

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 549 405**

51 Int. Cl.:

C07K 16/30 (2006.01)

A61P 13/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.05.2005 E 05752076 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.07.2015 EP 1753871**

54 Título: **Anticuerpos y moléculas relacionadas que se unen con proteínas de PSCA**

30 Prioridad:

28.05.2004 US 857484
28.05.2004 WO PCT/US2004/017231
05.10.2004 US 616381 P
12.10.2004 US 617881 P
21.10.2004 US 621310 P
02.12.2004 US 633077 P
14.04.2005 US 672000 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.10.2015

73 Titular/es:

AGENSYS, INC. (100.0%)
1800 Stewart Street
Santa Monica, CA 90404, US

72 Inventor/es:

GUDAS, JEAN;
JAKOBOVITS, AYA;
JIA, XIAO-CHI;
MORRISON, ROBERT, KENDALL;
MORRISON, KAREN, JANE, MEYRICK;
SHAO, HUI;
CHALLITA-EID, PIA, M. y
RAITANO, ARTHUR, B.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 549 405 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

Anticuerpos y moléculas relacionadas que se unen con proteínas de PSCA

5 **Campo de la invención**

La invención descrita en el presente documento se refiere a anticuerpos, así como fragmentos de unión de los mismos y moléculas modificadas técnicamente a partir de los mismos, que se unen con proteínas, denominadas PSCA. La invención se refiere además a métodos de diagnóstico, pronóstico, profilácticos y terapéuticos y composiciones útiles en el tratamiento de cánceres que expresan PSCA.

Antecedentes de la invención

El cáncer es la segunda causa principal de muerte de seres humanos junto a la enfermedad coronaria. En todo el mundo, millones de personas mueren de cáncer cada año. Solamente en los Estados Unidos, como se indica por 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 casos nuevos diagnosticados cada año. Aunque las muertes por enfermedad cardíaca se han estado reduciendo significativamente, las resultantes de cáncer generalmente están aumentando. A principios del siglo que viene, se predice que el cáncer se convertirá en la causa principal de muerte.

En todo el mundo, varios cánceres destacan como los más letales. En particular, los carcinomas del pulmón, próstata, mama, colon, páncreas, ovario y vejiga representan las causas principales de muerte por cáncer. Estos y prácticamente 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 drásticamente. Muchos pacientes con cáncer experimentan fuerte ansiedad impulsada por la consciencia del potencial de reaparición o fallo del tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan debilidad física después del tratamiento. Además, muchos pacientes con cáncer experimentan una reaparición.

En todo el mundo, el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más prevalente en hombres. En Norte América y el Norte de Europa, es con diferencia el cáncer más común en hombres y es la segunda causa principal de muerte por cáncer en hombres. Solamente en los Estados Unidos, más de 30.000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad, solamente detrás del cáncer de pulmón. A pesar de la magnitud de estas cifras, aún no hay ningún tratamiento eficaz para el cáncer de próstata metastásico. La prostatectomía quirúrgica, radioterapia, terapia de ablación hormonal, castración quirúrgica y quimioterapia continúan siendo las principales modalidades de tratamiento. Desafortunadamente, estos tratamientos son ineficaces para muchas personas y se asocian con frecuencia con consecuencias indeseables.

Con respecto al diagnóstico, la falta de un marcador de tumor de próstata que pueda detectar con precisión tumores localizados, en el estadio temprano, sigue siendo una limitación significativa en el diagnóstico y mantenimiento de esta enfermedad. Aunque el ensayo del antígeno específico de próstata (PSA) en suero ha sido una herramienta muy útil, sin embargo su especificidad y utilidad general se considera en general insuficiente en varios aspectos importantes.

El progreso en la identificación de marcadores específicos adicionales para cáncer de próstata se ha mejorado por la generación de xenoinjertos de cáncer de próstata que pueden recapitular diferentes estadios de una enfermedad en ratones. Los xenoinjertos de LAPC (Cáncer de Próstata de los Ángeles) son xenoinjertos 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 la dependencia de andrógenos a independencia de andrógenos (Klein *et al.*, 1997, Nat. Med. 3: 402). Más recientemente los marcadores de cáncer de próstata identificados incluyen PCTA-1 (Su *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), antígeno de membrana específica de próstata (PSM) (Pinto *et al.*, Clin Cancer Res 2 sep 1996 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 7 dic 1999; 96(25): 14523-8) y antígeno de células madre de próstata (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

Aunque marcadores previamente identificados tales como PSA, PSM, PCTA y PSCA han facilitado los intentos de diagnosticar y tratar el 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.

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 maligno. En el adulto, los dos tumores renales malignos principales son adenocarcinoma de células renales y carcinoma de células transicionales de la pelvis renal o el 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 al año en los Estados Unidos.

La cirugía ha sido la terapia principal para adenocarcinoma de células renales durante muchas décadas. Hasta hace poco, la enfermedad metastásica ha sido refractaria a cualquier terapia sistémica. Con los recientes desarrollos en las terapias sistémicas, particularmente inmunoterapias, el carcinoma de células renales metastásico puede enfocarse de forma agresiva en pacientes apropiados con posibilidad de respuestas duraderas. No obstante, sigue existiendo la 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 hombres (quinta neoplasia más común) y el 3 por ciento en mujeres (octava neoplasia más común). La incidencia está creciendo lentamente, simultáneamente con un aumento de la población mayor. 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 de 32 por cada 100.000 para hombres y de ocho por cada 100.000 en mujeres. La relación hombre/mujer histórica de 3:1 puede estar reduciéndose 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 y mortalidad del cáncer de vejiga aumenta fuertemente con la edad y será un problema creciente a medida que la población envejece.

La mayoría de los cánceres de vejiga reaparecen en la vejiga. El cáncer de vejiga se combate con una combinación de resección transuretral de la vejiga (TUR) y quimioterapia o inmunoterapia intravesical. La naturaleza multifocal y recurrente del cáncer de vejiga apunta a las limitaciones de TUR. La mayoría de los cánceres invasores de músculos no se curan solamente por TUR. La cistectomía radical y la diversión urinaria son los medios más eficaces para eliminar el cáncer pero tienen una influencia innegable en la función urinaria y sexual. Continúa existiendo una necesidad significativa de modalidades del tratamiento que sean beneficiosas para pacientes con cáncer de vejiga.

En 2000 en los Estados Unidos se produjo una estimación de 130.200 casos de cáncer colorrectal, incluyendo 93.800 casos de cáncer de colon y 36.400 de cáncer rectal. Los cánceres colorrectales son los terceros cánceres más comunes en hombres y mujeres. Las tasas de incidencia se redujeron significativamente durante 1992-1996 (-2,1 % al año). La investigación sugiere que estas reducciones se han debido a exploración y retirada de pólipos aumentadas, evitando la progresión de los pólipos a cánceres invasivos. Hubo una estimación de 56.300 muertes (47.700 de cáncer de colon, 8.600 de cáncer rectal) en 2000, que representan aproximadamente el 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 frecuentemente curativa. Se proporciona 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 intestinal o se ha propagado a los ganglios linfáticos. En ocasiones es necesaria una colostomía permanente (creación de una apertura abdominal para la eliminación de residuos corporales) para el cáncer de colon y no se requiere con frecuencia para cáncer rectal. Continúa existiendo la necesidad de modalidades de diagnóstico y tratamiento eficaces para cáncer colorrectal.

Hubo una estimación de 164.100 casos nuevos de cáncer de pulmón y bronquial en 2000, que representan el 14 % de todos los diagnósticos de cáncer de Estados Unidos. La tasa de incidencia de cáncer de pulmón y bronquial se está reduciendo significativamente en hombres, a partir de un 86,5 por cada 100.000 en 1984 hasta 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 era de 42,3 por cada 100.000.

El cáncer de pulmón y bronquial provocó una estimación de 156.900 muertes en 2000, lo que representa el 28 % de todas las muertes por cáncer. Durante 1992-1996, la mortalidad por cáncer de pulmón se redujo significativamente entre hombres (-1,7 % al año) mientras que las tasas de mujeres aún estaban creciendo significativamente (0,9 % al año). Desde 1987, más mujeres han muerto cada año de cáncer de pulmón que de cáncer de mama, que durante 40 años, fue la causa principal de muerte por cáncer en mujeres. La incidencia de cáncer de pulmón y tasas de mortalidad decrecientes probablemente resulten de tasas de tabaquismo reducidas durante los 30 años anteriores; sin embargo, la reducción de patrones de tabaquismo entre mujeres está por detrás de la de los hombres. Es preocupante que aunque las reducciones del uso del tabaco en adultos se han ralentizado, el uso del tabaco en jóvenes está aumentando de nuevo.

Se determinan opciones de tratamiento para cáncer pulmonar y bronquial mediante el tipo y estadio del cáncer e incluyen cirugía, radioterapia y quimioterapia. Para muchos cánceres localizados, la cirugía es habitualmente el tratamiento elegido. Debido a que la enfermedad se ha propagado habitualmente para cuando se ha descubierto, con frecuencia son necesarias radioterapia y quimioterapia en combinación con cirugía. La quimioterapia sola o combinada con radiación es el tratamiento elegido para 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, la necesidad continua de enfoques de tratamiento y diagnóstico eficaces para cánceres de pulmón y bronquiales.

Se espera que se produzcan una estimación de 182.800 nuevos casos invasivos de cáncer de mama entre mujeres en los Estados Unidos durante el 2000. Adicionalmente, se esperaba que se diagnosticaran aproximadamente 1400

nuevos casos de cáncer de mama en hombres en 2000. Después de aumentar aproximadamente 4 % al 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 cada 100.000.

5 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 segunda posición 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 temprana y tratamiento mejorado.

10 Teniendo en cuenta las circunstancias médicas y las referencias del paciente, el tratamiento de cáncer de mama puede implicar lumpectomía (retirada local del tumor) y retirada de los ganglios linfáticos bajo el brazo; mastectomía (retirada quirúrgica del pecho) y retirada de los ganglios linfáticos bajo el brazo; radioterapia; quimioterapia; o terapia hormonal. Con frecuencia, se usan dos o más métodos en combinación. Numerosos estudios han mostrado que, para enfermedad de estadio temprano, 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 las técnicas de reconstrucción proporcionan varias opciones para reconstrucción de mama después de la mastectomía. Recientemente, dicha reconstrucción se ha realizado al mismo tiempo que la mastectomía.

15 20 La escisión local del carcinoma ductal in situ (DCIS) con cantidades adecuadas de tejido de mama normal circundante pueden evitar la reaparición local del DCIS. La radiación a la mama y/o tamoxifeno pueden reducir la probabilidad de que se produzca de DCIS en el tejido de mama restante. Esto es importante porque el DCIS, si se deja sin tratar, puede desarrollarse a cáncer de mama invasivo. No obstante, hay efectos secundarios graves o secuelas para estos tratamientos. Por lo tanto, existe la necesidad de tratamientos de cáncer de mama eficaces.

25 30 Hubo una estimación de 23.100 casos nuevos de cáncer ovárico en los Estados Unidos en 2000. Representa 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 ovárico estaban reduciéndose significativamente. Hubo una estimación de 14.000 muertes en 2000 consecuencia del cáncer ovárico. El cáncer ovárico provoca más muertes que ningún otro cáncer del sistema reproductor femenino.

35 La cirugía, radioterapia y quimioterapia son opciones de tratamiento para cáncer ovárico. La cirugía incluye habitualmente la retirada de uno o ambos ovarios, las trompas de Falopio (salpingo ooforectomía) y el útero (histerectomía). En algunos tumores muy tempranos, solamente se retirará el ovario implicado, 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. Sigue existiendo una necesidad importante para opciones de tratamiento eficaces para cáncer ovárico.

40 45 Hubo una estimación de 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 comenzar 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 hombres (aproximadamente -0,9 % al año) mientras que las tasas han aumentado ligeramente entre mujeres.

50 La cirugía, radioterapia y quimioterapia son opciones de tratamiento para cáncer pancreático. Estas opciones de tratamiento pueden extender la supervivencia y/o aliviar síntomas en muchos pacientes pero probablemente no produzcan una cura para la mayoría. Sigue existiendo una necesidad significativa de opciones terapéuticas y de diagnóstico adicionales para cánceres. Estas incluyen el uso de anticuerpos, vacunas y moléculas pequeñas como modalidades de tratamiento. Además, también existe la necesidad de usar estas modalidades como herramientas de investigación para diagnosticar, detectar, controlar y avanzar en el estado de la técnica en todas las áreas de tratamiento de cáncer y estudios.

