes de afinidad.

Ejemplo 12: Polinucleótidos Complementarios

Se usan secuencias complementarias de las secuencias que codifican PSCA, o cualquier parte de las mismas, para detectar, reducir o inhibir la expresión de PSCA de origen natural. Aunque se describe el uso de oligonucleótidos que comprenden de aproximadamente 15 a 30 pares de bases, esencialmente el mismo procedimiento se usa con fragmentos de secuencia más cortos o más largos. Se diseñan oligonucleótidos apropiados usando, por ejemplo, software OLIGO 4.06 (National Biosciences) y la secuencia codificante de PSCA. Para inhibir la transcripción, se diseña oligonucleótido complementario a partir de la secuencia 5' más única y se usa para prevenir la unión del promotor con la secuencia codificante. Para inhibir la traducción, se diseña un oligonucleótido complementario para evitar la unión ribosómica con un transcrito que codifica PSCA.

Ejemplo 13: Purificación de PSCA de origen Natural o Recombinante Usando Anticuerpos Específicos de PSCA

Se purifica sustancialmente PSCA de origen natural o recombinante mediante cromatografía de inmutafinidad usando anticuerpos específicos para PSCA. Se construye una columna de inmutafinidad acoplado covalentemente anticuerpo anti-PSCA con una resina cromatográfica activada, tal como SEPHAROSE activada por

CNBr (Amersham Pharmacia Biotech). Después del acoplamiento, la resina se bloquea y se lava de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Se pasa medio que contiene PSCA sobre la columna de inmutofinidad, y la columna se lava en condiciones que permitan la absorción preferente de PSCA (por ejemplo, tampones de fuerza iónica alta en presencia de detergente). La columna se eluye en condiciones que interrumpen la unión anticuerpo/PSCA (por ejemplo, un tampón de pH 2 a pH 3, o una alta concentración de caótropro, tal como urea o ion ticianato) y se recoge GCR.P.

Ejemplo 14: Ensayo *In Vivo* con respecto a Promoción del Crecimiento Tumoral por PSCA v.4

10 El efecto de la proteína PSCA v.4 en el crecimiento de células tumorales se evalúa *in vivo* evaluando el desarrollo tumoral y el crecimiento de células que expresan o carecen de PSCA v.4. Por ejemplo, se inyecta a ratones SCID por vía subcutánea en cada flanco 1×10^6 de líneas celulares 3T3, de cáncer de próstata (por ejemplo células PC3), vejiga (por ejemplo células UM3) o páncreas (por ejemplo células PANC1) que contienen vector vacío tkNeo o PSCA v.4. Pueden usarse al menos dos estrategias: (1) Expresión de PSCA v.4 constitutiva bajo la regulación de un promotor tal como un promotor constitutivo obtenido a partir de los genomas de virus tales como virus de polioma, virus de viruela aviar (documento UK 2.211.504, publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y Virus de Simio 40 (SV40) o de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de las células huésped, y (2) expresión regulada bajo el control de un sistema de vector inducible, tal como ecdisona, tetraciclina, etc., siempre que tales promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped. El volumen tumoral se controla después mediante medición con calibrador en la aparición de tumores palpables y se continúa durante un tiempo para determinar si las células que expresan PSCA v.4 crecen a una velocidad más rápida y si los tumores producidos por células que expresan PSCA v.4 demuestran características de agresividad alterada (por ejemplo metástasis potenciada, vascularización, reducción de la sensibilidad a fármacos quimioterapéuticos).

15 Adicionalmente, puede implantarse a los ratones 1×10^5 de las mismas células ortotópicamente para determinar si PSCA v.4 tiene un efecto en el crecimiento local en el páncreas, y si PSCA v.4 afecta a la capacidad de las células para metastatizar, específicamente a ganglios linfáticos y hueso (Miki T y col, Oncol Res. 2001; 12:209; Fu X y col, Int. J Cancer. 1991, 49: 938). El efecto de PSCA v.4 en la formación y crecimiento de tumor del hueso puede evaluarse inyectando células tumorales por vía intratibial.

20 El ensayo también es útil para determinar el efecto inhibitor de PSCA v.4 de composiciones terapéuticas candidatas, tales como, por ejemplo, intracuerpos de PSCA v.4, moléculas antisentido de PSCA v.4 y ribozimas.

Ejemplo 15:

Inhibición de Tumores *In vivo* Mediada por Anticuerpo Monoclonal de PSCA v.4

35 La expresión significativa de PSCA v.4 en tejidos cancerosos, junto con su expresión restrictiva en tejidos normales hace a PSCA v.4 una buena diana para terapia de anticuerpos. De forma similar, PSCA v.4 es una diana para inmunoterapia basada en linfocitos T. Por lo tanto, la eficacia terapéutica de mAb anti-PSCA v.4 en modelos de ratón de xenotrasplante de cáncer humano, incluyendo cánceres de próstata, vejiga y páncreas (por ejemplo células PANC1) y otros cánceres de PSCA v.4 enumerados en la Tabla 1, se evalúa usando líneas celulares recombinantes tales como PC3-PSCA v.4, UM-UC3-PSCA v.4, PANC1-PSCA v.4 y 3T3-PSCA v.4 (véase, por ejemplo, Kaighn, M.E., y col., Invest Urol, 1979. 17(1): 16-23), así como modelos de xenotrasplante humanos (Saffran y col PNAS 1999, 10: 1073-1078).

40 Se estudia la eficacia de los anticuerpos en el crecimiento tumoral y formación de metástasis, por ejemplo, en un ovario ortotópico de ratón, páncreas o modelos de xenotrasplante de cáncer de sangre. Los anticuerpos pueden estar no conjugados, como se analiza en este ejemplo, o pueden conjugarse con una modalidad terapéutica, como se aprecia en la técnica. MAb anti-PSCA v.4 inhiben la formación de tumores en xenotrasplantes de ratón. Los mAb anti-PSCA v.4 también retardan el crecimiento de tumores ortotópicos establecidos y la supervivencia prolongada de ratones que portan tumores. Estos resultados indican la utilidad de mAb anti-PSCA v.4 en el tratamiento de varios tumores sólidos de etapas locales y avanzadas. (Véase, por ejemplo, Saffran, D., y col., PNAS 10: 1073-1078 o dirección web pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698).

45 La administración de los mAb anti-PSCA v.4 condujo a retardo de crecimiento de tumor ortotópico establecido e inhibición de metástasis a sitios distantes, dando como resultado una prolongación significativa de la supervivencia de ratones que portan tumores. Estos estudios indican que PSCA v.4 es una diana atractiva para inmunoterapia y demuestran el potencial terapéutico de mAb anti-PSCA v.4 para el tratamiento de cáncer local y metastásico. Este ejemplo indica que los anticuerpos monoclonales de PSCA v.4 no conjugados son eficaces para inhibir el crecimiento de xenotrasplantes de tumor pancreático, de ovario y linfomas humanos crecidos en ratones SCID; en consecuencia una combinación de tales anticuerpos monoclonales eficaces también es eficaz.

55

Inhibición de tumores usando múltiples mAb de PSCA v.4 no conjugados

Materiales y Procedimientos

Anticuerpos Monoclonales de PSCA v.4:

5 Se inducen anticuerpos monoclonales contra PSCA v.4 como se describe en el Ejemplo titulado "Generación de Anticuerpos Monoclonales de PSCA v.4 (mAb)". Los anticuerpos se caracterizan por ELISA, transferencia de Western, FACS e inmunoprecipitación con respecto a su capacidad para unirse a PSCA v.4. Los datos de mapeo de epítomos para los mAb anti-PSCA v.4, como se determina por ELISA y análisis de Western, reconocen epítomos en la proteína PSCA v.4. Se realiza análisis inmunohistoquímico de tejidos y células cancerosas con estos anticuerpos.

10 Los anticuerpos monoclonales se purifican a partir de líquido ascítico o sobrenadantes de cultivo tisular de hibridoma por cromatografía de Sepharose Proteína-G, se dializan contra PBS, se esterilizan por filtración y se almacenan a -20 °C. Se realizan determinaciones proteicas por un ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Se prepara un anticuerpo monoclonal terapéutico o un cóctel que comprende una mezcla de anticuerpos monoclonales individuales y se usa para el tratamiento de ratones que reciben inyecciones subcutáneas u ortotópicas de xenotrasplantes de tumor PC3, UM-UC3, CaKi y A427.

15 Líneas Celulares y Xenotrasplantes

El xenotrasplante LAPC-9, que expresa un receptor de andrógenos de tipo silvestre y produce antígeno específico de próstata (PSA), se pasa en ratones inmunodeficientes combinados graves (SCID)-ICR macho de 6 a 8 semanas de edad (Taconic Farms) por implante de trocar s.c. (Craft, N., y col., 1999, Cancer Res. 59: 5030-5036). Los xenotrasplantes de riñón AGS-K3 y AGS-K6 también se pasan por implantes subcutáneos en ratones SCID de 6 a 8 semanas de edad. Se preparan suspensiones de células sencillas de células tumorales como se describe en Craft, y col.

20 Las líneas celulares cancerosas PC3, UM-UC3 y PANC1, así como la línea de fibroblastos NIH 3T3 (Colección Americana de Cultivos Tipo). La línea celular de carcinoma de próstata PC3 se mantiene en RPMI complementado con L-glutamina y FBS 10 % y las líneas de carcinoma de vejiga y páncreas, UM-UC3 y PANC1 respectivamente, se mantienen en DMEM complementado con L-glutamina y FBS 10 %. Se generan poblaciones celulares PC3-PSCA v.4, UM-UC3-PSCA v.4, PANC1-PSCA v.4 y 3T3-PSCA v.4 por transferencia génica retroviral como se describe en Hubert, R.S., y col., Proc Natl. Acad. Sci USA, 1999. 96(25): 14523.

Modelos de Ratón de Xenotrasplante.

30 Se generan tumores subcutáneos (s.c.) por inyección de 2×10^6 células cancerosas mezcladas a una dilución 1:1 con Matrigel (Collaborative Research) en el flanco derecho de ratones SCID macho. Para ensayar la eficacia de anticuerpos en la formación de tumores, es decir, se inician inyecciones de anticuerpo el mismo día que las inyecciones de células tumorales. Como control, se inyectan a ratones IgG de ratón purificada (ICN) o PBS; o un anticuerpo monoclonal purificado que reconoce un antígeno irrelevante no expresado en células humanas. En estudios preliminares, no se encuentra diferencia entre IgG de ratón o PBS en crecimiento tumoral. Los tamaños de tumor se determinan por mediciones de calibre y el volumen tumoral se calcula como longitud x anchura x altura. Se sacrifica a los ratones con tumores subcutáneos mayores de 1,5 cm de diámetro.

35 Se realizan inyecciones ortotópicas en anestesia usando ketamina/xilacina. Para estudios ortotópicos de próstata, se hace una incisión a través de los músculos abdominales para exponer la vejiga y las vesículas seminales, que después se extraen a través de la incisión para exponer la próstata dorsal. Se inyectan células LAPC-9 (5×10^5) mezcladas con Matrigel en cada lóbulo dorsal en un volumen de 10 μ l. Para controlar el crecimiento tumoral, se extraen muestras sanguíneas de los ratones semanalmente para determinación de niveles de PSA. Para modelo ortotópico de páncreas, se hace una incisión a través de los músculos abdominales para exponer los tejidos mamarios y una suspensión de células sencillas de células de cáncer de páncreas se inyecta en la almohadilla mamaria. Para el modelo ortotópico de vejiga, se adhiere tejido de cáncer de vejiga AGS-B 1 en la pared de la vejiga. Después de la implantación de tumor, los ratones se segregan en grupos para los tratamientos apropiados, inyectándose i.p. mAb anti-PSCA v.4 o de control. Para controlar el crecimiento tumoral, se palpan los ratones y se recogen muestras sanguíneas semanalmente para medir los niveles de hCG.

Los mAb Anti-PSCA v.4 Inhiben el Crecimiento de Tumores Cancerosos de Xenotrasplante que Expresa PSCA v.4

50 El efecto de los mAb anti-PSCA v.4 en la formación de tumores se ensaya usando la línea celular (por ejemplo, PC3, UM-UC3, PANC1 y 3T3) y modelos ortotópicos de tumor derivados de pacientes. En comparación con el modelo de tumor s.c., el modelo ortotópico, que requiere inyección en células tumorales directamente en el órgano del ratón da como resultado un crecimiento tumoral local, desarrollo de metástasis en sitios distales, deterioro de la salud del ratón y posterior muerte (Saffran, D., y col., PNAS mencionado anteriormente). Las características hacen al modelo ortotópico más representativo de progresión de enfermedad humana y permiten a los inventores seguir el efecto terapéutico de mAb en criterios de valoración clínicamente relevantes.

Una ventaja principal de los modelos de cáncer ortotópico es la capacidad para estudiar el desarrollo de metástasis. La formación de metástasis en ratones que portan tumores ortotópicos establecidos son estudios por análisis de IHC en secciones pulmonares usando un anticuerpo contra una proteína de superficie celular específica de tumor tal como anti-CK20 para cáncer de próstata (Lin S y col, Cancer Detect Prev. 2001; 25: 202).

5 Otra ventaja de modelos de cáncer de xenotrasplante es la capacidad para estudiar neovascularización y angiogénesis. El crecimiento tumoral es parcialmente dependiente del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Aunque el sistema capilar y la red sanguínea en desarrollo viene del huésped, el inicio y la arquitectura de la neovasculatura se regula por el tumor de xenotrasplante (Davidoff AM, y col, Clin Cancer Res. 2001; 7: 2870; Solesvik O, y col., Eur. J Cancer Clin Oncol. 1984, 20:1295). El efecto de anticuerpo y molécula pequeña en la
10 neovascularización se estudia de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica, tal como por análisis de IHC de tejidos tumorales y su microambiente circundante.

Se administra a los ratones que portan tumores ortotópicos establecidos inyecciones de 1000 µg de mAb anti-PSCA v.4 o PBS durante un periodo de 4 semanas. Se permite que los ratones en ambos grupos establezcan una alta carga tumoral, para asegurar una alta frecuencia de formación de metástasis en pulmones de ratón. Después se sacrifican los ratones y sus vejigas, hígados, hueso y pulmones se analizan con respecto a la presencia de células tumorales por análisis de IHC. Estos estudios demuestran una amplia eficacia antitumoral de anticuerpos anti-PSCA v.4 en el inicio y progresión de cáncer de próstata en modelos de ratón de xenotrasplante. Los anticuerpos anti-PSCA v.4 inhiben la formación tumoral de tumores así como el retardo del crecimiento de tumores ya establecidos y prolongan la supervivencia de ratones tratados. Además, los mAb anti-PSCA v.4 demuestran un drástico efecto
15 inhibidor en la propagación de tumor de próstata local a sitios distales, incluso en presencia de una gran carga tumoral. Por lo tanto, los mAb anti-PSCA v.4 son eficaces en criterios de valoración importantes clínicamente relevantes (crecimiento tumoral), prolongación de la supervivencia y salud.
20

Ejemplo 16: Uso Terapéutico y Diagnóstico de Anticuerpos Anti-PSCA en Seres Humanos.

Los anticuerpos monoclonales anti-PSCA se usan de forma segura y eficaz para fines de diagnóstico, profilácticos, de pronóstico y/o terapéuticos en seres humanos. La transferencia de Western y análisis inmunohistoquímico de tejidos de cáncer y xenotrasplantes de cáncer con mAb anti-PSCA muestran tinción extensiva fuerte en carcinoma pero niveles significativamente más bajos o indetectables en tejidos normales. La detección de PSCA en carcinoma y en enfermedad metastásica demuestra la utilidad del mAb como un indicador de diagnóstico y/o pronóstico. Se usan por lo tanto anticuerpos anti-PSCA en aplicaciones de diagnóstico tales como inmunohistoquímica de muestras de ensayo de biopsia de riñón para detectar cáncer de pacientes sospechosos.
25
30

Como se determina por citometría de flujo, el mAb anti-PSCA se une específicamente a células de carcinoma. Por lo tanto, se usan anticuerpos anti-PSCA en aplicaciones de formación de imágenes de cuerpo completo de diagnóstico, tales como radioinmunoescintigrafía y radioinmunoterapia, (véase, por ejemplo, Potamianos S., y col., Anticancer Res 20(2A):925-948 (2000)) para detección de cánceres localizados y metastásicos que muestran expresión de PSCA. La separación o liberación de un dominio extracelular de PSCA al medio extracelular, tal como la vista para fosfodiesterasa alcalina B10 (Meerson, N. R., Hepatology 27:563-568 (1998)), permite la detección de diagnóstico de PSCA por anticuerpos anti-PSCA en muestras de suero y/u orina de pacientes sospechosos.
35

Se usan anticuerpos anti-PSCA que se unen específicamente a PSCA en aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de cánceres que expresan PSCA. Se usan anticuerpos anti-PSCA como una modalidad no conjugada y como forma conjugada en la que los anticuerpos se unen a una de diversas modalidades terapéuticas o de formación de imágenes bien conocidas en la materia, tales como profármacos, enzimas o radioisótopos. En estudios preclínicos, se ensayan anticuerpos anti-PSCA conjugados y no conjugados con respecto a eficacia de prevención tumoral e inhibición de crecimiento en los modelos de xenotrasplante de cáncer de ratón SCID, por ejemplo, modelos de cáncer de riñón AGS-K3 y AGS-K6 (véase, por ejemplo, el Ejemplo titulado "Inhibición mediada por anticuerpo monoclonal de PSCA de tumores de vejiga y pulmón *in vivo*"). Se usan anticuerpos anti-PSCA conjugados y no conjugados como una modalidad terapéutica en ensayos clínicos humanos solos o en combinación con otros tratamientos como se describe en los siguientes Ejemplos.
40
45

Ejemplo 17: Ensayo Clínico Humano: Formación de Imágenes de Diagnóstico con Anticuerpo Anti-PSCA

Se realiza un ensayo clínico humano con respecto al uso de anticuerpos anti-PSCA como un agente de formación de imágenes de diagnóstico. El protocolo se diseña de una manera sustancialmente similar a las descritas en la técnica, tales como en Divgi, y col., J. Natl. Cancer Inst. 83: 97-104 (1991). Se ha descubierto que los anticuerpos son tanto seguros como eficaces cuando se usan como una modalidad de diagnóstico.
50

Ejemplo 18: Comparación de Homología de PSCA v.4 con Secuencias Conocidas:

El gen de PSCA v.4 codifica una proteína de 189 aminoácidos. La proteína PSCA v.4 humana muestra un alto grado de homología con antígeno de células madres prostáticas humanas (gi 27482160), que muestra 98 % de identidad con PSCA v.4 en el nivel proteico (Figura 4). El homólogo humano de PSCA v.4 no se ha identificado.
55

La proteína PSCA v.4 tiene varias variantes (Figura 11). Estas incluyen 8 SNP y una variante de corte y empalme, denominada PSCA v.3. La proteína PSCA v.3 abarca la parte C-terminal de PSCA v.4 y corresponde a los aminoácidos 94-189 de esa variante. El análisis bioinformático usando programas de predicción de topología indica que PSCA v.4 es una proteína soluble sin dominios transmembrana (Tabla III).

- 5 El análisis de motivos reveló la presencia de dos motivos funcionales proteicos en la proteína PSCA v.4 (Tabla III), concretamente se han identificado un motivo cadherina y un dominio granulina. Las cadherinas pertenecen a una familia de moléculas de adhesión celular dependientes de calcio. Son proteínas transmembrana sencillas que contienen dominios de tipo inmunoglobulina y están implicadas en adhesión y clasificación celular (Shan y col, Biophys Chem 1999, 82: 157). Por ejemplo, las cadherinas median en la adhesión celular específica de tejido de linfocitos con la superficie de células epiteliales. Se ha mostrado que las cadherinas actúan en morfogénesis tisular, adhesión celular, diferenciación celular, migración celular y metástasis tumoral (Yap AS, Kovacs EM. J Biol Chem 2003, 160: 11; Vestweber D. Curr Opin Cell Biol 2002, 14: 587; Bloom y col, Mol Biol Cell. 1999, 10: 1521; Brodt P. Cancer Met Rev 1991, 10: 23). Las granulinas o epitelinas son factores de crecimiento originalmente purificados a partir de medios acondicionados a células, que se ha mostrado que potencian la proliferación celular (Xu, S. Q. y col, J. Biol. Chem. 1998, 273: 20078). Se expresan granulinas a niveles elevados en varios cánceres, incluyendo gliomas y cáncer renal (Liau L y col, Cancer Res. 60: 1353, Donald, C. D y col, Anticancer Res. 21: 3739).

Los motivos hallados en PSCA v.4 indican que PSCA v.4 puede participar en el crecimiento tumoral y progresión mediante regulación de la proliferación celular, adhesión celular, comunicación celular, invasión y metástasis.

- 20 En consecuencia, cuando PSCA v.4 actúa como un regulador del establecimiento tumoral, crecimiento tumoral, invasión tumoral, supervivencia o señalización celular, PSCA v.4 se usa para fines terapéuticos, de diagnóstico, de pronóstico y/o preventivos. Además, cuando una molécula, tal como una variante de corte y empalme o SNP de PSCA v.4 se expresa en tejidos cancerosos, tales como los enumerados en la Tabla I, se usan para fines terapéuticos, de diagnóstico, de pronóstico y/o preventivos.

Ejemplo 19: Regulación de la Transcripción

- 25 La localización mitocondrial de PSCA v.4 acoplada con la presencia de dominios de cadherina dentro de su secuencia indica que PSCA v.4 modula la regulación transcripcional de genes eucariotas. La regulación de expresión génica se confirma, por ejemplo, estudiando la expresión génica en células que expresan o carecen de PSCA v.4. Para este fin, se realizan dos tipos de experimentos.

- 30 En el primer conjunto de experimentos, se extrae ARN de células que expresan PSCA v.4 y parentales y se hibrida con matrices génicas disponibles en el mercado (Clontech) (Smid-Koopman E, y col., Br J Cancer. 2000. 83: 246). Se comparan células en reposo así como células tratadas con FBS, andrógenos o factores de crecimiento. Se identifican genes expresados de forma diferencial de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Los genes expresados de forma diferencial se mapean después en rutas biológicas (Chen K, y col., Thyroid. 2001 11:41).

- 35 En el segundo conjunto de experimentos, se evalúa la activación de la ruta transcripcional específica usando construcciones de indicador de luciferasa disponibles en el mercado (Stratagene) incluyendo: NFkB-luc, SRE-luc, ELK1-luc, ARE-luc, p53-luc y CRE-luc. Estos indicadores transcripcionales contienen sitios de unión consenso para factores de transcripción conocidos que quedan corriente abajo de rutas de transducción de señal bien caracterizadas, y representan una buena herramienta para determinar la activación de la ruta y explorar con respecto a moduladores positivos y negativos de la activación de la ruta.

40 Por lo tanto, PSCA v.4 desempeña un papel en la regulación génica y se usa como una diana para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 20: Identificación y Confirmación de Rutas de Transducción de Señales Potenciales

- 45 Se ha notificado que muchas proteínas de mamíferos interactúan con moléculas de señalización y participan en la regulación de las rutas de señalización (JNeurochem. 2001; 76: 217-223). Se ha asociado a las moléculas de cadherina con señalización de Cdc42 y Rho (Kouklis J Biol Chem. 2003, 278: 16230). Usando técnicas de inmunoprecipitación y de transferencia de Western, se identifican proteínas que se asocian con PSCA v.4 y median en los acontecimientos de señalización. Varias rutas que se sabe que desempeñan un papel en la biología del cáncer pueden regularse por PSCA v.4, incluyendo rutas de fosfolípidos tales como PI3K, AKT, etc., rutas de adhesión y migración, incluyendo FAK, Rho, Rac-1, catenina, etc., así como cascadas mitogénicas/de supervivencia tales como ERK, p38, etc. (Cell Growth Differ. 2000,11: 279; J Biol Chem. 1999,274: 801; Oncogene. 2000, 19: 3003, J. Cell Biol. 1997, 138: 913). Para determinar si la expresión de PSCA v.4 es suficiente para regular rutas de señalización específicas no activas de otro modo en células cancerosas en reposo, se investiga el efecto de PSCA v.4 en la activación de la cascada de señalización en las líneas celulares de cáncer PA-1, Panc1 y Daudi. Se estimulan células cancerosas que expresan de forma estable PSCA v.4 o neo con factor de crecimiento, FBS u otras moléculas activadoras. Se analizan lisados celulares completos por transferencia de western.

Para confirmar que PSCA v.4 activa directa o indirectamente las rutas de transducción de señales conocidas en células, se llevan a cabo ensayos indicadores transcripcionales basados en luciferasa (luc) en células que expresan genes individuales. Estos indicadores transcripcionales contienen sitios de unión consenso para factores de transcripción conocidos que quedan corriente abajo de rutas de transducción de señal bien caracterizadas. Los indicadores y ejemplos de estos factores de transcripción asociados, rutas de transducción de señal y estímulos de activación se enumeran posteriormente.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-quinasa/SAPK; crecimiento/apoptosis/tensión
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; crecimiento/diferenciación
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; crecimiento/apoptosis/tensión
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/tensión
7. TCF-luc, TCF/Lef; -catenina, Adhesión/invasión

Pueden ensayarse efectos mediados por genes en células que muestran expresión de ARNm. Pueden introducirse plásmidos indicadores de luciferasa por transfección mediada por lípidos (TFX-50, Promega). La actividad luciferasa, un indicador de actividad transcripcional relativa, se mide por incubación de extractos celulares con sustrato de luciferina y se controla la luminiscencia de la reacción en un luminómetro.