55 Se está descubriendo la utilidad terapéutica de los anticuerpos monoclonales (mAb) (G. Kohler y C. Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)). Se han aprobado ahora anticuerpos monoclonales como terapias en trasplante, cáncer, enfermedad infecciosa, enfermedad cardiovascular e inflamación. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras. Dichas diferencias en función se reflejan en estructuras tridimensionales distintas para los diversos isotipos de inmunoglobulina (P. M. Alzari *et al.*, *Annual Rev. Immunol.*, 6: 555-580 (1988)).

60 65 Debido a que los ratones son convenientes para inmunización y reconocen la mayoría de los antígenos humanos como ajenos, los mAb contra dianas humanas con potencial terapéutico han sido normalmente de origen murino. Sin embargo, los mAb murinos tienen desventajas inherentes como productos terapéuticos humanos. Requieren dosificación más frecuente ya que los mAb tienen una menor semivida en circulación en seres humanos que los anticuerpos humanos. Más críticamente, la administración repetida de anticuerpos murinos del sistema inmunitario humano provoca que el sistema inmunitario humano responda reconociendo la proteína de ratón como ajena y generando una respuesta de anticuerpo humano anti ratón (HAMA). Dicha respuesta de HAMA puede dar como

resultado reacción alérgica y la eliminación rápida del anticuerpo murino del sistema haciendo de este modo al tratamiento por anticuerpo murino inútil. Para evitar dichos efectos, se han realizado intentos para crear sistemas inmunitarios humanos dentro de ratones.

5 Los intentos iniciales esperaban crear ratones transgénicos capaces de responder a antígenos con anticuerpos que tienen secuencias humanas (véase Bruggemann *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 6709-6713 (1989)), pero estaban limitados por la cantidad de ADN que podría mantenerse de forma estable por vehículos de clonación disponibles. El uso de vectores de clonación de cromosoma artificial de levadura (YAC) condujo a la introducción de fragmentos de línea germinal grandes de locus Ig humano en mamíferos transgénicos. Esencialmente una mayoría de los genes de región V, D y J humana dispuestos con la misma separación hallados en el genoma humano y las regiones constantes humanas se introdujeron en los ratones usando YAC. Una de dichas cepas de ratón transgénica se conoce como ratones Xenomouse(r) y está disponible en el mercado de Abgenix, Inc. (Fremont CA).

15 El documento US 2004/0018571 analizan anticuerpos de anti antígeno de célula madre de próstata (PSCA) y muestra datos con respecto a la inhibición del crecimiento tumoral de LAPC-9 mediante anticuerpos monoclonales anti PSCA, incluyendo el anticuerpo designado 1 G8.

20 El documento WO 01/40309 desvela anticuerpos anti PSCA aislados que se internalizan tras la unión con PSCA en un mamífero *in vivo*, un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo anti PSCA y composiciones que comprenden un anticuerpo anti PSCA y un vehículo.

25 Ross, S. *et al.* (2002, Cancer Res., 62, p. 2546-2553) analiza un análisis de expresión de PSCA en tejidos urogenitales normales, hiperplasia prostática benigna, neoplasia intraepitelial prostática, y adenocarcinoma de próstata metastásico, y caracteriza anticuerpos anti PSCA monoclonales. Se han identificado varios anticuerpos anti PSCA como 6F8, 8D11 y 5F2.

El documento EP 1514876 analiza dos anticuerpos monoclonales anti PSCA, 1G8 y 3E6, y plantea la hipótesis de que pueden usarse anticuerpos monoclonales anti PSCA en inmunoterapia de cáncer de próstata.

30 El documento US 6.258.939 desvela varios anticuerpos monoclonales, incluyendo los designados como 1G8, 2H5, 3C5 y 4A10. La patente sugiere que estos anticuerpos podrían reconocer diferentes epítomos en la proteína diana PSCA.

35 Saffran, D. C. *et al.* (2001, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, p. 2658-2663) analiza los anticuerpos designados como 1G8, 2H5, 3C5 y 4A10, y la evaluación de la eficacia terapéutica de mAb anti PSCA en modelos de ratón de xenoinjerto de próstata humano.

Sumario de la invención

40 La invención proporciona anticuerpos así como fragmentos de unión de los mismos y moléculas modificadas técnicamente a partir de los mismos, que se unen con proteínas PSCA y fragmentos polipeptídicos de proteínas PSCA. La invención comprende anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos murinos y otros de mamífero, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y completamente humanos, y anticuerpos marcados con un marcador detectable o agente terapéutico. En ciertas realizaciones, existe la condición de que la secuencia de ácido nucleico completa de la Figura 3 no esté codificada y/o la secuencia de aminoácidos completa de la Figura 2 no esté preparada. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico completa de la Figura 3 está codificada y/o la secuencia de aminoácidos completa de la Figura 2 está preparada, estando una de las cuales en formas de dosis unitaria humana respectivas.

50 Se desvelan en el presente documento métodos para detectar la presencia y el estado de polinucleótidos y proteínas de PSCA en diversas muestras biológicas, así como métodos para identificar células que expresan PSCA. Una divulgación proporciona métodos para controlar los productos génicos de PSCA en un tejido o muestra de hematología que tiene o se sospecha que tiene alguna forma de desregulación tal como cáncer.

55 La invención proporciona además diversas composiciones inmunogénicas o terapéuticas y estrategias para tratar cánceres que expresen PSCA tales como cánceres de tejidos enumerados en la Tabla I, incluyendo terapias dirigidas a la inhibición de la transcripción, traducción, procesamiento o función de PSCA así como vacunas de cáncer. En un aspecto, la invención proporciona composiciones, y usos de las mismas, para tratar un cáncer que expresa PSCA en un sujeto humano en el que la composición comprende un vehículo adecuado para uso humano y una dosis unitaria humana de uno o más de un agente que inhibe la producción o función de PSCA. Preferentemente, el vehículo es un vehículo únicamente humano. En otro aspecto de la invención, el agente es un resto que es inmunorreactivo con proteína PSCA. Los ejemplos no limitantes de dichos restos incluyen, pero sin limitación, anticuerpos (tales como anticuerpos monocatenarios, monoclonales, policlonales, humanizados, quiméricos o humanos), funcionalmente equivalentes de los mismos (bien de origen natural o bien sintéticos) y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos pueden conjugarse con un resto de diagnóstico o terapéutico. Se desvela en el presente documento que el agente puede ser una molécula pequeña como se define en el presente

documento.

Breve descripción de las figuras

- 5 Figura 1. La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA (también denominada “PSCA v.1” o “PSCA variante 1”) se muestra en la Figura 1A. La metionina de partida está subrayada. La fase abierta de lectura se extiende desde el ácido nucleico 18-389 incluyendo el codón de terminación.
- La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 2 (también denominada “PSCA v.2”) se muestra en la Figura 1B. 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 terminación.
- 10 La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 3 (también denominada “PSCA v.3”) se muestra en la Figura 1C. 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 terminación.
- La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 4 (también denominada “PSCA v.4”) se muestra en la Figura 1D. 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 terminación.
- 15 La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 5 (también denominada “PSCA v.5”) se muestra en la Figura 1E. 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 terminación.
- La secuencia de ADNc y aminoácidos de PSCA variante 6 (también denominada “PSCA v.6”) se muestra en la Figura 1F. 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 terminación.
- Figura 1G. 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 de PSCA v.7 a v.18 son variantes con una diferencia de un único nucleótido con respecto a 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 1A a 1F.
- 20 Figura 1H. 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 una diferencia de un único nucleótido con respecto a 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.
- Figura 1I. Expresión de variantes de PSCA. (1I(a)) Los cebadores se diseñaron para diferenciar entre las variantes de PSCA v.1/v.2/v.4, PSCA v.3 y PSCA v.5. Los cebadores A y B, indicados por flechas pequeñas encima de los exones en la Figura dan como resultado un producto de PCR de 425 pb para PSCA v.1/v.2/v.4, un producto de PCR de 300 pb para PSCA v.3 y un producto de PCR de 910 pb para PSCA v.5. (1I(b)) se preparó ADNc de primera cadena de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normales, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga, 25 cáncer de riñón, cáncer de colon, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer de páncreas. Se realizó normalización por PCR usando cebadores para actina. Se realizó PCR semicuantitativa, usando los cebadores específicos de variante a 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 menor nivel 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 tejidos normales, se detectó producto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 PCR solamente en próstata, estómago y a menor nivel 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.
- 30 Figura 1J. Expresión de PSCA v.4 y PSCA v.5. 1J(a) se diseñaron cebadores para diferenciar entre PSCA v.4 y PSCA v.5 como se indica por las flechas marcadas B y C en la Figura. Los cebadores específicos para PSCA v.4 conducen a un producto de PCR de 460 pb, mientras que los cebadores específicos para PSCA v.5 conducen a un producto de PCR de 945 pb de tamaño. 1J(b) se preparó ADNc de primera cadena a partir de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normales, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo de multixenoinjerto (xenoinjertos de cáncer de 35 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 a 30 ciclos de amplificación. Los resultados muestran expresión de PSCA v.4 en cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo de multixenoinjerto, riñón normal y próstata. Se detectó PSCA v.5 solamente en próstata normal y cáncer de vejiga.
- Figura 2. Secuencias de Aminoácidos de anticuerpos de PSCA. Figura 2A. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.117 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2B. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.117 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2C. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.120 VH. Figura 2D. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.120 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2E. La secuencia de aminoácidos de Ha1-5.99 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2F. La secuencia de aminoácidos de Ha1-5.99 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2G. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.121 VH. Está subrayada la región
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