Las rutas de señalización activadas por PSCA v.4 se mapean y usan para identificación y validación de dianas terapéuticas. Cuando PSCA v.4 está implicada en señalización celular, se usa como diana para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 21: Implicación en la Progresión Tumoral

Basándose en el papel de los motivos de granulina y cadherina en el crecimiento celular, adhesión e interacciones de proteínas, el gen de PSCA v.4 puede contribuir al crecimiento, adhesión, invasión y transformación de células cancerosas. El papel de PSCA v.4 en el crecimiento tumoral se confirma en una diversidad de líneas celulares primarias y transfectadas incluyendo líneas celulares prostáticas, así como células NIH 3T3 modificadas por ingeniería genética para expresar de forma estable PSCA v.4. Las células parentales sin PSCA v.4 y células que expresan PSCA v.4 se evalúan con respecto a crecimiento celular usando un ensayo de proliferación bien documentado (Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB. *Prostate*. 2000; 44:61, Johnson DE, Ochieng J, Evans SL. *Anticancer Drugs*. 1996, 7: 288).

Para confirmar el papel de PSCA v.4 en el proceso de transformación, se investiga su efecto en los ensayos de formación de colonias. Se comparan las células parentales NIH-3T3 sin PSCA v.4 con células NIH-3T3 que expresan PSCA v.4, usando un ensayo de agar blando en condiciones rigurosas y más permisivas (Song Z. y col. *Cancer Res*. 2000; 60: 6730).

Para confirmar el papel de PSCA v.4 en invasión y metástasis de células cancerosas, se usa un ensayo bien establecido, por ejemplo, un ensayo de Sistema de Inserto Transwell (Becton Dickinson) (*Cancer Res*. 1999; 59: 6010). Se comparan células de control, incluyendo líneas celulares de próstata, páncreas y riñón sin PSCA v.4 con células que expresan PSCA v.4. Las células se cargan con el colorante fluorescente, calceína, y se siembran en placas en el pocillo superior del inserto Transwell revestido con un análogo de membrana basal. La invasión se determina por fluorescencia de células en la cámara inferior en relación con la fluorescencia de la población celular completa.

PSCA v.4 también puede desempeñar un papel en el ciclo celular y la apoptosis. Se comparan células parentales y células que expresan PSCVA v.4 con respecto a diferencias en la regulación del ciclo celular usando un ensayo BrdU bien establecido (Abdel-Malek ZA. *J Cell Physiol*. 1988, 136: 247). En resumen, se dejan crecer las células en condiciones tanto óptimas (suero completo) como limitantes (suero bajo), se marcan con BrdU y se tiñen con Ab anti-BrdU y yoduro de propidio. Las células se analizan con respecto a entrada en las fases G1, S y G2M del ciclo celular. Como alternativa, el efecto de la tensión en la apoptosis se evalúa en células parentales de control y células que expresan PSCA v.4, incluyendo células de próstata normales y tumorales. Se tratan células parentales y modificadas por ingeniería genética con diversos agentes quimioterapéuticos, tales como etopósido, taxol, etc., e inhibidores de síntesis proteica, tales como cicloheximida. Las células se tiñen con anexina V-FITC y la muerte celular se mide por análisis de FACS. La modulación de muerte celular por PSCA v.4 puede desempeñar un papel crítico en la regulación de la progresión tumoral y carga tumoral.

Cuando PSCA v.4 desempeña un papel en el crecimiento celular, transformación, invasión o apoptosis, se usa como una diana para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 22: Implicación en Angiogénesis

La angiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos capilares es necesaria para el crecimiento tumoral (Hanahan D, Folkman J. *Cell*. 1996, 86: 353; Folkman J. *Endocrinology*. 1998 139: 441). Se han desarrollado varios ensayos para medir la angiogénesis *in vitro* e *in vivo*, tales como los ensayos de cultivo tisular de formación de tubo

de células endoteliales y proliferación de células endoteliales. Usando estos ensayos así como neovascularización *in vitro*, se confirma el papel de PSCA v.4 en angiogénesis, potenciación o inhibición.

5 Por ejemplo, se evalúan células endoteliales modificadas por ingeniería genética para expresar PSCA v.4 usando ensayos de formación de tubos y proliferación. El efecto de PSCA v.4 también se confirma en modelos animales *in vivo*. Por ejemplo, se implantan por vía subcutánea células que expresan o carecen de PSCA v.4 en ratones inmunocomprometidos. Se evalúan migración celular endotelial y angiogénesis 5-15 días después usando técnicas inmunohistoquímicas. PSCA v.4 afecta a la angiogénesis, y se usa como una diana para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 23: Implicación en Interacciones Proteína-Proteína

10 Se ha mostrado que los motivos de cadherinas median en la interacción con otras proteínas. Usando técnicas de inmunoprecipitación así como sistemas de dos híbridos de levadura, se identifican proteínas que se asocian con PSCA v.4. Se comparan inmunoprecipitados de células que expresan PSCA v.4 y células sin PSCA v.4 con respecto a asociaciones proteína-proteína específicas.

15 Se realizan estudios para confirmar el alcance de la asociación de PSCA v.4 con moléculas efectoras, tales como proteínas nucleares, factores de transcripción, quinasas, fosfatos, etc. Los estudios que comparan células positivas para PSCA v.4 y negativas para PSCA v.4 así como estudios que comparan células no estimuladas/en reposo y células tratadas con activadores de células epiteliales, tales como citocinas, factores de crecimientos, andrógenos y Ab anti-integrina revelan interacciones únicas.

20 Además, se confirman interacciones proteína-proteína usando metodología de dos híbridos de levadura (Curr Opin Chem Biol. 1999, 3: 64). Se introduce un vector que porta una biblioteca de proteínas fusionadas con el dominio de activación de un factor de transcripción en levadura que expresa una proteína de fusión de dominio de unión a ADN de PSCA v.4 y una construcción indicadora. La interacción proteína-proteína se detecta por actividad indicadora colorimétrica. La asociación específica con moléculas efectoras y factores de transcripción dirige a un experto al modo de acción de PSCA v.4, e identifica de este modo dianas terapéuticas, de pronóstico, preventivas y/o de diagnóstico para cáncer. Este y ensayos similares también se usan para identificar y explorar con respecto a moléculas pequeñas que interacción con PSCA v.4.

Por lo tanto se ha descubierto que PSCA v.4 se asocia con proteínas y moléculas pequeñas. En consecuencia, PSCA v.4 y estas proteínas y moléculas pequeñas se usan para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

30 **Ejemplo 24: Implicación de PSCA v.4 en la comunicación célula-célula**

La comunicación célula-célula es esencial en el mantenimiento de la integridad de los órganos y homeostasis, ambas de las cuales se desregulan durante la formación y progresión de tumores. Basándose en la presencia de un motivo de cadherina en PSCA v.4, un motivo que se sabe que está implicado en la interacción celular y la adhesión célula-célula, PSCA v.4 puede regular la comunicación celular. Las comunicaciones intercelulares pueden medirse usando dos tipos de ensayos (J. Biol. Chem. 2000, 275: 25207). En el primer ensayo, las células cargadas con un colorante fluorescente se incuban en presencia de células receptoras no marcadas y las poblaciones celulares se examinan en microscopía fluorescente. Este ensayo cualitativo mide el intercambio de colorante entre células adyacentes. En el segundo sistema de ensayo, las poblaciones de células donadoras y receptoras se tratan como anteriormente y se realizan mediciones cuantitativas de la población de células receptoras por análisis de FACS. Usando estos sistemas de dos ensayos, las células que expresan PSCA v.4 se comparan con controles que no expresan PSCA v.4 y se descubre que PSCA v.4 potencia las comunicaciones celulares. Se usan moléculas pequeñas y/o anticuerpos que modulan la comunicación célula-célula mediada por PSCA v.4 como agentes terapéuticos para cánceres que expresan PSCA v.4. Cuando PSCA v.4 actúa en comunicación célula-célula y transporte de moléculas pequeñas, se usa como una diana o marcador para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

En toda la presente solicitud, se hace referencia a diversos contenidos de datos de sitios web, publicaciones, solicitudes de patente y patentes (los sitios web se denominan por su Localizador de Recursos Uniforme, o URL, direcciones en la Web). Además, la presente solicitud se refiere a los documentos N° de Serie de Estados Unidos 09/359.326, presentado el 20 de julio de 1999; N° de Serie de Estados Unidos 09/308.503, presentado el 25 de mayo de 1999; N° de Serie de Estados Unidos 09/251.835, presentado el 17 de febrero de 1999; N° de Serie de Estados Unidos 09/203.939, presentado el 2 de diciembre de 1998; N° de Serie de Estados Unidos 09/038.261, presentado el 10 de marzo de 1998; N° de Serie de Estados Unidos 08/814.279, presentado el 10 de marzo de 1997; N° de Serie de Estados Unidos 60/071.141 presentado el 12 de enero de 1998; N° de Serie de Estados Unidos 60/074.675, presentado el 13 de febrero de 1998; N° de Serie de Estados Unidos 60/124.658, presentado el 16 de Marzo de 1999; N° de Serie de Estados Unidos 60/120.536 presentado el 17 de Febrero de 1999; y 55 60/113.230 presentado el 21 de Diciembre de 1998.

TABLAS:**TABLA I: Tejidos que Expresan PSCA:**a. Tejido Malignos

Próstata

Páncreas

Vejiga

Riñón

Colon

Pulmón

Ovario

Mama

b. Tejidos Normales**Tabla II: Abreviaturas de Aminoácidos**

UNA LETRA	TRES LETRAS	NOMBRE COMPLETO
F	Phe	fenilalanina
L	Leu	leucina
S	Ser	serina
Y	Tyr	tirosina
C	Cys	cisteína
W	Trp	triptófano
P	Pro	prolina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
I	Ile	isoleucina
M	Met	metionina
T	Thr	treonina
N	Asn	Asparagina
K	Lys	lisina
V	Val	valina
A	Ala	alanina
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutámico
G	Gly	Glicina

Tabla III: Características Proteicas de PSCA v.420

PSCA v.4	Programa Bioinformático	URL	Resultado
ORF	ORF finder		570 pb
Longitud de la Proteína			189aa
Región Transmembrana	TM Pred	http://www.ch.embnet.org/	sin TM
	HMMTop	http://www.enzim.hu/hmmtop/	sin TM
	Sosui	http://www.genome.ad.jp/SOSUI/	soluble
	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	sin TM
Péptido Señal	Signal P	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	ninguno
pl	pl/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	pl 8,87
Peso molecular	pl/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	20,3 kDa
Localización	PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/	90 % mitocondria
	PSORT II	http://psort.nibb.ac.jp/	78 % mitocondria
Motivos	Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Pfam/	sin motivo
	Prints	http://www.biochem.ucl.ac.uk/	identificación de cadherina
	Blocks	http://www.blocks.fhere.org/	Granulina
PSCAv.1	Programa Bioinformático	URL	Resultado
ORF	ORF finder		372 pb
Longitud de la Proteína			123 aa
Región Transmembrana	TM Pred	http://www.ch.embnet.org/	I TM, aa 99-118
	HMMTop	http://www.enzim.hu/hmmtop/	ITM, aa 103-121
	Sosui	http://www.genome.ad.jp/SOSUI/	proteína de membrana aa 100-122
	TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	sin TM
Péptido Señal	Signal P	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	sí, aa 1-15
pl	pl/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	pl 5,01
Peso Molecular	pl/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	12,9 kDa
Localización	PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/	91 % plasma
	PSORT II	http://psort.nibb.ac.jp/	34 % membrana plasmática, 34 % extracelular
Motivos	Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Pfam/	uPAR, Ly-6
	Prints	http://www.biochem.ucl.ac.uk/	sin motivo
	Blocks	http://www.blocks.fhere.org/	Ly-6

Tabla IV: Límites de los exones de PSCA v.1 transcrito

Número de Exón	Inicio	Fin	Longitud
1	10	69	60
2	70	177	108
3	178	985	808

Tabla V(a). Secuencia de nucleótidos de variante de transcrito de PSCA v.2 (SEC ID N°: 1)

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcaggtgg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgtt ggaccgcgcg catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgctgtga tgactcacag gactactaag tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgtg caacgccagc ggggcccatt ccctgcagcc 360
ggctgcccgc atccttgccg tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccgggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgggggtgcc caggcctctg 480
tgccaactct cacacacccg gcccagtggg agcctgtcct ggttcctgag gcacatecta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtcccca cctgaccct cccatggccc 600
tctccaggac tcccaccggg cagatcggct ctattgacac agatccgct gcagatggcc 660
cctccaacc cctctgctgc tgttccatg gccagcatt ctccaccctt aaccctgtgc 720
tcaggcacct cttccccag gaagccttcc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg 780
tctggtccgt ggtgtcccc gcacccagca ggggacagg actcaggagg gcccggtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaaggggccc aggcctcaca ttcgtggggc 960
tccctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020
    
```

ES 2 384 622 T3

Tabla VI(a). Alineamiento de secuencia de nucleótidos de PSCA v.2 (SEC ID Nº: 2) y PSCA v.1 (SEC ID Nº: 3)

v.2	16	agtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaaggctg	65
		..	
v.1	1	aggga---gagg-----cagtgaccatgaaggctg	27
v.2	66	tgctgcttgccctggtgatggcaggcttggccctgcagccaggcactgcc	115
v.1	28	tgctgcttgccctggtgatggcaggcttggccctgcagccaggcactgcc	77
v.2	116	ctgctgtgctactcctgcaaagcccagggtgagcaacgaggactgcctgca	165
v.1	78	ctgctgtgctactcctgcaaagcccagggtgagcaacgaggactgcctgca	127
v.2	166	ggtggagaactgcaccagctgggggagcagtgctggaccgcgcatcc	215
v.1	128	ggtggagaactgcaccagctgggggagcagtgctggaccgcgcatcc	177
v.2	216	gcgagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgc	265
v.1	178	gcgagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgc	227
v.2	266	gtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgctg	315
v.1	228	gtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgctg	277
v.2	316	tgacaccgacttgtgcaacgccagcggggcccatgccctgcagccggctg	365
v.1	278	tgacaccgacttgtgcaacgccagcggggcccatgccctgcagccggctg	327
v.2	366	ccgccatccttgcgctgctcctgcaactcggcctgctgctctggggacc	415
v.1	328	ccgccatccttgcgctgctcctgcaactcggcctgctgctctggggacc	377

Tabla VII(a). Secuencias peptídicas de proteína codificada por PSCA v.2 (SEC ID Nº: 4)

MKAVLLALLM AGLALQPGTA LLCYSCKAQV SNEDCLQVEN CTQLGECQWT ARIRAVGLLT 60
 VISKGCSLNC VDDSQDYVVG KKNITCCDTD LCNASGAHAL QPAAAILALL PALGLLLWGP 120
 GQL

5

Tabla VIII(a). Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PSCA v.2 (SEC ID Nº: 5) y PSCA v.1 (SEC ID Nº: 6)

v.2	1	MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGECQWT	50
v.1	1	MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGECQWT	50
v.2	51	ARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSQDYVVGKKNITCCDTDLGNASGAHAL	100
v.1	51	ARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSQDYVVGKKNITCCDTDLGNASGAHAL	100
v.2	101	QPAAAILALLPALGLLLWGP	123
v.1	101	QPAAAILALLPALGLLLWGP	123

Tabla V(b). Secuencia de nucleótidos de variante de transcrito de PSCA v.3 (SEC ID Nº: 7)

tttgaggcca	tataaagtca	cctgaggccc	tctccaccac	agcccaccag	tgaccatgaa	60
ggctgtgctg	cttgccctgt	tgatggcagg	cttggccctg	cagccaggca	ctgccctgct	120
gtgctactcc	tgcaaagccc	aggcgcagtt	ggcctcctga	ccgtcatcag	caaaggctgc	180
agcttgaact	gcggtgatga	ctcacaggac	tactacgtgg	gcaagaagaa	catcacgtgc	240
tgtgacaccg	acttgtgcac	tgggctgct	gctctgggga	cccggccagc	tataggctct	300
ggggggcccc	gctgcagccc	acactgggtg	tggtgcccc	ggcctctgtg	ccactcctca	360
cacaccgggc	ccagtgggag	cctgtcctgg	ttcctgaggc	acatcctaac	gcaagtctga	420
ccatgtatgt	ctgcccctct	gtccccacc	ctgaccctcc	catggccctc	tccaggactc	480
ccaccgggca	gatcggctct	attgacacag	atccgcctgc	agatggcccc	tccaaccctc	540
tctgtgctg	tttccatggc	ccagcattct	ccacccttaa	ccctgtgctc	aggcacctct	600
tccccagga	agccttcctt	gcccaccca	tctatgactt	gagccaggtc	tggtccgtgg	660
tgccccccgc	accagcagc	ggacaggcac	tcaggaggc	ccggtaaagg	ctgagatgaa	720
gtggactgag	tagaactgga	ggacaggagt	cgacgtgagt	tcctgggagt	ctccagagat	780
ggggcctgga	ggcctggagg	aaggggccag	gcctcacatt	cgtggggctc	cctgaatggc	840
agcctcagca	cagcgtaggc	ccttaataaa	cacctgttgg	ataagcca		888

10

Tabla VI(b). Alineamiento de secuencias de nucleótidos de PSCA v.2 (SEC ID Nº: 8) y PSCA v.3 (SEC ID Nº: 9)

v.2	1	tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccag	50
v.3	1	tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccag	50
v.2	51	tgaccatgaaggctgtgctgcttgccctggtgatggcaggcttgccctg	100
v.3	51	tgaccatgaaggctgtgctgcttgccctggtgatggcaggcttgccctg	100
v.2	101	cagccaggcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccagggtgagcaa	150
v.3	101	cagccaggcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccag-----	142

ES 2 384 622 T3

v.2	151	cgaggactgcctgcaggtggagaactgcaccagctgggggagcagtgct	200
v.3	143	-----	142
v.2	201	ggaccgcgcatccgaggtggcctcctgaccgtcatcagcaaaggc	250
v.3	143	-----gcgaggtggcctcctgaccgtcatcagcaaaggc	177
v.2	251	tgacgttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaa	300
v.3	178	tgacgttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaa	227
v.2	301	gaacatcacgtgctgtgacaccgacttggaacgccagcggggcccatg	350
v.3	228	gaacatcacgtgctgtgacaccgacttg-----	255
v.2	351	ccctgcagccggctgccgccatccttgcgctgctccctgactcggcctg	400
v.3	256	-----tgactcggcctg	268
v.2	401	ctgctctggggaccggccagctataggctctggggggccccgctgcagc	450
v.3	269	ctgctctggggaccggccagctataggctctggggggccccgctgcagc	318
v.2	451	ccacactgggtgtggtgccccaggcctctgtgccactcctcacacaccg	500
v.3	319	ccacactgggtgtggtgccccaggcctctgtgccactcctcacacaccg	368
v.2	501	gcccagtgaggcctgtcctggtcctgaggcacatcctaacgcaagtct	550
v.3	369	gcccagtgaggcctgtcctggtcctgaggcacatcctaacgcaagtct	418
v.2	551	gaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc	600
v.3	419	gaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc	468
v.2	601	tctccaggactcccaccggcagatcggctctattgacacagatccgcct	650
v.3	469	tctccaggactcccaccggcagatcggctctattgacacagatccgcct	518
v.2	651	gcagatggcccctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcatt	700
v.3	519	gcagatggcccctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcatt	568
v.2	701	ctccacccttaaccctgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttcc	750
v.3	569	ctccacccttaaccctgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttcc	618
v.2	751	ctgccaccccatctatgacttgagccaggctcgttccgtggtgtcccc	800
v.3	619	ctgccaccccatctatgacttgagccaggctcgttccgtggtgtcccc	668
v.2	801	gcaccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaaggctgagatg	850
v.3	669	gcaccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaaggctgagatg	718

v.2	851	aagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga	900
v.3	719	aagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga	768
v.2	901	gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcaca	950
v.3	769	gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcaca	818
v.2	951	ttcgtggggctccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaata	1000
v.3	819	ttcgtggggctccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaata	868
v.2	1001	aacacctggttgataagcca	1020
v.3	869	aacacctggttgataagcca	888

Tabla VII(b). Secuencias peptídicas de proteína codificada por PSCA v.3 (SEC ID N°: 10)

MYVCAPVPHP	DPPMALS RTP	TRQIGSIDTD	PPADGPSNPL	CCCFHGPAFS	TLNPVLRHLF	60
PQEAFFAHPI	YDLSQVWSV	SPAPSRGQAL	RRAR			94

5

Tabla VIII(b). Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PSCA v.2 y PSCA v.3.
SIN HOMOLOGÍA SIGNIFICATIVA

Tabla V(c). Secuencia de nucleótidos de la variante de transcrito de PSCA v.4 (SEC ID N°: 11)

gacagtgaac	cctgcgctga	aggcgttggg	gctcctgcag	ttctggggca	gccacaggcg	60
cccagggttt	cgtgccgac	agcccaggac	ggtcttccc	gtgcagtttc	tgatgcgggg	120
agggcagtg	tgcttccgg	tcaccaggac	cagtgctcag	cccgcctgct	tgaccccctt	180
acttagctgg	ggccaatcc	atacccaatt	tagatgattc	agacgatggg	atttгааact	240
tttgaactgg	gtgcgactta	agcactgccc	tgctgtgcta	ctcctgcaa	gcccagggtga	300
gcaacgagga	ctgcctgcag	gtggagaact	gcaccagct	gggggagcag	tgctggaccg	360
cgcgcatccg	cgcagttggc	ctcctgaccg	tcatcagcaa	aggctgcagc	ttgaaactgcg	420
tgatgactc	acaggactac	tacgtgggca	agaagaacat	cacgtgctgt	gacaccgact	480
tgtgcaacgc	cagcggggcc	catgccctgc	agccggctgc	cgccatcctt	gcgctgctcc	540
ctgcaactcg	cctgctgctc	tggggaccgg	gccagctata	ggctctgggg	ggccccgctg	600
cagcccacac	tgggtgtggt	gccccaggcc	tctgtgccac	tcctcacaca	cccggcccag	660
tgggagcctg	tcctggttcc	tgaggcacat	cctaacgcaa	gtctgacat	gtatgtctgc	720
gcccctgtcc	cccaccctga	ccctcccattg	gccctctcca	ggactcccac	ccggcagatc	780
ggctctattg	acacagatcc	gctgagat	ggcccctcca	accctctctg	ctgctgtttc	840
catggcccag	cattctccac	ccttaaccct	gtgctcaggc	acctcttccc	ccaggaagcc	900
ttcctgccc	accccatcta	tgacttgagc	caggtctggt	ccgtggtgtc	ccccgcacc	960
agcaggggac	aggcactcag	gagggccgg	taaaggctga	gatgaagtgg	actgagtaga	1020
actggaggac	aggagtcgac	gtgagttcct	gggagctcc	agagatgggg	cctggaggcc	1080
tggaggaagg	ggccaggcct	cacattcgtg	gggctccctg	aatggcagcc	tcagcacagc	1140
gtaggcctt	aataaacacc	tggttgataa	gcca			1174

10

v.2	516	gtcctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtctgaccatgtatgtctg	565
v.4	670	gtcctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtctgaccatgtatgtctg	719
v.2	566	cgccccctgtccccaccctgaccctcccatggccctctccaggactcca	615
v.4	720	cgccccctgtccccaccctgaccctcccatggccctctccaggactcca	769
v.2	616	cccggcagatcggctctattgacacagatccgcctgcagatggccctcc	665
v.4	770	cccggcagatcggctctattgacacagatccgcctgcagatggccctcc	819
v.2	666	aaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccacccttaacc	715
v.4	820	aaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccacccttaacc	869
v.2	716	tgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttcctgccaccccatct	765
v.4	870	tgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttcctgccaccccatct	919
v.2	766	atgacttgagccaggtctggtccgtggtgtccccgcaccagcagggga	815
v.4	920	atgacttgagccaggtctggtccgtggtgtccccgcaccagcagggga	969
v.2	816	caggcactcaggagggcccggtaaaggctgagatgaagtggactgagtag	865
v.4	970	caggcactcaggagggcccggtaaaggctgagatgaagtggactgagtag	1019
v.2	866	aactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtctccagagatggg	915
v.4	1020	aactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtctccagagatggg	1069
v.2	916	gcctggaggcctggaggaagggggccaggcctcacattcgtggggctcct	965
v.4	1070	gcctggaggcctggaggaagggggccaggcctcacattcgtggggctcct	1119
v.2	966	gaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttggata	1015
v.4	1120	gaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttggata	1169
v.2	1016	agcca	1020
v.4	1170	agcca	1174

VII(a). Secuencias peptídicas de proteína codificada por PSCA v.4 (SEC ID Nº: 14)

MTHRTTWAR	RTSRAVTPC	ATPAGPMPCS	RLPPSLRCSL	HSACCSGDPA	SYRLWGAPLQ	60
PTLGVVPQAS	VPLLTHPAQW	EPVLVPEAHP	NASLTMYVCA	PVPHDPDMA	LSRTPTRQIG	120
SIDTDPPADG	PSNPLCCCFH	GPAFSTLNPV	LRHLFPQAEF	PAHPIYDLSQ	VWSVVPAPS	180
RGQALRRAR						

5

Tabla VIII(c). Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PSCA v.1 y PSCA v.4. SIN HOMOLOGÍA SIGNIFICATIVA

ES 2 384 622 T3

v.2	116	ctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtgagcaacgaggactgcctgca 	165
v.5	270	ctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtgagcaacgaggactgcctgca	319
v.2	166	ggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccgcgcgcatcc 	215
v.5	320	ggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccgcgcgcatcc	369
v.2	216	-----	215
v.5	370	gtgagtggggggacgacagccgccaggcctaggtctctgccactgaacta	419
v.2	216	-----	215
v.5	420	ttaatctttctggccatctgtccgcatctgtgtgctgttttccttccacc	469
v.2	216	-----	215
v.5	470	tgtccccgaccgctcccgcacctgcacccccacaacaccagcatctg	519
v.2	216	-----	215
v.5	520	tccctccagccatcctcctccatctgccactcctccactcatctgtcct	569
v.2	216	-----	215
v.5	570	ccccatcctccatcttccactcctccacccatctgtccctccccatcct	619
v.2	216	-----	215
v.5	620	gagctcacttactcactcacccatcttctgacgctcagcgggtggccat	669
v.2	216	-----	215
v.5	670	ctgcctcggacatctggatagggctgagaccagggccgagaccaggcct	719
v.2	216	-----	215
v.5	720	cgcactgcttgcaatcctgaggccagcccaggggactctagagcattag	769
v.2	216	-----	215
v.5	770	gcaggggtgggacaggaggagcctggggcaggtcaggcaggtgagcacac	819
v.2	216	-----gcgcagttggcctc 	229
v.5	820	agggcagccccatccccggatcccgctgctcccaggcgcagttggcctc	869
v.2	230	ctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgctggatgactcaca 	279
v.5	870	ctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgctggatgactcaca	919
v.2	280	ggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgctgtgacaccgacttgt 	329
v.5	920	ggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgctgtgacaccgacttgt	969

ES 2 384 622 T3

v.2	330	gcaacgccagcggggcccatgccctgcagccggctgccgccatccttgcg	379
v.5	970	gcaacgccagcggggcccatgccctgcagccggctgccgccatccttgcg	1019
v.2	380	ctgctccctgcactcggcctgctgctctggggacccggccagctataggc	429
v.5	1020	ctgctccctgcactcggcctgctgctctggggacccggccagctataggc	1069
v.2	430	tctggggggcccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctct	479
v.5	1070	tctggggggcccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctct	1119
v.2	480	gtgccactcctcacacacccggccagtgaggagcctgtcctggttcctga	529
v.5	1120	gtgccactcctcacacacccggccagtgaggagcctgtcctggttcctga	1169
v.2	530	ggcacatcctaacgcaagtctgaccatgtatgtctgcgcccctgtcccc	579
v.5	1170	ggcacatcctaacgcaagtctgaccatgtatgtctgcgcccctgtcccc	1219
v.2	580	accctgaccctcccatggccctctccaggactcccacccggcagatcggc	629
v.5	1220	accctgaccctcccatggccctctccaggactcccacccggcagatcggc	1269
v.2	630	tctattgacacagatccgcctgcagatggcccctccaaccctctctgctg	679
v.5	1270	tctattgacacagatccgcctgcagatggcccctccaaccctctctgctg	1319
v.2	680	ctgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgctcaggcacc	729
v.5	1320	ctgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgctcaggcacc	1369
v.2	730	tcttccccaggaagccttcctgccaccccatctatgacttgagccag	779
v.5	1370	tcttccccaggaagccttcctgccaccccatctatgacttgagccag	1419
v.2	780	gtctggtccgtggtgtccccgcacccagcaggggacagggcactcaggag	829
v.5	1420	gtctggtccgtggtgtccccgcacccagcaggggacagggcactcaggag	1469
v.2	830	ggcccggtaaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacagg	879
v.5	1470	ggcccggtaaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacagg	1519
v.2	880	agtcgacgtgagttcctgggagtctccagagatggggcctggaggcctgg	929
v.5	1520	agtcgacgtgagttcctgggagtctccagagatggggcctggaggcctgg	1569
v.2	930	aggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctca	979
v.5	1570	aggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctca	1619
v.2	980	gcacagcgtaggcccttaataaacacctggttgataagcca	1020

v.5 1620 gcacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca 1660

VII(d). Secuencias peptídicas de proteína codificada por PSCA v.5 (SEC ID Nº: 18)

MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPY SYRLWGAPLQ1 60
 PTLGVVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMYVCA VVPHPPDPPMA LSRTPTRQIG 120
 SIDTDPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAH PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS 180
 RGQALRRAR

5

**Tabla VIII(d). Alineamiento de secuencias de aminoácidos de PSCA v.2 y PSCA v.5.
 SIN HOMOLOGÍA SIGNIFICATIVA**

Tabla IX SNP y cambios de codón en PSCA v.2 y v.4

Variante	posición V.2	SNP	cambio de AA*	posición de AA	posición V.4	cambio de AA	posición de AA	Variante
V.6	57	t/c	M/-**	1	No en v.4			
V.7	367	c/t	A/A	104	521	P/L	33	v.19
V.8	424	a/c	L/L	123	578	Y/S	52	v.20
V.9	495	c/g			649	H/D	76	v.21
V.10	499	c/t			653	P/L	77	v.22
V.11	563	c/t			717	V/V	98	v.23
V.12	567	g/a			721	A/T	100	v.24
V.13	627	g/a			781	G/S	120	v.25
V.14	634	t/g			788	I/S	122	v.26
V.15	835	g/a			989	R/Q	189	v.27
V.16	847	g/a			1001			v.28
V.17	878	g/a			1032			v.29
V.18	978	c/g			1132			v.30

* AA : aminoácido
 ** - : Sin aminoácido codificado.

10

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AGENSYS, INC.
 GE, Wangmao
 CHALLITA-EID, Pia M.
 RAITANO, Arthur B. JAKOBOVITS, Aya

15

<120> VARIANTES DEL ANTÍGENO DE CÉLULAS MADRE DE PRÓSTATA (PSCA) Y SUBSECUENCIAS DE LAS MISMAS

20

<130> 511582008846

<140> EP 04785910.3

25

<141> 28-05-2004

<150> PCT/US2004/017231

<151> 28-05-2004

30

<150> US 60/475.064

<151> 30-05-2003

<160> 30

<170> FastSEQ para windows versión 4.0

5
 <210> 1
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10
 <400> 1

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg ctgcccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgcccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcagggtg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgtt ggaccgcgcg catccgcgca gtggccctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgctgtga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgtg caacgccagc ggggcccctg cctgcagcc 360
ggctgccgcc atccttgcgc tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgcc caggcctctg 480
tgccactcct cacacaccgg gccagtgagg agcctgtcct ggttcctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtccccc cctgaccct cccatggccc 600
tctccaggac tcccaccggc cagatcggct ctattgacac agatccgct gcagatggcc 660
cctccaaccc tctctgctgc tgtttccatg gcccagcatt ctccaccct aaccctgtgc 720
tcaggcacct ctccccccag gaagccttcc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg 780
tctggtcctg ggtgtccccc gcaccagca ggggacaggg actcaggagg gcccggtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaaggggccc aggcctcaca ttcgtggggc 960
tccctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020
    
```