constante de cadena pesada. Figura 2H. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.121 VL c.5. Está subrayada la
 región constante de cadena ligera. Figura 2I. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.121 VL c.26. Está
 subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2J. La secuencia de aminoácidos de Ha1-1.16 VH. Está
 subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2K. La secuencia de aminoácidos de Ha1-1.16 VL. Está
 5 subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2L. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.5 VH. Está
 subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2M. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.5 VL. Está
 subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2N. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.40 VH. Está
 subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2O. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.40 VL.
 Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2P. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.37 VH.
 10 Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2Q. La secuencia de aminoácidos de Ha1-4.37
 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2R. La secuencia de aminoácidos de Ha1-1.43
 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2S. La secuencia de aminoácidos de Ha1-
 1.43 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 2T. La secuencia de aminoácidos de Ha1-
 1.152 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 2U. La secuencia de aminoácidos de
 15 Ha1-1.152 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera.
 Figura 3. Secuencias de Nucleótidos y Aminoácidos de anticuerpos de PSCA. Figura 3A. La secuencia de ADNc
 y aminoácidos de Ha1-4.117 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 3B. La
 secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.117 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera.
 20 Figura 3C. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.120 VH. Está subrayada la región constante de
 cadena pesada. Figura 3D. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.120 VL. Está subrayada la región
 constante de cadena ligera. Figura 3E. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-5.99 VH. Está subrayada la
 región constante de cadena pesada. Figura 3F. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-5.99 VL. Está
 subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 3G. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.121
 25 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 3H. La secuencia de ADNc y aminoácidos de
 Ha1-4.121 VL c.5. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 3I. La secuencia de ADNc y
 aminoácidos de Ha1-4.121 VL c.26. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 3J. La
 secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-1.16 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada.
 30 Figura 3K. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-1.16 VL. Está subrayada la región constante de cadena
 ligera. Figura 3L. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.5 VH. Está subrayada la región constante de
 cadena pesada. Figura 3M. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.5 VL. Está subrayada la región
 constante de cadena ligera. Figura 3N. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.40 VH. Está subrayada la
 región constante de cadena pesada. Figura 3O. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.40 VL. Está
 subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 3P. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-4.37
 35 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 3Q. La secuencia de ADNc y aminoácidos de
 Ha1-4.37 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 3R. La secuencia de ADNc y
 aminoácidos de Ha1-1.43 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada. Figura 3S. La secuencia
 de ADNc y aminoácidos de Ha1-1.43 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera. Figura 3T. La
 secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-1.152 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada.
 40 Figura 3U. La secuencia de ADNc y aminoácidos de Ha1-1.152 VL. Está subrayada la región constante de
 cadena ligera.
 Figura 4. Alineamiento de anticuerpos de PSCA para Secuencias V-D-J de línea germinal. Figura 4A.
 Alineamiento de Ha1-4.117 VH (SEC ID N°: 13) con VH4-31 humano. Figura 4B. Alineamiento de Ha1-4.117 VL
 (SEC ID N°: 14) con L19 humano. Figura 4C. Alineamiento de Ha1-4.120 VH (SEC ID N°: 15) con VH4-31
 45 humano. Figura 4D. Alineamiento de Ha1-4.120 VL (SEC ID N°: 16) con 02 humano. Figura 4E. Alineamiento de
 Ha1-5.99 VH (SEC ID N°: 17) con VH4-34 humano. Figura 4F. Alineamiento de Ha1-5.99 VL (SEC ID N°: 18) con
 A27 humano. Figura 4G. Alineamiento de Ha1-4.121 VH (SEC ID N°: 19) con VH4-34 humano. Figura 4H.
 Alineamiento de Ha1-4.121 c.5 VL (SEC ID N°: 20) con 08 humano. Figura 4I. Alineamiento de Ha1-4.121 c.26
 VL (SEC ID N°: 21) con A3 humano. Figura 4J. Alineamiento de Ha1-1.16 VH (SEC ID N°: 22) con VH6-1
 humano. Figura 4K. Alineamiento de Ha1-1.16 VL (SEC ID N°: 23) con B3 humano. Figura 4L. Alineamiento de
 50 Ha1-4.37 VH (SEC ID N°: 28) con VH4-31 humano. Figura 4M. Alineamiento de Ha1-4.37 VL (SEC ID N°: 29)
 con 02 humano.
 Figura 5. Expresión de la proteína PSCA en líneas celulares murinas, de rata y humanas recombinantes. Las
 líneas celulares murinas, de rata y humanas indicadas se infectaron con retrovirus que portaban el ADNc de
 PSCA humano y un gen de resistencia a neomicina o virus de control solamente con el gen de resistencia a
 55 neomicina. Se seleccionaron líneas celulares recombinantes estables en presencia de G418. Se determinó la
 expresión de PSCA por tinción de FACS con el MAb anti PSCA 1G8 (5 µg/ml). Se muestra el perfil de FACS de
 cada línea celular que demuestra un desplazamiento fluorescente solamente en la línea infectada por PSCA
 indicativo de expresión de PSCA en superficie celular. Estas líneas son útiles en el desarrollo de MAb como
 inmunógenos, reactivos de exploración de MAb y en ensayos funcionales.
 60 Figura 6. Purificación de proteína PSCA de *E. coli*. Se transformó la cepa de *E. coli* BL21 pLysS con el vector
 pET-21b que codificaba los aminoácidos 21-94 del ADNc de PSCA. La proteína PSCA se expresó por inducción
 de cultivos de fase logarítmica con IPTG y se purificó por cromatografía de afinidad a partir de las fracciones
 soluble o insoluble de las bacterias lisadas. Se muestran geles teñidos con azul de Coomassie SDS-PAGE de las
 fracciones eluidas. Esta proteína es útil como un MAb e inmunógeno de pAb y como un reactivo de exploración
 65 de anticuerpos.
 Figura 7. Purificación de proteína PSCA glucosilada recombinante expresada a partir de células 293T. Se

transfectaron células 293T con el vector psecTag2 que portaba un ADNc de PSCA que codificaba los aminoácidos 28-100. Se creó una línea celular secretora de PSCA recombinante estable por selección farmacológica con higromicina B. Se purificó proteína PSCA presente en medio de cultivo acondicionado por cromatografía de afinidad usando el MAb 1G8. Se muestra un gel de SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie de las fracciones eluidas a pH bajo. La mancha de peso molecular amplio de la proteína demuestra glucosilación de proteína PSCA recombinante como se ha visto en PSCA expresada de forma endógena.

Figura 8. Purificación de proteína GST-PSCA de *E. coli*. Se transformó cepa de *E. coli* BL21 DE3 con pGEX-2T que codificaba los aminoácidos 18-98 de PSCA fusionado con glutatión-S-transferasa (GST). Se indujo proteína GST-PSCA con isopropilo-beta-D-tiogalactopiranosido (IPTG) a partir de cultivo en fase logarítmica y se purificó a partir de bacterias lisadas por cromatografía de afinidad con matriz de agarosa de glutatión. Se muestra un gel teñido con azul de Coomassie de SDS-PAGE de las fracciones eluidas con glutatión que contenían GST-PSCA. Se indica la proteína de fusión GST-PSCA intacta y un producto de degradación menor que contiene GST. Esta proteína es útil como un MAb e inmunógeno de pAb y como un reactivo de exploración de Ab.

Figura 9. Exploración con respecto a anticuerpos de PSCA por FACS. Se determinó la concentración de anticuerpos a partir de sobrenadantes por ELISA. Se añadieron 50 μ l/pocillo de (puro) a placas de FACS de 96 pocillos y se diluyó en serie. Se añadieron células que expresaban PSCA (endógenas o recombinantes, 50.000 células/pocillo) y la mezcla se incubó a 4 °C durante dos horas. Después de la incubación, las células se lavaron con tampón de FACS y se incubaron adicionalmente con 100 μ l de anticuerpo de detección (anti hlgG-PE) durante 45 minutos a 4 °C. Al final de la incubación, las células se lavaron con tampón de FACS, se fijaron con formaldehído y se analizaron usando FACScan. Los datos se analizaron usando el software CellQuest Pro. Histogramas sólidos representan datos de células de control negativo y los histogramas abiertos indican datos de células positivas para PSCA.

Figura 10. Clasificación por afinidad relativa de MAb de PSCA por FACS. Se incubaron 21 diluciones en serie 1:2 de cada anticuerpo de PSCA con células SW780 (50.000 células por pocillo) durante una noche a 4 °C (las concentraciones de MAb finales variaron de 40 nM a 0,038 pM). Al final de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo de detección anti hlgG-PE. Después de lavar los anticuerpos secundarios no unidos, las células se analizaron por FACS y se obtuvo la intensidad de fluorescencia media de cada punto usando software CellQuest Pro. Se calculó la afinidad con software Graphpad Prism usando una ecuación de Respuesta a Dosis Sigmoidea (pendiente variable). En la figura se presenta un análisis de FACS representativo que representa la valoración de unión para MAb de PSCA 4.121.

Figura 11. Expresión de PSCA murino y de mono cinomolgus en células 293T y reconocimiento por MAb anti PSCA humano. Se transfectaron de forma transitoria células 293T con el vector pCDNA3.1 que porta el ADNc de PSCA murino, el ADNc de PSCA de simio o con vector vacío (neo). Dos días después de la transfección, las células se recogieron y se tiñeron con MAb humano anti PSCA Ha1-4.117 o MAb murino 1G8 (5 μ g/ml). Se muestra el perfil de FACS que demuestra que MAb Ha1-4.117 inducido para la proteína PSCA humana se une con la proteína PSCA tanto murina como de simio expresada en células 293T. El MAb murino 1G8 se une con PSCA de simio pero no con PSCA murino. Dichos resultados demuestran la capacidad para seleccionar MAB que reaccionan de forma cruzada con el antígeno de otra especie. Los MAb de reacción cruzada serán útiles para estudiar la expresión y toxicidad en estas especies.

Figura 12. Internalización de PSCA después de incubación con Mab 4.121. Se incubó MAb de PSCA 4.121 con células PC3-PSCA a 4 °C durante 90 minutos para permitir la unión de los anticuerpos con la superficie celular. Las células se dividieron después en dos alícuotas y se incubaron a 37 °C (para permitir la internalización del anticuerpo) o 14 °C (control sin internalización). Después de incubación a 37 °C o 4 °C, el MAb de PSCA 4.121 restante unido a la superficie celular se retiró con un lavado ácido. La permeabilización e incubación posterior con un anticuerpo de detección secundario permitió la detección de MAB de PSCA 4.121 internalizado. Las células se analizaron usando FACS o se observaron bajo el microscopio de fluorescencia. Se internalizaron aproximadamente 30 % de MAb de PSCA 4.121 después de incubación a 37 °C durante dos horas.

Figura 13. Los anticuerpos para PSCA median en la destrucción dependiente de saporina en células que expresan PSCA. Se sembraron células B300.19 (750 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos el día 1. Al día siguiente se añadió a cada pocillo un volumen igual de medio que contenía una concentración 2x del anticuerpo primario indicado junto con un exceso doble de anticuerpo policlonal anti humano (Hum-Zap) o anti cabra (Cabra-Zap) conjugado con toxina saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA). Se permitió que las células se incubaran durante 5 días a 37 grados C. Al final del periodo de incubación, se añadió MTS (Promega) a cada pocillo y la incubación continuó durante 4 horas adicionales. Se determinó la DO a 450 nM. Los resultados en la Figura 13(A) muestran que los anticuerpos de PSCA HA1-4.121 y HA1-4.117 mediaron en la citotoxicidad dependiente de saporina en células B300.19-PSCA mientras que un anticuerpo IgG₁ no específico, de control, no tuvo ningún efecto. Los resultados en la Figura 13(B) muestran que la adición de un anticuerpo secundario conjugado con saporina que no reconocía Fc humano no conseguía mediar en la citotoxicidad.

Figura 14. Citotoxicidad mediada por complemento de Mab de PSCA. Se diluyeron anticuerpos de PSCA (0-50 μ g/ml) con tampón RHB (RPMI 1640, Gibco Life Technologies, HEPES 20 mM). Se lavaron células que expresaban PSCA B300.19 en tampón RHB y se resuspendieron a una densidad de 106 células/ml. En un ensayo típico, se añadieron 50 μ l de anticuerpo de PSCA, 50 μ l de suero de complemento de conejo diluido (Cedarlane, Ontario, Can) y 50 μ l de una suspensión celular juntos en una placa de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano. La mezcla se incubó durante 2 horas a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 % para facilitar la lisis celular mediada por complemento. Se añadieron 50 μ l de Azul de Alamar (Biosource Intl. Camarillo, CA) a cada

pocillo y la incubación continuó durante 4-5 horas adicionales a 37 °C. La fluorescencia en cada pocillo se leyó usando un fluorímetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados muestran que los anticuerpos de PSCA que tienen un isotipo IgG₁ (HA1-4.121) o un isotipo IgG₂ (HA1-5.99.1) pero no un isotipo IgG₄ (HA1-6.46) fueron capaces de mediar en la lisis dependiente del complemento de células diana.

Figura 15. Generación de fragmentos F(ab')₂ de MAb Ha1-4.121 por digestión con pepsina. Se incubaron 20 mg de MAb Ha1-4.121 en tampón de acetato sódico 20 mM pH 4,5 con y sin pepsina inmovilizada (Pierce. Rockford IL) durante los tiempos indicados. Se retiraron MAb intacto y fragmentos Fc digeridos por cromatografía de proteína A. Se muestra un gel teñido con Coomassie SDS-PAGE de MAb no reducido no digerido intacto, alícuotas no reducidas de material digerido tomadas en los tiempos indicados y una muestra reducida del producto de F(ab')₂ digerido final.

Figura 16. Unión de mAb humano anti PSCA recombinante con PSCA por citometría de flujo. (16A) se transfectoron células 293T con construcciones de expresión que codificaban las cadenas pesadas y ligeras de mAb humano anti PSCA. Se recogió sobrenadante después de 48 horas y se ensayó con respecto a unión con PSCA. (16B) se purificó mAb humano anti PSCA a partir de sobrenadante de hibridoma y se usó para ensayos de unión a PSCA. La unión con PSCA se ensayó de la siguiente manera. Se incubaron células PC3 parentales o PC3-PSCA con los mAb humanos anti PSCA descritos anteriormente durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron e incubaron con anti Ig humano conjugado con PE durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y después se ensayaron por citometría de flujo.