15
 <210> 2
 <211> 1005
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

agtcacctga ggccctctcc accacagccc accagtgacc atgaaggctg tgctgcttgc 60
cctgttgatg gcaggcttgg ccctgcagcc aggcactgcc ctgctgtgct actcctgcaa 120
agccaggtg agcaacgagg actgcctgca ggtggagaac tgcaccagc tgggggagca 180
gtgctggacc gcgcgcatcc gcgcagttgg cctcctgacc gtcacagca aaggctgcag 240
cttgaactgc gtggatgact cacaggacta ctacgtgggc aagaagaaca tcacgtgctg 300
tgacaccgac ttgtgcaacg ccagcggggc ccatgcccctg cagccggctg ccgccatcct 360
tgcgctgtct cctgcactcg gcctgtgct ctggggacc ggccagctat aggtcttggg 420
gggccccctg gcagcccaca ctgggtgtgg tgcccaggg ctctgtgcca ctctcacac 480
acccggccca gtgggagcct gtccctggtc ctgaggcaca tcctaacgca agtctgacca 540
tgtatgtctg cgcccctgtc ccccaccctg accctcccat ggccctctcc aggactccca 600
    
```

```

cccggcagat cggctctatt gacacagatc cgcctgcaga tggcccctcc aaccctctct 660
gctgctgttt ccatggcca gcattctcca cccttaacc tgtgctcagg cacctcttcc 720
cccaggaagc ctcccctgcc caccatct atgacttgag ccaggctctg tccgtggtgt 780
ccccgcacc cagcagggga caggactca ggagggccc gtaaaggctg agatgaagtg 840
gactgagtag aactggagga caggagtcga cgtgagttcc tgggagctc cagagatggg 900
gcctggaggc ctggaggaag gggccagcc tcacattcgt ggggctccct gaatggcagc 960
ctcagcacag cgtaggccct taataaacac ctgttgata agcca 1005
    
```

25
 <210> 3
 <211> 985
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)...(0)
 <223> n = a, c, t, o g

<400> 3

ES 2 384 622 T3

```

agggagaggc agtgaccatg aaggctgtgc tgcttgccct gttgatggca ggcttggccc 60
tgcagccagg cactgccctg ctgtgctact cctgcaaagc ccaggtgagc aacgaggact 120
gcctgcagggt ggagaactgc acccagctgg gggagcagtg ctggaccgcg cgcattccgcg 180
cagttggcct cctgaccgtc atcagcaaag gctgcagctt gaactgctgt gatgactcac 240
aggactacta cgtgggcaag aagaacatca cgtgctgtga caccgacttg tgaacgcca 300
gcggggccca tgcctgcag ccggctgccc ccatccttgc gctgctcct gcaactcggcc 360
tgctgctctg gggacccggc cagctatagg ctctgggggg ccccgctgca gcccacactg 420
ggtgtggtgc cccaggcctt tgtgccactc ctcacagaac ctggcccagt gggagcctgt 480
cctggttcct gaggcacatc ctaacgcaag tttgaccatg tatgtttgca ccccttttcc 540
ccnaaccctg accttcccat gggccttttc caggattccc acccggcaga tcagttttag 600
tgacacagat ccgcctgcag atggcccctc caacccttc tgttgctgtt tccatggccc 660
agcattttcc acccttaacc ctgtgttcag gcacttcttc ccccaggaag ccttcctctg 720
ccacccatt tatgaattga gccaggttg gtccgtggtg tccccgcac ccagcagggg 780
acaggcaatc aggagggccc agtaaaggct gagatgaagt ggactgagta gaactggagg 840
acaagagttg acgtgagttc ctgggagttt ccagagatgg ggctggagg cctggaggaa 900
ggggccaggc ctcacattg tgggctccc gaatggcagc ctgagcacag cgtaggccct 960
taataaacac ctgttgata agcca 985

```

5
 <210> 4
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 4
Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln
1      5      10      15
Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn
20      25      30
Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
35      40      45
Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys
50      55      60
Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
65      70      75      80
Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
85      90      95
Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
100     105     110
Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
115     120

```

10
 <210> 5
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15
 <400> 5

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln

```

1           5           10           15
Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn
                20
Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
                35
Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys
                50
Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
65                70
Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
                85
Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
100
Leu Gly Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
115                120

```

<210> 6
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 6

```

Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln
1           5           10           15
Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn
                20
Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys
                35
Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys
                50
Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly
65                70
Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly
                85
Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala
100
Leu Gly Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
115                120

```

<210> 7
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

10

15

<400> 7

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggcgcagtt ggcctcctga ccgtcatcag caaaggctgc 180
agcttgaact gcgtggatga ctcacaggac tactacgtgg gcaagaagaa catcacgtgc 240
tgtgacaccg acttgtagc acactgggtg tggtgcccca ggctctgtg ccactcctca 360
ggggggcccc gctgcagccc acactgggtg ttcctgaggc acatcctaac gcaagtctga 420
cacaccggc ccagtgggag cctgtcctgg ttccctgaggc acatcctaac gcaagtctga 480
ccatgtatgt ctgcgcccc gtccccacc ctgaccctcc catggcctc tccaggactc 540
ccaccggca gatcggtct attgacacag atccgcctgc agatggcccc tccaaccctc 600
tctgctgctg tttccatggc ccagcattct ccacccttaa ccctgtgctc aggcacctct 660
tccccagga agccttccct gccacccca tctatgactt gagccaggtc tggctcgtgg 720
tgteccccgc acccagcagg ggacaggcag tcaggagggc ccggtaaagg ctgagatgaa 780
gtggactgag tagaactgga ggacaggagt cgacgtgagt tcctgggagt ctccagagat 840
ggggcctgga ggcttgagg aaggggccag gcctcacatt cgtggggctc cctgaatggc 888
agcctcagca cagcgtaggc ccttaataaa cacctgttgg ataagcca

```

<210> 8
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcaggagg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgct ggaccgcgcg catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgctgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgtg caacgccagc ggggcccatt ccctgcagcc 360
ggctgccgcc atccttgcgc tgctcccctg actcggcctg ctgctctggg gaccggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgtgggtgcc caggcctctg 480
tgccactcct cacacacccg gccagtgagg agcctgtcct ggttccctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtcccca ccctgacctt cccatggccc 600
tctccaggac tcccacccgg cagatcggct ctattgacac agatccgctt gcagatggcc 660
ctcccaacc tctctgctgc tgtttccatg gcccagcatt ctccaccctt aaccctgtgc 720
tcaggcacct cttccccag gaagccttcc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg 780
tctggteccg ggtgtcccc gcacccagca ggggacagg actcaggagg gcccggtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaaggggcc aggcctaca ttcgtggggc 960
tccctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020
    
```