Figura 17. Detección de la proteína PSCA por inmunohistoquímica. Se detectó la expresión de proteína PSCA en muestras de ensayo tumorales de pacientes con cáncer usando el anticuerpo HA1-4.117. Se cortaron tejidos incluidos en parafina, fijados en formalina en secciones de 4 micrómetros y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones se desecaron, se rehidrataron y se trataron con solución de recuperación de antígenos (Solución de Recuperación de Antígenos Citra; BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA, 94583) a temperatura ambiente. Las secciones se incubaron después en anticuerpo anti PSCA monoclonal humano conjugado con fluoresceína, Ha1-4.117, durante 16 horas a 4 °C. Los portaobjetos se lavaron tres veces en tampón y se incubaron además con anti Fluoresceína de Conejo durante 1 hora y, después de lavar en tampón, se sumergieron en anticuerpo secundario de cabra anti inmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa DAKO EnVision+™ (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) durante 30 minutos. Las secciones se lavaron después en tampón, se revelaron usando el kit DAB (SIGMA Chemicals), se contratificaron usando hematoxilina, y se analizaron por microscopía de campo claro. Los resultados muestran la expresión de PSCA en las células tumorales de adenocarcinoma de próstata (Panel A, Panel B), carcinoma transicional de vejiga (Panel C) y adenocarcinoma ductal pancreático (Panel D). Estos resultados indican que PSCA se expresa en cánceres humanos y que anticuerpos dirigidos a este antígeno son útiles como reactivos de diagnóstico.

Figura 18. El MAb de PSCA Ha1-4.120 Inhibe el Crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Subcutáneos. Se inyectaron por vía subcutánea células tumorales LAPC-9AI (2,0 x 10⁶ células) en ratones SCID macho. Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 en cada grupo) y el tratamiento se inició por vía intraperitoneal (i.p.) el Día 0 con MAb HA1-4.120 o de isotipo de control como se indica. Los animales se trataron dos veces por semana para un total de 7 dosis hasta el día del estudio 28. El crecimiento tumoral se controló usando mediciones por calibrador cada 3 a 4 días como se indica. Los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal anti PSCA Humano Ha1-4.120 inhibía significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata humana implantados por vía subcutánea en ratones SCID (p < 0,05).

Figura 19. El MAb de PSCA Ha1-5.99 Inhibe el Crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Establecidos en ratones SCID. Se inyectaron por vía subcutánea células tumorales LAPC-9AI (2,0 x 10⁶ células) en ratones SCID macho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 50 mm³, los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 en cada grupo) y el tratamiento se inició por vía intraperitoneal (i.p.) con HA1-5.99.1 o MAb de control de isotipo como se indica. Los animales se trataron dos veces por semana para un total de 5 dosis hasta el día del estudio 14. El crecimiento tumoral se controló usando mediciones por calibrador cada 3 a 4 días como se indica. Los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal completamente humano anti PSCA Ha1-5.99 inhibía significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata humana independientes de andrógenos establecidos implantados por vía subcutánea en ratones SCID (p < 0,05).

Figura 20. El MAb de PSCA HA1-4.121 Inhibe el Crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Humana dependiente de Andrógenos Establecido. Se inyectaron por vía subcutánea células tumorales LAPC-9AD (2,5 x 10⁶ células) en ratones SCID macho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 40 mm³, los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 en cada grupo) y el tratamiento se inició por vía intraperitoneal (i.p.) con concentraciones crecientes de HA1-4.121 o MAb de control de isotipo como se indica. Los animales se trataron dos veces por semana con un total de 7 dosis hasta el día del estudio 21. El crecimiento tumoral se controló usando mediciones por calibrador cada 3 a 4 días como se indica. Los resultados de este estudio demostraron que HA1-4.121 inhibió el crecimiento de xenoinjertos de próstata dependientes de andrógenos humanos subcutáneos establecidos en ratones SCID. Los resultados fueron estadísticamente significativos para el grupo de dosis de 300 µg los días 14, 17 y 21 (p < 0,05, ensayo de Kruskal-Wallis, de doble cara con α=0,05) y para el grupo de dosis de 700 µg los días 10, 14, 17 y 21 (p < 0,05, ensayo de Kruskal-Wallis, de doble cara con α=0,05).

Figura 21. Se inyectaron células tumorales LAPC-9AD, dependientes de andrógeno, derivadas de pacientes (2,0 x 10⁶ células) en los lóbulos dorsales de las próstatas de ratones SCID macho. Se permitió que los tumores crecieran durante aproximadamente 10 días momento en el cual los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos. El tratamiento con 500 µg de HA1-4.117, HA1-4.121 o MAb de control de Isotipo humanos se inició 10 días después del implante tumoral. Los anticuerpos se suministraron por vía intraperitoneal dos veces por

semana para un total de 7 dosis. Cuatro días después de la última dosis, los animales se sacrificaron y los tumores primarios se escindieron y se pesaron. Los resultados muestran que anticuerpos monoclonales humanos anti PSCA Ha1-4.121 ($p < 0,01$) y Ha1-4.117 ($p < 0,05$) inhibieron significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata LAPC-9AD implantados de forma ortotópica en ratones SCID.

Figura 22. El MAb de PSCA HA1-4.121 Prolonga la Supervivencia de Ratones SCID con Tumores de Próstata Dependientes de Andrógeno Humanos Ortotópicos Establecidos. Se inyectaron células tumorales LAPC-9AD, dependientes de andrógeno, derivadas de pacientes ($2,0 \times 10^6$ células) en los lóbulos dorsales de las próstatas de ratones SCID macho. Se permitió que los tumores crecieran durante aproximadamente 9 días momento en el cual los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos. Los animales clasificados aleatoriamente en los grupos de supervivencia incluyen 11 ratones en el MAb de control de isotipo y 12 ratones en el grupo tratado con HA1-4.121. Los animales se trataron i.p. con $1000 \mu\text{g}$ de Ha1-4.121 o $1000 \mu\text{g}$ de MAb de control de isotipo dos veces por semana para un total de 9 dosis. Los resultados demostraron que HA1-4.121 prolongaba significativamente (ensayo de rangos logarítmicos: $p < 0,01$) la supervivencia de ratones SCID con tumores de próstata dependientes de andrógeno humanos. Dos ratones en el grupo tratado con HA1-4.121 permanecieron sin tumores palpables 110 días después del último tratamiento.

Figura 23. Inhibición Potenciada del Crecimiento de Tumor de Próstata con HA1-4.21 y Terapia de Combinación de Taxotere. Se inyectaron por vía subcutánea células tumorales LAPC-9AI (2×10^6 células por animal) en ratones SCID macho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 65 mm^3 , los animales se clasificaron aleatoriamente y se asignaron a cuatro grupos diferentes ($n=10$ en cada grupo) como se indica. Comenzando el día 0, se administraron Ha1-4.121 o MAb de control de isotipo i.p. dos veces por semana a una dosis de $500 \mu\text{g}$ para un total de 6 dosis. La última dosis se proporcionó el día 17. Se proporcionó Taxotere por vía intravenosa a una dosis de 5 mg/kg los días 0, 3 y 7. El crecimiento tumoral se controló cada 3-4 días usando mediciones por calibrador. Los resultados de este estudio demuestran que HA1-4.121 como un único agente inhibía el crecimiento de xenoinjertos de próstata independientes de andrógeno en ratones SCID en un 45 % en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control solo el día 28 (ANOVA/ensayo de Tukey: $p < 0,05$). La administración del MAb de control de isotipo más taxotere inhibió el crecimiento tumoral en 28 % en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control solamente, que no era estadísticamente significativo. La administración de HA1-4.121 en combinación con Taxotere potenció el efecto y dio como resultado una inhibición del 69 % del crecimiento tumoral en comparación con anticuerpo de control solamente (ANOVA/ensayo de Tukey: $p < 0,01$). También se demostró una diferencia estadísticamente significativa cuando el grupo de combinación de HA1-4.121 más Taxotere se comparó con los grupos de HA1-4.121 o MAb de control de isotipo más Taxotere (ANOVA/ensayo de Tukey: $p < 0,05$).

Figura 24. Los MAb de PSCA Humanos Inhiben el Crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer Pancreático en ratones SCID/HPAC Humano. Se inyectaron por vía subcutánea células cancerosas pancreáticas (2×10^6 /ratón) en ratones ICR SCID inmunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos ($n= 10$ animales/grupo) y se inició el tratamiento con el anticuerpo monoclonal de PSCA humano indicado el mismo día. Se suministraron por vía intraperitoneal anticuerpos (500 mg/ratón) dos veces por semana para un total de 8 dosis. Los resultados demostraron que los anticuerpos monoclonales anti PSCA humanos Ha1-4.121, Ha1-4.117 y Ha1-1.16 inhibieron significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer pancreático humano implantados por vía subcutánea en ratones SCID. Se realizaron análisis estadísticos usando un ensayo de t (de doble cara, $\alpha=0,05$).

Figura 25. El MAb de PSCA HA1-4.121 Inhibe el Crecimiento de Tumores Pancreáticos Implantados de forma Ortotópica en Ratones SCID. Se implantaron células HPAC ($3,0 \times 10^6$ células) de forma ortotópica en los páncreas de ratones SCID. Los ratones se asignaron aleatoriamente a tres grupos ($n=9$ en cada grupo) como se indica. El tratamiento con HA1-4.121 ($250 \mu\text{g}$ o $1000 \mu\text{g}$) o MAb de control de isotipo ($1000 \mu\text{g}$) se inició el día de la implantación. Los anticuerpos se administraron i.p. dos veces por semana para un total de 10 dosis. Trece días después de la última dosis, los animales se sacrificaron y los tumores primarios se escindieron y se pesaron. Los resultados de este estudio demostraron que HA1-4.121 inhibía significativamente el crecimiento ortotópico de xenoinjertos de cáncer pancreático humano en ratones SCID a ambos niveles de dosis examinados. El tratamiento con $250 \mu\text{g}$ y $1000 \mu\text{g}$ de AGS-PSCA inhibió el crecimiento tumoral en 66 % y 70 %, respectivamente (ensayo de Kruskal-Wallis/Tukey: $p < 0,01$ y $p < 0,01$, respectivamente).

Figura 26. El MAb de PSCA HA1-4.121 inhibe las metástasis. En la autopsia, se observaron metástasis visibles a ganglios linfáticos y órganos distantes en el grupo tratado con anticuerpo de control. No se observaron metástasis visibles en ninguno de los grupos tratados con HA1-4.121. Se retiraron los ganglios linfáticos, pulmones e hígados de todos los animales y se examinaron de forma histológica con respecto a la presencia de tumor metastásico. Se tiñeron secciones de los pulmones y ganglios linfáticos retirados de cada animal con respecto a citoqueratina humana y el número de metástasis se determinó de forma microscópica. Los resultados del análisis histológico demostraron una reducción significativa en las metástasis de ganglios linfáticos (LN) en animal tratado con HA1-4.121 ($p = 0,0152$ como se detectó por ensayo exacto de Fisher). La incidencia de metástasis e invasión también se redujo significativamente en animales tratados con ambas concentraciones de HA1-4.121 ($p = 0,0152$ como se detectó por ensayo exacto de Fisher). El número de metástasis pulmonares se redujo significativamente en ratones tratados con la dosis de $1,0 \text{ mg}$ de HA1-4.121 solamente ($p = 0,0498$ como se detectó por ensayo exacto de Fisher).

Figura 27. Los MAb de PSCA Humanos Inhiben el Crecimiento de Tumores de Vejiga SW780 en Ratones SCID. Se inyectaron por vía subcutánea células cancerosas de vejiga SW780 humanas (2×10^6 /ratón) en ratones ICR

SCID inmunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n= 10 animales/grupo) y el tratamiento con el MAAb de PSCA humano indicado se inició el mismo día. Se suministraron por vía intraperitoneal anticuerpos (250 mg/ratón) dos veces por semana para un total de 7 dosis. Los resultados demostraron que HA1-4.117 (p= 0,014), HA1-4,37 (p= 0,0056), HA1-1,78 (p= 0,001), Ha1-5,99 (p=0,0002) y HA1-4,5 (p= 0,0008) inhibían significativamente el crecimiento de tumores de vejiga SW780 implantados por vía subcutánea en ratones SCID. Se realizaron análisis estadísticos usando un ensayo de t (doble cara, $\alpha=0,05$).