10

<210> 9
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 9

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcaggagg agaactgcac 180
agcttgaact gcgtggatga ctcacaggac tactacgtgg gcaagaagaa catcacgtgc 240
tgtgacaccg acttgtgcac tcggcctgct gctctgggga cccggccagc tataggctct 300
ggggggcccc gctgcagccc aactgggtg tgggtgcccc ggcctctgtg ccaactcctca 360
cacacccggc ccagtgggag cctgtcctgg ttctgaggc acatcctaac gcaagtctga 420
ccatgtatgt ctgcgcccc gtccccacc ctgaccctc catggcctc tccagactc 480
ccacccggca gatcggctct attgacacag atccgcctgc agatggcccc tccaaccctc 540
tctgctgctg tttccatggc ccagcattct ccacccttaa ccctgtgctc aggcacctct 600
tccccagga agccttccct gccacccca tctatgactt gagccaggct tggctcctgg 660
tgtccccgc acccagcagg ggacaggcac tcaggagggc ccggtaaagg ctgagatgaa 720
gtggactgag tagaactgga ggacaggagt cgacgtgagt tcctgggagt ctccagagat 780
ggggcctgga ggcctggagg aaggggccag gcctcacatt cgtggggctc cctgaatggc 840
agcctcagca cagcgtaggc ccttaataaa cacctgttgg ataagcca 888
    
```

20

<210> 10
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 10

ES 2 384 622 T3

Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu
 1 5 10 15
 Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro
 20 25 30
 Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala
 35 40 45
 Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala
 50 55 60
 Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val
 65 70 75 80
 Ser Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 85 90

<210> 11
 <211> 1174
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

gacagtgaac cctgcgctga aggcggtggg gctcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
 cccagggttt cgtgccgatc agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
 agggcagtg tgccttccgg tcaccaggac cagtgctcag cccgcctgct tgacccccct 180
 acttagctgg ggtccaatcc atacccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaaact 240
 tttgaactgg gtgcgactta agcactgccc tgctgtgcta ctctgcaaa gcccagggtga 300
 gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcaccagct gggggagcag tgctggaccg 360
 cgcgcatccg cgcagttggc ctctgaccg tcatcagcaa aggctgcagc ttgaactgcg 420
 tggatgactc acaggactac tacgtgggca agaagaacat cacgtgctgt gacaccgact 480
 tgtgcaacgc cagcggggcc catgccctgc agccggctgc cgccatcctt gcgctgctcc 540
 ctgcactcgg cctgctgctc tggggaccgg gccagctata ggctctgggg gggcccctg 600
 cagcccacac tgggtgtggt gcccaggcc tctgtgccac tcctcacaca cccggccag 660
 tgggagcctg tcctgggtcc tgaggcacat cctaacgcaa gtctgaccat gtatgtctgc 720
 gcccctgtcc cccaccctga ccctcccag gccctctcca ggactcccac ccggcagatc 780
 ggctctattg acacagatcc gcctgcagat ggcccctcca accctctctg ctgctgtttc 840
 catggcccag cattctccac ccttaaccct gtgctcagge acctcttccc ccaggaagcc 900
 ttccctgccc accccatcta tgacttgagc caggtctggt ccgtggtgct ccccgcacc 960
 agcaggggac aggcactcag gagggcccg taaaggctga gatgaagtgg gatgagtga 1020
 actggaggac aggagtgcac gtgagttcct gggagtctcc agagatgggg cctggaggcc 1080
 tggaggaagg ggccaggcct cacattcgtg gggctccctg aatggcagcc tcagcacagc 1140
 gtaggcctt aataaacacc tgttggataa gcca 1174

10

<210> 12
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15

<400> 12

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
 ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
 gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcaggtgg agaactgcac 180
 ccagctgggg gagcagtgct ggaccgcgcg catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
 cagcaaaggc tgcagcttga actgcgtgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
 gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgg caagccagc ggggccccatg ccctgcagcc 360
 ggctgcccgc atccttgcgc tgctcccctg actcggcctg ctgctctggg gaccggcca 420
 gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgccc caggcctctg 480
 tgccactcct cacacacccg gcccagtggg agcctgtcct ggttctctgag gcacatccta 540
 acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtccccc cctgaccct cccatggccc 600
 tctccaggac tcccaccgg cagatcggct ctattgacac agatccgct ccagatggcc 660
 cctccaacc tctctgctgc tgtttccatg gcccagcatt ctccaccctt aaccctgtgc 720
 tcaggcacct cttccccag gaagccttcc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg 780
 tctggctcgt ggtgtcccc gcaccagca ggggacaggc actcaggagg gcccggtaaa 840
 ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
 gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaagggcc aggcctcaca ttctgtggggc 960
 tccctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020

<210> 13
 <211> 1133
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5

<400> 13

```
tctggggcag ccacaggcgc ccagggtttc gtgccgatca gcccaggacg gtcttcccgg 60
tgcagtttct gatgcgggga gggcagtgtc gccttccggt caccaggacc agtgctcagc 120
ccgcctgctt gaccccccta cttagctggg gtccaatcca tacccaattt agatgattca 180
gacgatggga tttgaaactt ttgaaactggg tgcgacttaa gcaactgccc gctgtgctac 240
tcctgcaaag cccagggtgag caacgaggac tgcctgcagg tggagaactg caccagctg 300
ggggagcagt gctggaccgc gcgcatccgc gcagttggcc tcctgaccgt catcagcaaa 360
ggctgcagct tgaactgctg ggatgactca caggactact acgtgggcaa gaagaacatc 420
acgtgctgtg acaccgactt gtgcaacgcc agcggggccc atgccctgca gccggctgcc 480
gccatccttg cgctgctccc tgcactcggc ctgctgctct ggggacccgg ccagctatag 540
gctctggggg gccccgctgc agcccacact ggggtgtggt ccccaggcct ctgtgccact 600
cctcacacac ccggcccagt gggagcctgt ccttggttct gaggcacatc ctaacgcaag 660
tctgaccatg tatgtctgcg cccctgtccc ccaccctgac cctcccatgg ccctctccag 720
gactcccacc cggcagatcg gctctattga cacagatccg cctgcagatg gccccctcaa 780
ccctctctgc tgctgtttcc atggcccagc attctccacc cttaaccttg tgctcaggca 840
cctcttcccc caggaagcct tccctgcccc ccccatctat gacttgagcc aggtctggtc 900
cgtggtgtcc cccgcaccca gcaggggaca ggcactcagg agggcccggg aaaggctgag 960
```

```
atgaagtgga ctgagtagaa ctggaggaca ggagtcgacg tgagttcctg ggagttctcca 1020
gagatggggc ctggaggcct ggaggaaggg gccaggcctc acattcgtgg ggctccctga 1080
atggcagcct cagcacagcg taggccctta ataaacacct gttggataag cca 1133
```

10

<210> 14
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 14

```
Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20      25      30
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35      40      45
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50      55      60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
 65      70      75      80
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85      90      95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100      105      110
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115      120      125
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130      135      140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145      150      155      160
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165      170      175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180      185
```

20

<210> 15
 <211> 1660
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 15

gacagtgaac	cctgcgctga	aggcgttggg	gctcctgcag	ttctggggca	gccacagggc	60
cccagggttt	cgtgccgatc	agcccaggac	ggctctcccc	gtgcagtttc	tgatgcgggg	120
agggcagtg	tgccctccgg	tcaccaggac	cagtgtctcag	cccgcctgct	tgacccccct	180
acttagctgg	ggtccaatcc	ataccaat	tagatgattc	agacgatggg	atgtgaaact	240
tttgaactgg	gtgcgactta	agcactgccc	tgctgtgcta	ctcctgcaaa	gcccaggtga	300
gcaacgagga	ctgcctgcag	gtggagaact	gcacccagct	gggggagcag	tgctggaccg	360
cgcgcatccg	tgagtggggg	gacgacagcc	gccaggccta	ggtctctgcc	actgaactat	420
taatctttct	ggccatctgt	ccgcatctgt	gtgctgtttt	ccttccacct	gtccccgacc	480
cgtcccgcac	ctgcaccccc	aacaatcacc	cagcaictgt	ccctccagcc	atcctcctcc	540
atctgccaact	ctccactca	tctgtccctc	cccatectcc	atcttccact	ctccacca	600
tctgtccctc	cccatccctg	agctcactta	ctcactcacc	ccatttctga	cgctcagcgg	660
gtggtccatc	tgccctcggac	atctggatag	ggctgagacc	agggccgaga	ccaggccctc	720
gcactgcttg	caatcctgag	gccagcccag	ggggactcta	gagcattagg	cagggtgagg	780
caggaggagg	cctggggcag	gtcaggcagg	tgagcacaca	gggcagcccc	atccccggat	840
cccgtctctc	cccaggcgca	gttggcctcc	tgaccgtcat	cagcaaaggc	tgagcttga	900
actgcgtgga	tgactcacag	gactactacg	tgggcaagaa	gaacatcacg	tgctgtgaca	960
ccgacttggt	caacgccagc	ggggccatg	ccctgcagcc	ggctgccgcc	atccttgccg	1020
tgctccctgc	actcggcctg	ctgctctggg	gacccggcca	gctataggct	ctggggggcc	1080
ccgctgcagc	ccacactggg	tgtggtgccc	caggcctctg	tgccactcct	cacacaccgg	1140
gcccagtggg	agcctgtcct	ggttctctgag	gcacatccta	acgcaagtct	gaccatgtat	1200
gtctgcgtccc	ctgtccccc	ccctgaccct	cccattggccc	tctccaggac	tcccaccggg	1260
cagatcggct	ctattgacac	agatccgcct	gcagatggcc	ccccaaccc	tctctgctgc	1320
tgtttccatg	gcccagcatt	ctccaccctt	aaccctgtgc	tcaggcacct	ctccccccag	1380
gaagccttcc	ctgcccaccc	catctatgac	ttgagccagg	tctggtccgt	ggtgtcccc	1440
gcacccagca	ggggacaggc	actcaggagg	gcccggtaaa	ggctgagatg	aagtggactg	1500
agtagaactg	gaggacagga	gtcgcagtga	gttctctggga	gtctccagag	atggggcctg	1560

gaggcctgga	ggaaggggccc	aggcctcaca	ttcgtggggc	tccctgaatg	gcagcctcag	1620
cacagcgtag	gccccttaata	aacacctgtt	ggataagcca			1660

5

<210> 16
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 16

10

tttggggcca	tataaagtca	cctgaggccc	tctccaccac	agcccaccag	tgaccatgaa	60
ggctgtgctg	cttgccctgt	tgatggcagg	cttggccctg	cagccaggca	ctgccctgct	120
gtgctactcc	tgcaaagccc	aggtgagcaa	cgaggactgc	ctgcaggtgg	agaactgcac	180
ccagctgggg	gagcagtgc	ggaccgcgcg	catccgcgca	ggtggcctcc	tgaccgtcat	240
cagcaaaagg	tgagccttga	actgcgtgga	tgactcacag	gactactacg	tgggcaagaa	300
gaacatcacg	tgctgtgaca	ccgacttggt	caacgccagc	ggggccatg	ccctgcagcc	360
ggctgccgcc	atccttgccg	tgctccctgc	actcggcctg	ctgctctggg	gacccggcca	420
gctataggct	ctggggggcc	ccgctgcagc	ccacactggg	tgtggtgccc	caggcctctg	480
tgccactcct	cacacaccgg	gcccagtggg	agcctgtcct	ggttctctgag	gcacatccta	540
acgcaagtct	gaccatgtat	gtctgcgccc	ctgtccccc	ccctgaccct	cccattggccc	600
tctccaggac	tcccaccggg	cagatcggct	ctattgacac	agatccgcct	ccagatggcc	660
ccccaaccc	tctctgctgc	tgtttccatg	gcccagcatt	ctccaccctt	aaccctgtgc	720
tcaggcacct	cttccccccag	gaagccttcc	ctgcccaccc	catctatgac	ttgagccagg	780
tctggtccgt	ggtgtcccc	gcacccagca	ggggacaggc	actcaggagg	gcccggtaaa	840
ggctgagatg	aagtggactg	agtagaactg	gaggacagga	gtcgcagtga	gttctctggga	900
gtctccagag	atggggcctg	gaggcctgga	ggaaggggcc	aggcctcaca	ttcgtggggc	960
tccctgaatg	gcagcctcag	cacagcgtag	gccccttaata	aacacctgtt	ggataagcca	1020

15

<210> 17
 <211> 1619
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 17

```

tctggggcag ccacagggcg ccagggtttc gtgccgatca gcccaggacg gtcttcccgg 60
tgcagtttct gatgcgggga gggcagtgct gccttccggt caccaggacc agtgctcagc 120
ccgcttgctt gaccccctta cttagctggg gtccaatcca tacccaattt agatgattca 180
gacgatggga tttgaaactt ttgaactggg tgcgacttaa gcactgccct gctgtgtctac 240
tcctgcaaag cccaggtgag caacgaggac tgcctgcagg tggagaactg caccagctg 300
ggggagcagt gctggaccgc gcgcatccgt gagggggggg acgacagccg ccaggcctag 360
gtctctgcca ctgaactatt aatctttctg gccatctgtc cgcactctgtg tgctgttttc 420
cttccacctg tcccggacc gtcccgcacc tgcaccccca acaatcacc agcatctgtc 480
cctccagcca tctctctcca tctgccactc ctccactcat ctgtccctcc ccatectcca 540
tcttccactc ctccaccat ctgtccctcc ccatectga gctcacttac tcaactaccc 600
catttctgac gctcagcggg tgggccatct gctcggaca tctggatagg gctgagacca 660
gggccgagac caggccctcg cactgcttgc aatctgagg ccagcccagg gggactctag 720
agcattaggc aggggtgggac agggaggggc ctggggcagg tcaggcaggt gagcacacag 780
ggcagcccca tccccggatc ccgctgtctc ccaggcgcag ttggcctcct gaccgtcatc 840
agcaaaggct gcagcttga ctgctgggat gactcacagg actactacgt gggcaagaag 900
aacatcacgt gctgtgacac cgacttgtgc aagccagcg gggcccatgc cctgcagccg 960
gctgccgcca tcttgcgct gctcccctgca ctggccctgc tgctctgggg acccggccag 1020
ctataggctc tggggggccc cgctgcagcc cacactgggt gtggtgcccc aggcctctgt 1080
gccactctc acacaccgg cccagtgga gctgtcctg gttcctgagg cacatcctaa 1140
cgcaagtctg accatgatg tctgcgcc cctgaccctc cctgaccctc ccatggcct 1200
ctccaggact cccaccggc agatcggctc tattgacaca gatccgctg cagatggccc 1260
ctccaaccct ctctgctgct gtttccatgg cccagcattc tccaccctta accctgtgct 1320
caggcacctc tccccaggg aagccttccc tgcccacccc atctatgact tgagccaggt 1380
ctggtccgtg gtgtcccccg caccagcag gggacaggca ctcaggaggg cccggtaaag 1440
gctgagatga agtggactga gtagaactgg aggcagggag tcgacgtgag ttcctggggag 1500
tctccagaga tggggcctgg aggcctggag gaaggggcca ggcctcacat tcgtggggct 1560
ccctgaatgg cagcctcagc acagcgtagg cccttaataa acacctgttg gataagcca 1619

```

<210> 18
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18

5

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1          5          10          15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
          20          25          30
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
          35          40          45
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50          55          60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
 65          70          75          80
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
          85          90          95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
          100          105          110
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
          115          120          125
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
          130          135          140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
          145          150          155          160
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
          165          170          175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
          180          185

```

10

<210> 19
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 19

15

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcaggagg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgct ggaccgcgcg catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgctgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttggt caacgccagc ggggcccatt ccctgcagcc 360
ggctgcccgc atccctgcgc tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg ttggtgccc caggcctctg 480
tgccactcct cacacaccgg gccagtgagg agcctgtcct ggttcctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtcccca ccctgaccct cccatggccc 600
tctccaggac tcccaccggg cagatcggct ctattgacac agatccgctt gcagatggcc 660
cctccaacct tctctgctgc tgtttccatg gccagcatt ctccaccctt aacctgtgct 720
tcaggcacct cttccccagc gaagccttcc ctgccacc cactatgac ttgagccagg 780
tctggtccgt ggtgtcccc gcaccagca ggggacaggc actcaggagg gcccgtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaagggggc aggcctcaca ttcgtggggc 960
tcctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020

```

<210> 20
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 20

5

```

Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser
 1          5          10
Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys
 20          25          30
Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly
 35          40          45
Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp
 50          55          60
Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr
 65          70          75          80
Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala

```

```

Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly
 85          90          95
Gln Leu 100          105          110

```

10

<210> 21
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 21

15

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1   5   20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
Leu Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
65  70  75  80  85  90  95  100 105 110 115 120 125 130 135 140
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
100 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
145 150 155 160 165 170 175
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
165 170 175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
180 185

```

5

<210> 22
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 22

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1   5   20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Pro Ala Ser Ser Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
65  70  75  80  85  90  95  100 105 110 115 120 125 130 135 140
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
100 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
145 150 155 160 165 170 175
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
165 170 175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
180 185

```

10

180

185

15

<210> 23
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 23

ES 2 384 622 T3

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20      25      30
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35      40      45
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50      55      60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr Asp Pro Ala Gln Trp
 65      70      75      80
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85      90      95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115      120
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130      135      140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145      150      155      160
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165      170      175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180      185

```

<210> 24
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 24

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20      25      30
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35      40      45
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50      55      60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Leu Ala Gln Trp
 65      70      75      80
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85      90      95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115      120
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130      135      140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145      150      155      160
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165      170      175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180      185

```

<210> 25
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

15

<400> 25

```

Met Thr His Arg Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95 100 105 110
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50  55  60  65  70  75  80  85  90  95 100 105 110 115 120 125
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
 65  70  75  80  85  90  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85  90  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160
Tyr Val Cys Thr Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145 150 155 160 165 170 175 180 185
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165 170 175 180 185
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180 185

```

<210> 26
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 26

```

Met Thr His Arg Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1   5   10  15  20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20  25  30  35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35  40  45  50  55  60  65  70  75  80  85  90  95 100 105 110
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50  55  60  65  70  75  80  85  90  95 100 105 110 115 120 125
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
 65  70  75  80  85  90  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85  90  95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Ser Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145 150 155 160 165 170 175 180 185
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165 170 175 180 185
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180 185

```

<210> 27
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

15

<400> 27

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35 40
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50 55 60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
 65 70 75 80
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85 90 95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ser Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115 120 125
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130 135 140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145 150 155 160
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165 170 175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180 185

```

<210> 28
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 28

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20
Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
 35 40
Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50 55 60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
 65 70 75 80
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85 90 95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115 120 125
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130 135 140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145 150 155 160
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165 170 175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Gln
 180 185

```

<210> 29
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

15

<220>
 <223> variantes de PSCA de comparación

20

<400> 29

ES 2 384 622 T3

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
      20      25      30
Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp Pro
      35      40      45
Ala Ser Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly Val Val
 50      55      60
Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp Glu Pro
65      70      75
Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met Tyr Val
      85      90      95
Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser Arg Thr
      100      105      110
Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala Asp Gly
      115      120
Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe Ser Thr
      130      135      140
Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe Pro Ala
145      150      155
His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser Pro Ala
      165      170      175
Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
      180      185

```

<210> 30
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 30

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
      20      25      30
Leu Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly Asp
      35      40      45
Pro Ala Ser Ser Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu Gly
 50      55      60
Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln Trp
65      70      75
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
      85      90      95
Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
      100      105      110
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
      115      120
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
      130      135      140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
145      150      155
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
      165      170      175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
      180      185

```

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de un polinucleótido de PSCA en una muestra de ensayo derivada de un individuo como un indicador de la presencia de cáncer que comprende:

poner en contacto la muestra con una sonda que se une específicamente al polinucleótido de PSCA, y

5 detectar la unión de la sonda con el polinucleótido de PSCA, seleccionándose el polinucleótido de PSCA del grupo que consiste en:

(a) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993;

10 (b) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 521 es T;

(c) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 578 es C;

(d) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 649 es G;

15 (e) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 653 es T;

(f) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 721 es A;

20 (g) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 781 es A;

(h) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 788 es G;

(i) un polinucleótido que comprende la secuencia de SEC ID N°: 11, desde el resto nucleotídico número 424 al 993, en el que el resto nucleotídico en 989 es A; y

25 (j) un polinucleótido completamente complementario de un polinucleótido de una cualquiera de (a) a (i);

en el que la etapa de detección comprende comparar una cantidad de unión de la sonda que se une específicamente al polinucleótido de PSCA con la cantidad de unión de la sonda al polinucleótido en una muestra de tejido normal correspondiente, y en el que la presencia de polinucleótido de PSCA elevado en la muestra de ensayo en relación con la muestra de tejido normal proporciona un indicio de la presencia de cáncer.

30 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido de PSCA es un ADNc producido a partir de la muestra por transcripción inversa.

3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el polinucleótido es un ARNm.

4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de la próstata, vejiga, riñón, colon, pulmón, ovario, mama y páncreas.

35 5. Un procedimiento *in vitro* para detectar la presencia de una proteína PSCA que tiene una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEC ID N°: 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 y 28 en una muestra de ensayo derivada de un individuo como un indicador de la presencia de cáncer que comprende:

poner en contacto la muestra con un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a la proteína PSCA, y

40 detectar una cantidad de unión del anticuerpo o fragmento del mismo con la proteína PSCA en la muestra de ensayo y comparar la unión del anticuerpo o fragmento del mismo con la proteína en una muestra de tejido normal, en el que la presencia de proteína PSCA elevada en la muestra de ensayo en relación con la muestra de tejido normal proporciona un indicio de la presencia de cáncer.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el anticuerpo o fragmento del mismo es monoclonal.

45 7. El procedimiento de la reivindicación 5 ó 6 en el que la etapa de detección comprende comparar una cantidad de unión de un anticuerpo que se une específicamente con la proteína PSCA en la muestra de ensayo y en una muestra normal correspondiente.

8. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que el cáncer se selecciona del grupo del consiste en cáncer de la próstata, vejiga, riñón, colon, pulmón, ovario, mama y páncreas.

Fig. 2A

La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 3) y aminoácidos (SEC ID N°: 6) de PSCA v.1. La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 18 al 389 incluyendo el codón de parada.

```

1           M K A V L L A L L M A G L A L
1  agggagagggcagtgaccATGAAGGCTGTGCTGCTTGGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCC
16  Q P G T A L L C Y S C K A Q V S N E D C
61  TGCAGCCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACT
36  L Q V E N C T Q L G E Q C W T A R I R A
121 GCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGCGCATCCGCG
56  V G L L T V I S K G C S L N C V D D S Q
181 CAGTTGGCCTCCTGACCGTCATCAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGGTGGATGACTCAC
76  D Y Y V G K K N I T C C D T D L C N A S
241 AGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCA
96  G A H A L Q P A A A I L A L L P A L G L
301 GCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCC
116 L L W G P G Q L *
361 TGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGgctctggggggccccgctgcagcccacactg
421 ggtgtggtgccccaggcctttgtgccactcctcacagaacctggcccagtgaggagcctgt
481 cctggttctctgaggcacatcctaacgcaagtttgaccatgtatgtttgacccccctttcc
541 ccnaacctgaccttcccatgggccttttccaggattcccacccggcagatcagttttag
601 tgacacagatccgctgcagatggccccctccaacctttctgttgctgtttccatggccc
661 agcattttccaccttaacctgtgttcaggcacttcttccccaggaagccttccctgc
721 ccaccccatttatgaattgagccaggtttgggtccgtggtgtcccccgacccagcagggg
781 acaggcaatcaggagggcccagtaaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggagg
841 acaagagttgacgtgagttcctgggagtttccagagatggggcctggaggcctggaggaa
901 ggggccaggcctcacatttgtggggctcccgaatggcagcctgagcacagcgtaggccct
961 taataaacacctgttgataagccaaaaaa

```

Fig. 2B

La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 1) y aminoácidos (SEC ID N°: 4) de PSCA v.2. La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 56 al 427 incluyendo el codón de parada.

```

1                                     M K
1 tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccATGAA
3  A V L L A L L M A G L A L Q P G T A L L
61 GGCTGTGCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT
23  C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC
43  Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I
181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
63  S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGCCTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
83  N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCC
103 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
361 GGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
123 L *
421 GCTATAGgctctggggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactcctcacacaccggcccagtgaggcctgtcctggttcctgaggcacatccta
541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc
601 tctccaggactcccaccggcagatcggtctattgacacagatccgcctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccaggaagccttccctgcccaccccatctatgacttgagccagg
781 tctggtccgtggtgtcccccgacccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagttagaactggaggacaggagtgcacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggc
961 tcctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctggttgataagcca

```

Fig. 2C

La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 7) aminoácidos (SEC ID N°: 10) de PSCA v.3. La secuencia Kozak se muestra en negrita, y la metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 423 al 707 incluyendo el codón de parada.

```

1  ttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgacatgaa
61  ggctgtgctgcttgccctggtgatggcaggcttggccctgcagccaggcactgccctgct
121  gtgctactcctgcaaagcccaggcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgc
181  agcttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgc
241  tgtgacaccgacttgtgcactcggcctgctgctctggggacccggccagctataggctct
301  ggggggccccgctgcagcccacactgggtggtgccccaggcctctgtgccactcctca
361  cacaccggccccagtgaggcctgtcctgggtcctgaggcacatcctaacgcaagtctga
1  M Y V C A P V P H P D P P M A L S R T P
421  ccATGTATGTCTGCGCCCCTGTCCCCACCCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTC
21  T R Q I G S I D T D P P A D G P S N P L
481  CCACCCGGCAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCCTCCAACCCTC
41  C C C F H G P A F S T L N P V L R H L F
541  TCTGCTGCTGTTTCCATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCT
61  P Q E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V
601  TCCCCAGGAAGCCTTCCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGG
81  S P A P S R G Q A L R R A R *
661  TGTCCCCCGCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAAaggctgagatgaa
721  gtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtctccagagat
781  ggggcctggaggcctggaggaagggccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggc
841  agcctcagcacagcgtagggcccttaataaacacctggtggataagcca

```

Fig. 2D

La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 11) y aminoácidos (SEC ID N°: 14) de PSCA v.4. La metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 424 al 993 incluyendo el codón de parada.