Descripción detallada de la invención

Resumen de las secciones

I.) Definiciones

II.) Polinucleótidos de PSCA

II.A.) Usos de Polinucleótidos de PSCA

II.A.1.) Control de Anomalías Genéticas

II.A.2.) Realizaciones Antisentido

II.A.3.) Cebadores y Pares de Cebadores

II.A.4.) Aislamiento de Moléculas de Ácido Nucleico que Codifican PSCA

II.A.5.) Moléculas de Ácido Nucleico Recombinantes y Sistemas de Vector-Hospedador

III.) Proteínas Relacionadas con PSCA

III.A.) Realizaciones de Proteínas Portadoras de Motivo

III.B.) Expresión de Proteínas Relacionadas con PSCA

III.C.) Modificaciones de Proteínas Relacionadas con PSCA

III.D.) Usos de Proteínas Relacionadas con PSCA

IV.) Anticuerpos de PSCA

V.) Respuestas Inmunitarias Celulares de PSCA

VI.) Animales Transgénicos para PSCA

VII.) Métodos para la Detección de PSCA

VIII.) Métodos para el Control del Estado de Genes Relacionados con PSCA y Sus Productos

IX.) Identificación de Moléculas Que Interaccionan con PSCA

X.) Métodos y Composiciones Terapéuticos

X.A.) Vacunas Antineoplásicas

X.B.) PSCA como una Diana para Terapia Basada en Anticuerpos

X.C.) PSCA como una Diana para Respuestas Inmunitarias Celulares

X.C.1. Vacunas de Minigenes

X.C.2. Combinaciones de Péptidos de CTL con Péptidos Auxiliares

X.C.3. Combinaciones de Péptidos de CTL con Agentes de Sensibilización de Linfocitos T

X.C.4. Composiciones de Vacunas que Comprenden DC Pulsado con Péptidos de CTL y/o HTL

X.D.) Inmunoterapia Adoptiva

X.E.) Administración de Vacunas para Fines Terapéuticos o Profilácticos

XI.) Realizaciones de Diagnóstico y Pronóstico de PSCA.

XII.) Inhibición de la Función de Proteína PSCA

XII.A.) Inhibición de PSCA Con Anticuerpos Intracelulares

XII.B.) Inhibición de PSCA con Proteínas Recombinantes

XII.C.) Inhibición de la Transcripción o Traducción de PSCA

XII.D.) Consideraciones Generales para Estrategias Terapéuticas

XIII.) Identificación, Caracterización y Uso de Moduladores de PSCA

XIV.) ARNi y uso Terapéutico de ARN de interferencia pequeño (ARNip)

XV.) KITS/Artículos de Fabricación

I.) 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 científicos 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 entendidos habitualmente para mayor claridad y/o fácil referencia, y no debería interpretarse necesariamente que la inclusión de dichas definiciones en el presente documento represente una diferencia sustancial sobre lo que se entiende en general en este campo. 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, tales como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular ampliamente utilizadas descritas en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y. Según sea apropiado, los procedimientos que implican el uso de kits y reactivos disponibles en el mercado se llevan a cabo en general de acuerdo con los 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 entiende que incluyen enfermedad de estadio C según el sistema de la Asociación Urológica Americana (AUA), enfermedad de estadio C1 - C2 según el sistema de Whitmore-Jewett, y estadio T3 - T4 y enfermedad de N+ según el sistema TNM (tumor, nódulo, 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 un 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 por encima de la base prostática. El cáncer de próstata localmente avanzado se diagnostica en la actualidad patológicamente después de prostatectomía radical si el tumor invade o penetra en la cápsula prostática, se extiende al margen quirúrgico, o invade las vesículas seminales.

Se entiende que “alterar el patrón de glucosilación nativo” para fines del presente documento significa suprimir uno o más restos de carbohidratos hallados en PSCA de secuencia nativa (bien retirando el sitio de glucosilación subyacente o bien suprimiendo la glucosilación por medios químicos y/o enzimáticos) y/o añadir uno o más sitios de glucosilación que no están presentes en el PSCA en la secuencia nativa. 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 PSCA puede unirse específicamente con un anticuerpo o linfocito T que se una específicamente con PSCA.

El término “anticuerpo” se usa en el sentido más amplio a no ser que se indique claramente otra cosa. Por lo tanto, un “anticuerpo” puede ser de origen natural o artificial tal como anticuerpos monoclonales producidos por tecnología de hibridomas 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. Como se usa en el presente documento, el término “anticuerpo” se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se una específicamente con PSCA y/o muestra la actividad biológica deseada y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo siempre que se unan específicamente con PSCA y/o muestren la actividad biológica deseada. Puede usarse cualquier anticuerpo específico en los métodos y composiciones proporcionados en el presente documento. Por lo tanto, en una realización el término “anticuerpo” abarca una molécula que comprende al menos una región variable de una molécula de inmunoglobulina de cadena ligera y al menos una región variable de una molécula de cadena pesada que en combinación forman un sitio de unión específico para el antígeno diana. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. Los anticuerpos útiles en los presentes métodos y composiciones pueden generarse en cultivo celular, en fagos, o en diversos animales, incluyendo pero sin limitación vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsteres, cobayas, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la presente invención es un anticuerpo de mamífero. Pueden usarse técnicas de fagos para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con características de avidéz o especificidad alteradas. Dichas técnicas son rutinarias y se conocen bien en este campo. En una realización, el anticuerpo se produce por medios recombinantes conocidos en este campo. Por ejemplo, puede producirse un anticuerpo recombinante transfectando una célula hospedadora con un vector que comprende una secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Pueden usarse uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una VH en la célula hospedadora. Las descripciones ejemplares de medios recombinantes de generación y producción de anticuerpos incluyen Delves, *ANTI-BODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES* (Wiley, 1997); Shephard, *et al.*, *MONOCLONAL ANTIBODIES* (Oxford University Press, 2000); Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE* (Academic Press, 1993); *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* (John Wiley & Sons, edición más reciente). Un anticuerpo de la presente invención puede modificarse por medios recombinantes para aumentar mayor eficacia del anticuerpo al mediar en la función deseada. Por lo tanto, está dentro del alcance de la invención que los anticuerpos puedan modificarse por sustituciones usando medios recombinantes. Normalmente, las sustituciones serán sustituciones conservativas. Por ejemplo, puede remplazarse al menos un

aminoácido en la región constante del anticuerpo con un resto diferente. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.624.821, Patente de Estados Unidos N° 6.194.551, Solicitud N° WO 9958572; y Angal, *et al.*, Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993). La modificación en aminoácidos incluye delecciones, adiciones, sustituciones de aminoácidos. En algunos casos, dichos cambios se realizan para reducir actividades no deseadas, por ejemplo, citotoxicidad dependiente de complemento. Frecuentemente, los anticuerpos se marcan uniendo, bien covalente o bien no covalentemente, una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conoce una amplia diversidad de marcadores y técnicas de conjugación y se indican exhaustivamente en la bibliografía tanto científica como de patentes. Estos anticuerpos pueden explorarse con respecto a unión con PSCA normal o defectuoso. Véase, por ejemplo, ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996). Pueden identificarse anticuerpos adecuados con las actividades biológicas deseadas en los siguientes ensayos *in vitro* incluyendo pero sin limitación: proliferación, migración, adhesión, crecimiento en agar blando, angiogénesis, comunicación célula-célula, apoptosis, transporte, transducción de señales y los siguientes ensayos *in vivo* tales como la inhibición del crecimiento tumoral. Los anticuerpos proporcionados en el presente documento también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden explorarse con respecto a la capacidad para unirse con el antígeno específico sin inhibir la actividad de unión a receptor o biológica del antígeno. Como anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos de unión competitiva. También pueden usarse para cuantificar el PSCA o su receptor.

Un "fragmento de anticuerpo" se define como al menos una parte de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se une con su diana, es decir, la región de unión a antígeno. En una realización abarca específicamente anticuerpos anti PSCA individuales y clones de los mismos (incluyendo anticuerpos agonistas, antagonistas y neutralizantes) y composiciones de anticuerpo anti PSCA con especificidad poliepitópica. El anticuerpo de los presentes métodos y composiciones puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede estar en forma de un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno incluyendo un fragmento Fab, fragmento F(ab')₂, una región variable de cadena ligera y similares. Pueden generarse fragmentos de moléculas intactas usando métodos bien conocidos en la técnica y que incluyen digestión enzimática y medios recombinantes.

Como se usa en el presente documento, puede usarse cualquier forma del "antígeno" para generar un anticuerpo que sea específico para PSCA. Por lo tanto, el antígeno inductor puede ser un epítipo individual, múltiples epítipos o la proteína completa sola o en combinación con uno o más agentes potenciadores de inmunogenicidad conocidos en este campo. El antígeno inductor puede ser una proteína de longitud completa aislada, una proteína de superficie celular (por ejemplo, que inmuniza con células transfectadas con al menos una parte del antígeno), o una proteína soluble (por ejemplo, que inmuniza solamente con la parte de dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede producirse en una célula modificada genéticamente. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (por ejemplo, ADNc) y codifica al menos una parte del dominio extracelular. Como se usa en el presente documento, el término "parte" se refiere al número mínimo de aminoácidos o ácidos nucleicos, según sea apropiado, para constituir un epítipo inmunogénico del antígeno de interés. Puede emplearse cualquier vector genético adecuado para transformación de las células de interés, incluyendo pero sin limitación vectores adenovirales, plásmidos y vectores no virales, tales como lípidos catiónicos. En una realización, el anticuerpo de los métodos y composiciones del presente documento se une específicamente con al menos una parte del dominio extracelular del PSCA de interés.

Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos proporcionados en el presente documento pueden conjugarse con un "agente bioactivo". Como se usa en el presente documento, la expresión "agente bioactivo" se refiere a cualquier compuesto sintético o de origen natural que se une con el antígeno y/o potencia o media en el efecto biológico deseado para potenciar toxinas destructoras de células.

En una realización, los fragmentos de unión útiles en la presente invención son fragmentos biológicamente activos. Como se usa en el presente documento, la expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse con el epítipo antigénico deseado y directa o indirectamente ejercer un efecto biológico. Los efectos directos incluyen, pero sin limitación, la modulación, estimulación y/o inhibición de una señal de crecimiento, la modulación, estimulación y/o inhibición de una señal antiapoptótica, la modulación, estimulación y/o inhibición de una señal apoptótica o necrótica, la modulación, estimulación y/o inhibición de la cascada de ADCC, y modulación, estimulación y/o inhibición de la cascada de CDC.

Los anticuerpos "bienespecíficos" también son útiles en los presentes métodos y composiciones. Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo bienespecífico" se refiere a un anticuerpo, normalmente un anticuerpo monoclonal, que tiene especificidades de unión para al menos dos epítipos antigénicos diferentes. En una realización, los epítipos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítipos son de dos antígenos diferentes. Se conocen en la técnica métodos para preparar anticuerpos bienespecíficos. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos bienespecíficos de forma recombinante usando la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Véase, por ejemplo, Milstein *et al.*, Nature 305: 537-39 (1983). Como alternativa, pueden prepararse anticuerpos bienespecíficos usando enlace químico. Véase, por ejemplo, Brennan, *et al.*, Science 229: 81 (1985). Los anticuerpos bienespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpos bienespecíficos. Véase, por ejemplo, Hollinger, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48 (1993), Gruber, *et al.*, J. Immunol. 152: 5368 (1994).

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos “quiméricos” en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o las cadenas es idéntico a u homólogo de secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que se unan específicamente con el antígeno diana y/o muestren la actividad biológica deseada (Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; y Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

La expresión “Agente Quimioterapéutico” se refiere a todos los compuestos químicos que son eficaces en la inhibición del crecimiento tumoral. Los ejemplos no limitantes de agentes quimioterapéuticos incluyen agentes alquilantes; por ejemplo, mostazas de nitrógeno, compuestos de etilenimina y alquilsulfonatos; antimetabolitos; por ejemplo, antagonistas de ácido fólico, purina o pirimidina; inhibidores mitóticos; por ejemplo, alcaloides de la vinca y derivados de podofilotoxina, antibióticos citotóxicos, compuestos que dañan o interfieren con la expresión de ADN, y antagonistas del receptor del factor de crecimiento. Además, los agentes quimioterapéuticos incluyen agentes citotóxicos (como se define en el presente documento), anticuerpos, moléculas biológicas y moléculas pequeñas.

La expresión “secuencias con codones optimizados” se refiere a secuencias de nucleótidos que se han optimizado para una especie hospedadora particular reemplazando cualquier codón que tenga una frecuencia de uso de menos de aproximadamente el 20 %. Las secuencias de nucleótidos que se han optimizado para expresión en una especie hospedadora 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, muteínas), se forma combinando un conjunto de componentes básicos químicos denominados 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 mediante dicha mezcla combinatoria de componentes básicos químicos (Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37(9): 1233-1251 (1994)).

La preparación y exploración de bibliotecas combinatorias se conoce bien por los expertos en la materia. Dichas 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 *et al.*, 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 *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinillogos (Hagihara *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con un armazón de Beta-D-Glucosa (Hirschmann *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992)), síntesis orgánicas análogas de bibliotecas de compuestos pequeños (Chen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho, *et al.*, Science 261: 1303 (1993)), y/o peptidil fosfonatos (Campbell *et al.*, J. Org. Chem. 59: 658 (1994)). Véase, en general, Gordon *et al.*, J. Med. Chem. 37: 1385 (1994), bibliotecas de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Stratagene, Corp.), bibliotecas de ácidos nucleicos peptídicos (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.539.083), bibliotecas de anticuerpos (véase, por ejemplo, Vaughn *et al.*, Nature Biotechnology 14(3): 309-314 (1996), y documento PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidratos (véase, por ejemplo, Liang *et al.*, 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 ene, 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). Se han desarrollado varios sistemas robóticos bien conocidos para químicas en fase de 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 incorporan 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 son adecuados para su uso con la presente invención. La naturaleza e implementación de modificaciones a estos dispositivos (si las hubiera) de modo que puedan manejarse como se analiza en el presente documento resultarán evidentes para expertos en la materia relevante. Además, numerosas bibliotecas combinatorias están en sí mismas disponibles en el mercado (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.).

Como se usa en el presente documento, la expresión “sustitución conservativa” se refiere a sustituciones de aminoácidos que se conocen por los expertos en la materia y pueden realizarse en generar sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en la presente materia reconocen que, en general, las sustituciones de aminoácidos individuales en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (véase, por ejemplo, Watson, *et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª Edición 1987)). Dichas sustituciones ejemplares se realizan preferentemente de acuerdo con las expuestas en las Tablas III(a-b). Por ejemplo, dichos cambios incluyen sustituir cualquier otro de estos aminoácidos hidrófobos por cualquiera de isoleucina (I), valina (V) y leucina (L); ácido glutámico (E) por ácido aspártico (D) y viceversa; asparagina (N) por glutamina (Q) y viceversa; y treonina (T) por serina (S) y viceversa. Otras sustituciones pueden considerarse también conservativas, dependiendo del ambiente del aminoácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) pueden ser frecuentemente intercambiables, como lo pueden ser alanina (A) y valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrófoba, puede intercambiarse frecuentemente con leucina e isoleucina, y en ocasiones con valina. La lisina (K) y arginina (R) son frecuentemente intercambiables en localizaciones en las que la característica significativa del resto de aminoácidos es su carga y las pK diferentes de estos dos restos de aminoácidos no son significativas. Otros cambios más pueden considerarse “conservativos” en ambientes particulares (véase, por ejemplo, Tabla III(a) en el presente documento; páginas 13-15 “Biochemistry” 2ª ED. Lubert Stryer ed (Universidad de Stanford); Henikoff *et al.*, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei *et al.*, J Biol Chem 19 may 1995; 270(20): 11882-6). También son permisibles otras sustituciones y pueden determinarse de forma empírica o de acuerdo con sustituciones conservativas conocidas.

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 destrucción de células. Se pretende que la expresión incluya isótopos radiactivos, agentes quimioterapéuticos y toxinas tales como moléculas pequeñas tóxicas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de las mismas. Los ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, pero sin limitación, auristatinas, auristatina e, auromicinas, maitansinoides, itrio, bismuto, ricina, cadena A de ricina, combrestatina, duocarmicinas, dolostatinas, doxorubicina, daunorubicina, taxol, cisplatino, cc1065, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, y glucocorticoides 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. También pueden conjugarse anticuerpos con una enzima activadora de profármaco antineoplásico capaz de convertir el profármaco en su forma activa.

Como se usa en el presente documento, el término “diacuerpos” se refiere a fragmentos de anticuerpos pequeños con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo dichos fragmentos un dominio variable de cadena pesada (V_H) conectado con un dominio variable de cadena ligera (V_L) en la misma cadena polipeptídica (V_H-V_L). Usando un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se obliga a los dominios a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión a antígeno. Se describen diacuerpos más completamente en, por ejemplo, los documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-48 (1993).

El “producto génico” se usa en el presente documento para indicar un péptido/proteína o ARNm. Por ejemplo, un “producto génico de la invención” se denomina en ocasiones en el presente documento una “secuencia de aminoácidos de cáncer”, “proteína de cáncer”, “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 1. La proteína de cáncer puede ser un fragmento o, como alternativa, ser la proteína de longitud completa codificada por los ácidos nucleicos de la Figura 1. En una realización, se usa una secuencia de aminoácidos de cáncer para determinar la identidad o similitud de secuencias. En otra realización, las secuencias son variantes alélicas de origen natural de una proteína codificada por un ácido nucleico de la Figura 1. En otra realización, las secuencias son variantes de secuencia como se describen adicionalmente en el presente documento.

Los anticuerpos “heteroconjugados” son útiles en los presentes métodos y composiciones. Como se usa en el presente documento, la expresión “anticuerpo heteroconjugado” se refiere a dos anticuerpos unidos covalentemente. Dichos anticuerpos pueden prepararse usando métodos conocidos en la química de proteínas sintéticas, incluyendo agentes de reticulación. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

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 igualmente bien ensayos de unión y ensayos de genes indicadores. Por lo tanto, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.559.410 desvela métodos de exploración de alto rendimiento para proteínas; la Patente de Estados Unidos N° 5.585.639 desvela métodos de exploración de alto rendimiento para

unión a ácido nucleico (es decir, en matrices); mientras que las Patentes de Estados Unidos N° 5.576.220 y 5.541.061 desvelan métodos de alto rendimiento para explorar con respecto a unión a ligando/anticuerpo.

Además, están disponibles en el mercado sistemas de exploración de alto rendimiento (véase, por ejemplo, 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 automatizan normalmente procedimientos completos, incluyendo todo el pipeteo de muestras y reactivos, reparto de líquidos, incubaciones temporalizadas y lecturas finales en la microplaca en un detector o detectores apropiados para el ensayo. Estos sistemas configurables proporcionan un alto rendimiento y rápido arranque así como un alto grado de flexibilidad y adaptación. Los fabricantes de dichos 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 la transcripción génica, unión a ligandos y similares.

El término "homólogo" se refiere a una molécula que muestra homología con otra molécula, por ejemplo, teniendo secuencias de restos químicos que están en la misma posición correspondiente o una similar.

En una realización, el anticuerpo proporcionado en el presente documento es un "anticuerpo humano". Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el que esencialmente las secuencias completas de las secuencias de cadena ligera y cadena pesada, incluyendo las regiones determinantes de complementariedad (CDR), son de genes humanos. En una realización, se preparan anticuerpos monoclonales humanos por la técnica de trioma, la técnica de linfocitos B humanos (véase, por ejemplo, Kozbor, *et al.*, *Immunol. Today* 4: 72 (1983), técnica de transformación de VEB (véase, por ejemplo, Cole *et al.* MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96 (1985)), o usando presentación en fagos (véase, por ejemplo, Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581 (1991)). En una realización específica, el anticuerpo humano se genera en un ratón transgénico. Se conocen en este campo técnicas para preparar dichos anticuerpos de parcial a completamente humanos y puede usarse cualquiera de dichas técnicas. De acuerdo con una realización particularmente preferida, se realizan secuencias de anticuerpo completamente humanas en un ratón transgénico modificado técnicamente para expresar genes de anticuerpos de cadena ligera y pesada humanos. Una descripción ejemplar para preparar ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se encuentra en la Solicitud N° WO 02/43478 y la Patente de Estados Unidos 6.657.103 (Abgenix) y su descendencia. Los linfocitos B de ratones transgénicos que producen el anticuerpo deseado pueden después fusionarse para realizar líneas celulares de hibridoma para producción continua del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; y 5.545.806; y Jakobovits, *Adv. Drug Del. Rev.* 31: 33-42 (1998); Green, *et al.*, *J. Exp. Med.* 188: 483-95 (1998).

El "Antígeno de Leucocito Humano" o "HLA" es una proteína del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II humana (véase, por ejemplo, Stites, *et al.*, *IMMUNOLOGY*, 8ª ED., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) así como anticuerpos humanos. Dichos anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Véase, por ejemplo, Cabilly Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Queen *et al.* (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; y ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996).

Se entiende que las expresiones "hibridan", "que hibridan", "hibrida" y similares, usadas en el contexto de polinucleótidos, se refieren a condiciones de hibridación convencionales, preferentemente tales como hibridación en formamida al 50 %/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 expresiones "aislado" o "biológicamente puro" se refieren al material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que acompañan normalmente 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 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 a o son complementarios de 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 emplean métodos físicos, mecánicos o químicos para retirar las proteínas PSCA de constituyentes celulares que normalmente están asociados con la proteína. Un experto en la materia puede emplear fácilmente métodos de

purificación convencionales para obtener una proteína PSCA aislada. Como alternativa, puede prepararse una proteína aislada por medios químicos.

Los "marcadores" adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen Patentes de Estados Unidos N° 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Además, los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden ser útiles como el componente de unión a antígeno de fluorocuerpos. Véase por ejemplo, Zeytun *et al.*, Nat. Biotechnol. 21: 1473-79 (2003).

El término "mamífero" se refiere a cualquier organismo clasificado como un mamífero, incluyendo ratones, ratas, 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 estadio D según el sistema AUA y estadio TxNxM+ según el sistema TNM. Como sucede con cáncer de próstata localmente avanzado, la cirugía no está indicada en general 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 desarrollan con el tiempo un estado refractario a andrógenos en un periodo de 12 a 18 meses desde el inicio del tratamiento. Aproximadamente la mitad de estos pacientes refractarios a andrógenos mueren en un periodo de 6 meses después del desarrollo de ese estado. El sitio más común para metástasis de cáncer de próstata es el hueso. Las metástasis de hueso de cáncer de próstata son con frecuencia osteoblásticas en lugar de osteolíticas (es decir, que dan como resultado formación de hueso neto). Se encuentran metástasis de hueso más frecuentemente en la columna vertebral, seguido del fémur, la pelvis, la caja torácica, el cráneo y el húmero. Otros sitios habituales para metástasis incluyen ganglios linfáticos, pulmón, hígado y cerebro. El cáncer de próstata metastásico se diagnostica normalmente por linfadenectomía pélvica laparoscópica o abierta, exploraciones de radionúclidos de cuerpo completo, radiografías esqueléticas y/o biopsia de lesión ósea.

La expresión "modulador" o "compuesto de ensayo" o "candidato farmacológico" o equivalentes gramaticales como se usa en el presente documento describen cualquier molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, etc., para ensayar con respecto a la capacidad para alterar directa o indirectamente el fenotipo de cáncer o la expresión de una secuencia de cáncer, por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico o proteína, o los efectos de secuencias de cáncer (por ejemplo, señalización, expresión génica, interacción proteica, etc.). En un aspecto, un modulador neutralizará el efecto de una proteína de cáncer de la invención. Por "neutralizar" se entiende que una actividad de una proteína se inhibe o bloquea, junto con el efecto consecuente de 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 ácidos nucleicos o proteínas del 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 para una identificación tisular normal. En otra realización, un modulador indujo un fenotipo de cáncer. En general, se procesa una pluralidad de mezclas de ensayo en paralelo con diferentes concentraciones de agentes para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Normalmente, una de estas concentraciones actúa como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los moduladores, candidatos farmacológicos o compuestos de ensayo abarcan numerosas clases químicas, aunque normalmente son moléculas orgánicas, preferentemente compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 Dalton. Las moléculas pequeñas preferidas son de menos de 2000, menos de 1500, menos de 1000 o menos de 500 D. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlaces de hidrógeno, y normalmente incluyen al menos grupo de amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos comprenden con frecuencia 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 cinco 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, con cisteína. En una realización, una proteína de cáncer de la invención se conjuga con un agente inmunogénico como se analiza 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 unirse entre sí o con otros aminoácidos para crear un péptido/una proteína más largo. Los péptidos moduladores pueden ser productos de digestión de proteínas de origen natural como se ha indicado anteriormente, péptidos aleatorios o péptidos aleatorios "desviados". En una realización preferida, los moduladores basados en proteínas/péptidos son anticuerpos, y fragmentos de los mismos, como se

definen en el presente documento.