```

1 gacagtgaacctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
61 cccaggggttctggtgccgatcagcccaggagcgtcttcccgggtgcagtttctgatgcgggg
121 agggcagtgctgccttccggtcaccaggaccagtgctcagcccgcctgcttgacccctt
181 acttagctgggggtccaatccatacccaatcttagatgattcagacgatgggatttgaaact
241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccagggtga
301 gcaacgaggactgcctgcagggtggagaactgcaccagctgggggagcagtgctggaccg
361 cgcgcatccgcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcg
1 M T H R T T T W A R R T S R A V T P T
421 tggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACT
20 C A T P A G P M P C S R L P P S L R C S
481 TGTGCAACGCCAGCGGGGCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCC
40 L H S A C C S G D P A S Y R L W G A P L
541 CTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCCCCGCTG
60 Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P A Q
601 CAGCCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCGGCCCCAG
80 W E P V L V P E A H P N A S L T M Y V C
661 TGGGAGCCTGTCCTGGTTCCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTATGTCTGC
100 A P V P H P D P P M A L S R T P T R Q I
721 GCCCCTGTCCCCACCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGGCAGATC
120 G S I D T D P P A D G P S N P L C C C F
781 GGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCCCTCCAACCCTCTCTGCTGCTGTTTC
140 H G P A F S T L N P V L R H L F P Q E A
841 CATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCCAGGAAGCC
160 F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P A P
901 TTCCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCCCGCACCC
180 S R G Q A L R R A R *
961 AGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGTAAaggctgagatgaagtggactgagtaga
1021 actggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagctccagagatggggcctggaggcc
1081 tggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcagcacagc
1141 gtaggccttaataaacacctgttgataagcca

```

Fig. 2E

La secuencia de ADNc (SEC ID Nº: 15) y aminoácidos (SEC ID Nº: 18) de PSCA v.5. La metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 910 al 1479 incluyendo el codón de parada.

```

1 gacagtgaaccctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacagggc
61 cccagggttctcgtgccgatcagcccaggacggtcctcccgggtgcagttctgatgcgggg
121 agggcagtgctgccttccggtcaccaggaccagtgtcagcccgcctgcttgaccccctt
181 acttagctggggccaatccataccaatttagatgatcagacgatgggatttgaaact
241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccttgcctgtgtactcctgcaaagcccagggtga
301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcaccagctgggggagcagtgctggaccg
361 cgcgcatccgtgagtggggggacgacagccgcccaggcctaggtctctgcccactgaactat
421 taatccttctggccatctgtccgcacatctgtgtgtgttttccctccacactgtccccgacc
481 cgtccccgcactgcaccccccaacaatcaccagcatctgtccctccagccatcctcctcc
541 atctgccactcctccactcactctgtccctccccatcctccatcttccactcctccacca
601 tctgtccctccccatccctgagctcacttactcactcaccctttctgacgctcagcgg
661 gtggtccatctgcctcggacatctggatagggtgagaccaggccgagaccaggccctc
721 gcactgcttgcaatcctgaggccagcccagggggactctagagcattaggcaggggtggga
781 caggaggaggcctggggcaggtcaggcaggtgagcacacagggcagccccatccccgat
841 cccgctgctccccaggcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttga
1      M T H R T T T W A R R T S R A V T
901 actgcgtggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACA
18 P T C A T P A G P M P C S R L P P S L R
961 CCGACTTGTCGAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGC
38 C S L H S A C C S G D P A S Y R L W G A
1021 TGCTCCCTGCACCTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCC
58 P L Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P
1081 CCGCTGCAGCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCG
78 A Q W E P V L V P E A H P N A S L T M Y
1141 GCCCAGTGGGAGCCTGTCTGGTTCCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTAT
98 V C A P V P H P D P P M A L S R T P T R
1201 GTCTGCGCCCCTGTCCCCACCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGG
118 Q I G S I D T D P P A D G P S N P L C C
1261 CAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCTGCAGATGGCCCTCCAACCTCTCTGTGTC
138 C F H G P A F S T L N P V L R H L F P Q
1321 TGTTTCCATGGCCAGCATCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCCAG
158 E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P
1381 GAAGCCTTCCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCCC
178 A P S R G Q A L R R A R *
1441 GCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGTAAaggctgagatgaagtggactg
1501 agtagaactggaggacaggagtgcagctgagttcctgggagctccagagatggggcctg
1561 gaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcag
1621 cacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Fig. 2F

La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 19) y aminoácidos (SEC ID N°: 20) de PSCA v.6. La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 83 al 427 incluyendo el codón de parada.

```

1 tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgacccatgaa
1                               M A G L A L Q P G T A L L
61 ggetgtgctgcttgcacctgttgATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT
14 C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC
34 Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I
181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
54 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGCCTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
74 N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCATGCCCTGCAGCC
94 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
361 GGCTGCCGCCATCCTTGGCGCTGCTCCCTGCACCTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
114 L *
421 GCTATAGgetctgtggggggcccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactcctcacacaccggccagtgaggagcctgtcctggttcctgaggcacatccta
541 acgcaagtctgacccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgacctcccatggccc
601 tctccaggactcccacccggcagatcggtctatgacacagatccgcctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccaggaagccttcctgcccacccatctatgacttgagccagg
781 tctgggtccgtgggtgtcccccgacccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagttagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggc
961 tcctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttggataagcca

```

Fig. 2G

Variantes de SNP de PSCA v.2, PSCA v.7 a v.18. Las proteínas PSCA v.7 a v.18 tienen 123 aminoácidos. Las Variantes PSCA v.7 a v.18 son variantes con diferencia de nucleótido sencillo de PSCA v.2, y codifican la misma proteína que v.2. Aunque estas variantes de SNP se muestran por separado, también pueden aparecer en cualquier combinación y en cualquiera de las variantes de transcrito enumeradas anteriormente en las Figuras 2A a 2F.

Variante	Posición de ácido nucleico	Variación de ácido nucleico	Variación de aminoácido
PSCA v.7	367	C/T	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.8	424	A/C	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.9	495	C/G	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.10	499	C/T	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.11	563	C/T	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.12	567	G/A	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.13	627	G/A	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.14	634	T/G	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.15	835	G/A	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.16	847	G/A	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.17	878	G/A	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.18	978	C/G	<i>Variante silenciosa</i>

Fig. 2H

Variantes de SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 a v.30. Las proteínas PSCA v.19 a v.30 tienen 189 aminoácidos. Las variantes de PSCA v.19 a v.30 son variantes con diferencia de nucleótido sencillo de PSCA v.4. Las proteínas PSCA v.9, v.10, v.11, v.24 y v.25 difieren de PSCA v.1 en un aminoácido. PSCA v.23, v.28, v.29 y v.30 codifican la misma proteína que v.4. Aunque estas variantes de SNP se muestran por separado, también pueden aparecer en cualquier combinación y en cualquiera de las variantes de transcrito v.3 y v.4.

Variante	Posición de ácido nucleico	Variación de ácido nucleico	Posición de aminoácido	Variación de aminoácido
PSCA v.19	521	C/T	33	P/L
PSCA v.20	578	A/C	52	Y/S
PSCA v.21	649	C/G	76	H/D
PSCA v.22	653	C/T	77	P/L
PSCA v.23	717	C/T	98	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.24	721	G/A	100	A/T
PSCA v.25	781	G/A	120	G/S
PSCA v.26	788	T/G	122	I/S
PSCA v.27	989	G/A	189	R/Q
PSCA v.28	1001	G/A		<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.29	1032	G/A		<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.30	1132	C/G		<i>Variante silenciosa</i>

Fig. 3A

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.1 (SEC ID N°: 6). La proteína PSCA v.1 tiene 123 aminoácidos.

1 MKAVLLALLM AGLALQPGTA LLCYSCKAQV SNEDCLQVEN CTQLGEQCWT ARIRAVGLLT
 61 VISKGC SLNC VDDSDY YVG KKNITCCDTD LCNASGAHAL QPAAAILALL PALG LLLWGP
 121 GQL

Fig. 3B

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.3 (SEC ID N°: 10). La proteína PSCA v.3 tiene 94 aminoácidos.

1 MYVCAPVPHP DPPMALS RTP TRQIGSIDTD PPADGPSNPL CCCFHGPAFS TLNPVLRHLF
 61 PQEAFFAHPI YDLSQVWSVV SPAPSRGQAL RRAR

Fig. 3C

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.4 (SEC ID N°: 14). La proteína PSCA v.4 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHR TTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGMP CS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMYVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG
 121 SIDTDP PADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQ EAF PAHPIYDLSQ VWSVVPAPS
 181 RGQALRRAR

Fig. 3D

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.6 (SEC ID N°: 20). La proteína PSCA v.6 tiene 114 aminoácidos.

1 MAGLALQPGT ALLCYSCKAQ VSNEDCLQVE NCTQLGEQCW TARIRAVGLL TVISKGC SLN
 61 CVDDSDY YV GKNITCCDT DLCNASGAHA LQPAAAILAL LPALG LLLWGP GQL

Fig. 3E

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.19 (SEC ID N°: 21). La proteína PSCA v.19 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHR TTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGMP CS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMYVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG
 121 SIDTDP PADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQ EAF PAHPIYDLSQ VWSVVPAPS
 181 RGQALRRAR

Fig. 3F

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.20 (SEC ID N°: 22). La proteína PSCA v.20 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHR TTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGMP CS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SSRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMYVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG

121 SIDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3G

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.21 (SEC ID N°: 23). La proteína PSCA v.21 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
61 PTLGVVPQAS VPLLTDPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA FVPHDPPMA LSRTPTRQIG
121 SIDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3H

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.22 (SEC ID N°: 24). La proteína PSCA v.22 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
61 PTLGVVPQAS VPLLTHLAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA FVPHDPPMA LSRTPTRQIG
121 SIDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3I

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.24 (SEC ID N°: 25). La proteína PSCA v.24 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCT FVPHDPPMA LSRTPTRQIG
121 SIDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3J

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.25 (SEC ID N°: 26). La proteína PSCA v.25 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA FVPHDPPMA LSRTPTRQIS
121 SIDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3K

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.26 (SEC ID N°: 27). La proteína PSCA v.26 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA FVPHDPPMA LSRTPTRQIG
121 SSDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3L

Secuencia de aminoácidos de PSCA v.27 (SEC ID N°: 28). La proteína PSCA v.27 tiene 189 aminoácidos.

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDP A SYRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG
 121 SIDTDPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEA F PAHPIYDLSQ VWSVVS PAPS
 181 RGQALRR A Q

Fig. 4

Alineamiento de PSCA v.4 (SEC ID N°: 14) con homólogos conocidos

Alineamiento con antígeno de células madre de próstata humana (gi 27482160) (SEC ID N°: 30)

Puntuación = 277 bits (708), Expectativa = 8e-74

Identities = 187/189 (98%), Positivos = 187/189 (98%)

Consulta: 1 MTHRTTTWARRTSRAVTPTCATPAGPMPCSRLPPSLRCSLHSACCSGDPASYRLWGAPLQ 60
 MTHRTTTWARRTSRAVTPTCATPAGPMPCSRL PSLRCSLHSACCSGDPAS RLWGAPLQ
 Objeto: 1 MTHRTTTWARRTSRAVTPTCATPAGPMPCSRL LPSLRCSLHSACCSGDPASSRLWGAPLQ 60

Consulta: 61 PTLGVVPQASVPLLTHPAQWEPVLVPEAHPNASLTMVVCAPVPHDPDPPMALSRTPTRQIG 120
 PTLGVVPQASVPLLTHPAQWEPVLVPEAHPNASLTMVVCAPVPHDPDPPMALSRTPTRQIG
 Objeto: 61 PTLGVVPQASVPLLTHPAQWEPVLVPEAHPNASLTMVVCAPVPHDPDPPMALSRTPTRQIG 120

Consulta: 121 SIDTDPADGPSNPLCCCFHGPAPFSTLNPVLRHLFPQEAFFPAHP IYDLSQVWSVVS PAPS 180
 SIDTDPADGPSNPLCCCFHGPAPFSTLNPVLRHLFPQEAFFPAHP IYDLSQVWSVVS PAPS
 Objeto: 121 SIDTDPADGPSNPLCCCFHGPAPFSTLNPVLRHLFPQEAFFPAHP IYDLSQVWSVVS PAPS 180

Consulta: 181 RGQALRRAR 189
 RGQALRRAR
 Objeto: : 181 RGQALRRAR 189