Los moduladores de cáncer también pueden ser ácidos nucleicos. Los agentes moduladores de ácidos nucleicos pueden ser ácidos nucleicos de origen natural, ácidos nucleicos aleatorios o ácidos nucleicos aleatorios “desviados”. Por ejemplo, pueden usarse productos de digestión de genomas procariotas o eucariotas en un enfoque análogo al indicado anteriormente para proteínas.

La expresión “anticuerpo monoclonal”, como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones de origen natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único epítipo antigénico. Por el contrario, las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) normalmente incluyen una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) epítopos diferentes. En una realización, el anticuerpo policlonal contiene una pluralidad de anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades, afinidades o avideces dentro de un único antígeno que contiene múltiples epítopos antigénicos. El modificador “monoclonal” indica como el carácter del anticuerpo que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que requiera producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales para usar de acuerdo con la presente invención pueden realizarse por el método de hibridoma descrito en primer lugar en Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975), o pueden realizarse por métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 4.816.567). Los “anticuerpos monoclonales” también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por ejemplo. Estos anticuerpos monoclonales se unirán habitualmente con al menos una Kd de aproximadamente 1 μ M, más habitualmente al menos aproximadamente 300 nM, normalmente al menos aproximadamente 30 nM, preferentemente al menos aproximadamente 10 nM, más preferentemente al menos aproximadamente 3 nM o mejor, habitualmente determinado por ELISA.

Un “motivo”, como en 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 se asocie 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 celular. Un motivo puede ser contiguo o capaz de alinearse con ciertas posiciones que están en general correlacionadas con una cierta función o propiedad. En el contexto de motivos de HLA, “motivo” se refiere al patrón de restos en un péptido de diferente longitud, 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 normalmente diferentes para cada proteína codificada por cada alelo de HLA humano y difieren en el patrón de los restos de anclaje primarios y secundarios. Se exponen motivos de aparición frecuente en la Tabla V.

Un “excipiente farmacéutico” comprende un material tal como un adyuvante, un vehículo, agentes tamponantes y de ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares.

“Farmacéuticamente aceptable” se refiere a una composición no tóxica, inerte 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 se entiende que incluye formas mono y bicatenarias de ADN y/o ARN. En la técnica, este término se usa con frecuencia indistintamente 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 1, también puede ser uracilo (U); esta definición pertenece a las diferencias entre las estructuras químicas de ADN y ARN, en particular la observación de que una de las cuatro bases principales en 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 aminoácidos. En la técnica, este término se usa con frecuencia indistintamente con “péptido” o “proteína”.

Un “resto de anclaje primario” de 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 dentro de un péptido de longitud definida definen en general un “motivo” para un péptido inmunogénico. Se entiende que estos restos se ajustan en contacto estrecho con el surco de unión a péptido de una molécula de HLA, con sus cadenas laterales internadas 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 o 12 restos de acuerdo con la invención. Como alternativa, en otra

realización, los restos de anclaje primarios de un péptido se unen con una molécula de HLA de clase II y se espacian entre sí, en lugar de con el extremo terminal de un péptido, en el que el péptido es generalmente de al menos 9 aminoácidos de longitud. Las posiciones de anclaje primarias para cada motivo y supermotivo se exponen en la Tabla IV (a). Por ejemplo, pueden crearse péptidos análogos alterando la presencia o ausencia de restos particulares en las posiciones de anclaje primarias y/o secundarias mostradas en la Tabla IV. Dichos análogos se usan para modular la afinidad de unión y/o la cobertura de 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 en la Tabla IV(I)).

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 aminoácido o nucleótido en cualquier posición. El proceso sintético puede diseñarse para generar proteínas o ácidos nucleicos aleatorios, para permitir la formación de todas o la mayoría de las posibles combinaciones a lo largo de la longitud de la secuencia, formando de este modo una biblioteca de agentes proteicos bioactivos candidatos aleatorios.

En una realización, una biblioteca es "completamente aleatoria", sin preferencias de secuencia o constantes en ninguna posición. En otra realización, la biblioteca es una biblioteca "aleatoria desviada". Es decir, algunas posiciones dentro de la secuencia se mantienen constantes, o se seleccionan de un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, los restos de nucleótidos o aminoácidos se seleccionan aleatoriamente dentro de una clase definida, por ejemplo, de aminoácidos hidrófobos, restos hidrófilos, restos con desviación estérica (bien pequeños o bien grandes), hacia la creación de dominios de unión de ácido nucleico, la creación de cisteínas, para reticulación, prolina para dominios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas o histidinas para sitios de fosforilación, etc., o a purinas, etc.

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

Como se usa en el presente documento, la expresión "Fv monocatenario" o "scFv" o anticuerpo "monocatenario" se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios V_H y V_L del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general el polipéptido de Fv comprende además un enlazador polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para unión a antígeno. Para una revisión de sFv, véase Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg y Moore eds. Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

Los ejemplos no limitantes de "moléculas pequeñas" incluyen compuestos que se unen con o interaccionan con PSCA, ligandos incluyendo hormonas, neuropéptidos, quimiocinas, odorizantes, fosfolípidos y equivalentes funcionales de los mismos que se unen con e inhiben preferentemente la función de proteína PSCA. Dichas moléculas pequeñas no limitantes tienen preferentemente 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 con, proteína PSCA; no se encuentran en rutas metabólicas de origen natural; y/o son más solubles en soluciones acuosas que no acuosas.

Como se usa en el presente documento, el término "específico" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo con el epítipo de antígeno diana. Los anticuerpos pueden ensayarse con respecto a especificidad de unión comparando la unión con antígeno apropiado con la unión con antígeno irrelevante o mezcla de antígenos en un conjunto de condiciones dado. Si el anticuerpo se une con el antígeno apropiado al menos 2, 5, 7 y preferentemente 10 veces más que el antígeno irrelevante o la mezcla de antígenos entonces se considera que es específico. En una realización, un anticuerpo específico es uno que solamente se une con el antígeno de PSCA, pero no se une con el antígeno irrelevante. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se une con el antígeno de PSCA humano pero no se une con un antígeno de PSCA no humano con 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o mayor homología de aminoácidos con el antígeno de PSCA. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se une con el antígeno de PSCA humano y se une con el antígeno de PSCA murino, pero con un mayor grado de unión con el antígeno humano. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se une con el antígeno de PSCA humano y se une con el antígeno de PSCA de primate, pero con un mayor grado de unión con el antígeno humano. En otra realización, el anticuerpo específico se une con el antígeno de PSCA humano y cualquier antígeno de PSCA no humano, pero con un mayor grado de unión que el antígeno humano o cualquier combinación de los mismos.

La "rigurosidad" de las reacciones de hibridación puede determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia, y en general es un cálculo empírico que depende de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado y la concentración salina. En general, sondas más largas requieren mayores temperaturas para hibridación apropiada,

mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas menores. La hibridación depende en general de la capacidad de las secuencias de ácido nucleico desnaturalizadas para volver a hibridarse cuando estén presentes cadenas complementarias en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. Cuanto mayor sea el grado de homología deseado entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor será la temperatura relativa que puede usarse.

5 Como resultado, se deduce que temperaturas relativamente mayores tenderían a hacer las condiciones de reacción más rigurosas, mientras que temperaturas menores, menos. Para detalles adicionales y una explicación de la rigurosidad de reacciones de hibridación, véase Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

10 Las “condiciones rigurosas” o “condiciones de alta rigurosidad”, como se define en el presente documento, se identifican, pero sin limitación, por las que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura para lavar, 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 desnaturalizante, tal como formamida, por ejemplo, formamida al 50 % (v/v) con albúmina de suero bovino 0,1 %/Ficol1 0,1 %/polivinilpirrolidona 0,1 %/tampón de fosfato sódico 50 mM a pH 6,5 con cloruro
15 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 sonicado (50 µg/ml), SDS 0,1 % y dextrán sulfato 10 % a 42 °C, con lavados a 42 °C en SSC 0,2 x (cloruro sódico/citrato sódico) y formamida al 50 % a 55 °C, seguido de un lavado de alta rigurosidad que consiste en SSC 0,1 x que contiene EDTA a 55 °C. Las “condiciones moderadamente rigurosas” se describen, pero sin
20 limitación, por las de Sambrook *et al.*, *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 65 °C en una solución que comprende: albúmina de suero bovino 1 %, fosfato sódico 0,5 M pH 7,5, EDTA 1,25 mM y SDS 7 % SSC 5 x (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), seguido de
25 lavado de los filtros en SSC 2 x/SDS 1 % a 50 °C y SSC 0,2 X/SDS 0,1 % a 50 °C. El experto en la materia reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc. según sea necesario para ajustar factores tales como la longitud de la sonda y similares.

30 Un “supermotivo” de HLA es una especificidad de unión a péptido compartida por las moléculas de HLA codificadas por dos o más alelos de HLA. Se exponen en la Tabla IV (f) frecuencias fenotípicas generales de los supertipos de HLA en diferentes poblaciones étnicas. Los constituyentes no limitantes de diversos supertipos son los siguientes:

A2: A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A* 0205, A*0206, A*6802, A*6901, A*0207
A3: A3, A11, A31, A*3301, A*6801, A*0301, A*1101, A*3101
35 B7: B7, B*3501-03, B*51, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*6701, B*7801, B*0702, B*5101, B*5602
B44: B*3701, B*4402, B*4403, B*60 (B*4001), B61 (B*4006)
A1: A*0102, A*2604, A*3601, A*4301, A*8001
A24: A*24, A*30, A*2403, A*2404, A*3002, A*3003
40 B27: B*1401-02, B*1503, B*1509, B*1510, B*1518, B*3801-02, B*3901, B*3902, B*3903-04, B*4801-02, B*7301, B*2701-08
B58: B*1516, B*1517, B*5701, B*5702, B58
B62: B*4601, B52, B*1501 (B62), B*1502 (B75), B*1513 (B77)

45 La cobertura de población calculada proporcionada por diferentes combinaciones de supertipo de HLA diferentes se expone en la Tabla IV(g).

50 Como se usa en el presente documento “tratar” o “terapéutico” y términos gramaticalmente relacionados, se refieren a cualquier mejora de cualquier consecuencia de la enfermedad, tales como supervivencia prolongada, menor morbilidad y/o reducción de efectos laterales que son productos secundarios de una modalidad terapéutica alternativa; como se apreciará fácilmente en la técnica, la erradicación completa de una enfermedad es un resultado preferido aunque no un requisito para un acto de tratamiento.

55 Un “animal transgénico” (por ejemplo, un ratón o una rata) es un animal que tiene células que contienen un transgén, habiéndose introducido dicho transgén en el animal o un ancestro del animal en un estadio prenatal, por ejemplo, embrionario. Un “transgén” es un ADN que se integra en el genoma de una célula a partir de la que se desarrolla un animal transgénico.

60 Como se usa en el presente documento, una “vacuna” de HLA o respuesta inmunitaria celular es una composición que contiene o codifica uno o más péptidos de la invención. Existen numerosas realizaciones de dichas vacunas, tales como un cóctel de uno o más péptidos individuales; o uno o más péptidos de la invención comprendidos por un péptido poliepitópico; o ácidos nucleicos que codifican dichos péptidos o polipéptidos individuales, por ejemplo, un minigén que codifica un péptido poliepitópico. Los “uno o más péptidos” pueden incluir cualquier número entero 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,
65 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 o 150 o más péptidos de la invención. Los péptidos o polipéptidos pueden opcionalmente modificarse, tal como por lipidación, adición de secuencias de dirección u otras.

Los péptidos de HLA de clase I de la invención pueden mezclarse con, o unirse a, 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 por péptidos, por ejemplo, células dendríticas.

5 El término “variante” se refiere a una molécula que muestra una variación con respecto a un tipo o una norma descritos, tal como una proteína que tiene uno o más restos de aminoácidos diferentes en la posición o las posiciones correspondientes de una proteína específicamente descrita (por ejemplo la proteína PSCA mostrada en la Figura 1. Un análogo es un ejemplo de una proteína variante. Las isoformas de corte y empalme y polimorfismos de un único nucleótido (SNP) son ejemplos adicionales de variantes.

10 Las “proteínas relacionadas con PSCA” como se desvela en el presente documento 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 métodos destacados en el presente documento o fácilmente disponibles en la técnica. También se incluyen
15 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. Dichas proteínas PSCA se denominan colectivamente proteínas relacionadas con PSCA, proteínas de la invención o PSCA. La expresión “proteína relacionada con PSCA” se refiere a un fragmento polipeptídico o una secuencia proteica 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,
20 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, 330, 335, 339 o más aminoácidos.

II.) Polinucleótidos de PSCA

25 Se desvelan en el presente documento polinucleótidos correspondientes a o complementarios de todo o una parte de un gen de PSCA, ARNm y/o secuencia codificante, preferentemente en forma aislada, incluyendo polinucleótidos que codifican una proteína relacionada con PSCA y fragmentos de la misma, ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN y moléculas relacionadas, polinucleótidos u oligonucleótidos complementarios de un gen de PSCA o secuencia de ARNm o una parte de la misma, y polinucleótidos u oligonucleótidos que hibridan con un gen de PSCA, ARNm o con
30 un polinucleótido que codifica PSCA (colectivamente, “polinucleótidos de PSCA”). En todos los casos cuando se haga referencia a esta sección, T también puede ser U en la Figura 1.

Los polinucleótidos de PSCA incluyen: un polinucleótido de PSCA que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1, la secuencia de nucleótidos de PSCA como se muestra en la Figura 1 en la que T es U; al menos 10 nucleótidos
35 contiguos de un polinucleótido que tiene la secuencia como se muestra en la Figura 1; o al menos 10 nucleótidos contiguos de un polinucleótido que tiene la secuencia como se muestra en la Figura 1 en la que T es U.

Los polinucleótidos que codifican partes relativamente largas de una proteína de PSCA también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican de aproximadamente el aminoácido 1 (o 20,
40 30 o 40, etc.) a aproximadamente el aminoácido 20, (o 30, 40 o 50, etc.) de la proteína PSCA “o variante” mostrada en la Figura 1 o Figura 3 pueden generarse por diversas técnicas bien conocidas en este campo. Estos fragmentos polinucleotídicos pueden incluir cualquier parte de la secuencia de PSCA como se muestra en la Figura 1.

II.A.) Usos de Polinucleótidos de PSCA

45 II.A.1. Control de Anomalías Genéticas

Los polinucleótidos de los párrafos precedentes tienen varios usos específicos diferentes. El gen de PSCA humano se mapea en la localización cromosómica expuesta en el Ejemplo titulado “Mapeo Cromosómico de PSCA”. Por
50 ejemplo, debido a que el gen de PSCA se mapea en este cromosoma, se usan polinucleótidos que codifican diferentes regiones de las proteínas PSCA para caracterizar anomalías citogenéticas de esta localización cromosómica, tales como anomalías que se ha identificado que están asociadas con diversos cánceres. En ciertos genes, se ha identificado diversas anomalías cromosómicas incluyendo reordenamientos, como anomalías citogenéticas frecuentes en varios cánceres diferentes (véase por ejemplo Krajinovic *et al.*, *Mutat. Res.* 382(3-4): 81-83 (1998); Johansson *et al.*, *Blood* 86(10): 3905-3914 (1995) y Finger *et al.*, *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 delimitar, con mayor precisión de lo que era posible previamente, anomalías
55 citogenéticas en la región cromosómica que codifica PSCA que pueden contribuir al fenotipo maligno. En este contexto, estos polinucleótidos satisfacen una necesidad de la técnica de expandir la sensibilidad de exploración cromosómica para identificar anomalías cromosómicas más sutiles y menos comunes (véase por ejemplo Evans *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol* 171(4): 1055-1057 (1994)).

Además, como se ha mostrado que PSCA se expresa altamente en próstata y otros cánceres, se usan polinucleótidos de PSCA en métodos que evalúan el estado de productos génicos de PSCA en tejidos normales
65 frente a cáncer. Normalmente, se usan polinucleótidos que codifican regiones específicas de las proteínas PSCA para evaluar la presencia de perturbaciones (tales como deleciones, inserciones, mutaciones puntuales o

alteraciones que dan como resultado la 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 ejemplo, Marrogi *et al.*, 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.

II.A.2. Realizaciones Antisentido

También se desvelan en el presente documento ADN genómico, ADNc, ribozimas y moléculas antisentido, así como moléculas de ácido nucleico basadas en una cadena principal alternativa, o que incluye bases alternativas, bien derivadas de fuentes naturales o bien sintetizadas, e incluyen moléculas capaces de inhibir la expresión de ARN o proteína de PSCA. Por ejemplo, las moléculas antisentido pueden ser ARN u otras moléculas, incluyendo ácidos nucleicos peptídicos (PNA) o moléculas no de ácido nucleico tales como derivados de fosforotioato que se unen específicamente con ADN o ARN de una manera dependiente de pares de bases. Un experto en la materia puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácido nucleico usando los polinucleótidos de PSCA y secuencias polinucleotídicas desveladas en el presente documento.

La tecnología antisentido implica la administración de oligonucleótidos exógenos que se unen con un polinucleótido diana localizado dentro de las células. El término "antisentido" se refiere al hecho de que dichos oligonucleótidos son complementarios de sus dianas intracelulares, por ejemplo, PSCA. Véase por ejemplo, Jack Cohen, *Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, 1989; y *Synthesis* 1: 1-5 (1988). Los oligonucleótidos antisentido de PSCA de la presente invención incluyen derivados tales como S-oligonucleótidos (derivados de fosforotioato o S-oligos, véase, Jack Cohen, mencionado anteriormente), que muestran acción inhibitoria de crecimiento celular de cáncer potenciada. Los S-oligos (nucleósido fosforotioatos) son análogos isoelectrónicos de un oligonucleótido (O-oligo) en el que se reemplaza un átomo de oxígeno no enlazador del grupo fosfato por un átomo de azufre. Los S-oligos pueden prepararse por tratamiento de los O-oligos correspondientes con 3H-1,2-benzoditioil-3-ona-1,1-dióxido, que es un reactivo de transferencia de azufre. Véase, por ejemplo, Iyer, R. P. *et al.*, J. Org. Chem. 55: 4693-4698 (1990); y Iyer, R. P. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 112: 1253-1254 (1990). Los oligonucleótidos antisentido de PSCA adicionales incluyen oligonucleótidos antisentido morfolino conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Partridge *et al.*, 1996, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 6: 169-175).

Los oligonucleótidos antisentido de PSCA desvelados en el presente documento normalmente pueden ser ARN o ADN que es complementario de e hibrida de forma estable con los primeros 100 codones 5' o los últimos 100 codones 3' de una secuencia genómica de PSCA o el ARNm correspondiente. No se requiere complementariedad absoluta, aunque se prefieren altos grados de complementariedad. El uso de un oligonucleótido complementario de esta región permite la hibridación selectiva con ARNm de PSCA y no con ARNm que especifique otras subunidades reguladoras de proteína quinasa. Los oligonucleótidos antisentido de PSCA desvelados en el presente documento pueden ser fragmentos de 15 a 30 unidades de la molécula de ADN antisentido que tiene una secuencia que hibrida con ARNm de PSCA. Opcionalmente, el oligonucleótido antisentido de PSCA es un oligonucleótido de 30 unidades que es complementario de una región en los primeros 10 codones 5' o los últimos 10 codones 3' de PSCA. Como alternativa, las moléculas antisentido se modifican para emplear ribozimas en la inhibición de la expresión de PSCA, véase, por ejemplo, L. A. Couture y D. T. Stinchcomb; *Trends Genet* 12: 510-515 (1996).

II.A.3. Cebadores y Pares de Cebadores

Otros nucleótidos desvelados en el presente documento incluyen cebadores y pares de cebadores que permiten la amplificación específica de polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que hibridan específicamente o selectivamente con moléculas de ácido nucleico de la invención o cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden marcarse con un marcador detectable, tales como, por ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminiscente, un compuesto quimioluminiscente, quelante metálico o enzima. Dichas sondas y cebadores se usan para detectar la presencia de un polinucleótido de PSCA en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa una proteína PSCA.

Los ejemplos de dichas sondas incluyen polipéptidos que comprenden toda o parte de la secuencia de ADNc de PSCA humana mostrada en la Figura 1. También se describen ejemplos de pares de cebadores capaces de amplificar específicamente ARNm de PSCA en los ejemplos. Como se entenderá por el experto en la materia, pueden prepararse una gran cantidad de cebadores y sondas diferentes basándose en las secuencias proporcionadas en el presente documento y usarse eficazmente para amplificar y/o detectar un ARNm de PSCA.

Los polinucleótidos de PSCA desvelados en el presente documento son útiles para diversos fines, incluyendo pero sin limitación su uso como sondas y cebadores para la amplificación y/o detección del gen o los genes de PSCA, ARNm o fragmentos de los mismos; como reactivos para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer de próstata y otros cánceres; como secuencias codificantes capaces de dirigir la expresión de polipéptidos de PSCA; como herramientas para modular o inhibir la expresión del gen o los genes de PSCA y/o traducción del transcrito o los transcritos de PSCA; y como agentes terapéuticos.

Se desvela en el presente documento el uso de cualquier sonda como se describe en el presente documento para identificar y aislar un PSCA o secuencia de ácido nucleico relacionada con PSCA de una fuente de origen natural, tal como seres humanos u otros mamíferos, así como la secuencia de ácido nucleico aislada en sí misma, que comprendería todas o la mayoría de las secuencias halladas en la sonda usada.

5

II.A.4. 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 un producto o productos génicos de PSCA, así como el aislamiento de polinucleótidos que codifican homólogos de productos génicos de PSCA, isoformas cortadas y empalmadas de forma alternativa, 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 métodos de clonación molecular que pueden emplearse para aislar ADNc de longitud completa que codifican un gen de PSCA (véase, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Nueva York, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel *et al.*, Eds., Wiley and Sons, 1995). Por ejemplo, pueden emplearse convenientemente 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 1) o una parte del mismo y usarse como una sonda para recuperar ADNc solapantes y de longitud completa que corresponde a un gen de PSCA. Un gen de PSCA en sí mismo puede aislarse explorando bibliotecas de ADN genómico, bibliotecas de cromosomas artificiales bacterianos (BAC), bibliotecas de cromosomas artificiales de levadura (YAC) y similares, con sondas o cebadores de ADN de PSCA.

II.A.5. Moléculas de Ácido Nucleico Recombinante y Sistemas de Hospedador-Vector

Se desvelan en el presente documento moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido de PSCA, un fragmento, análogo u homólogo del mismo, incluyendo pero sin limitación fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YAC, BAC, así como diversos vectores virales y no virales bien conocidos en la técnica, y células transformadas o transfectadas con dichas moléculas de ADN o ARN recombinantes. Se conocen bien métodos para generar dichas moléculas (véase, por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, mencionado anteriormente).

También se desvela en el presente documento un sistema de hospedador-vector que comprende una molécula de ADN recombinante que contiene un polinucleótido de PSCA, fragmento, análogo u homólogo del mismo dentro de una célula hospedadora procariota o eucariota adecuada. Los ejemplos de células hospedadoras eucariotas adecuadas incluyen una célula de levadura, una célula vegetal, o una célula animal, tal como una célula de mamífero o una célula de insecto (por ejemplo, una célula que puede infectarse por baculovirus tal como una célula Sf9 o HighFive). Los ejemplos de células de mamífero adecuadas incluyen diversas líneas celulares de cáncer de próstata tales como DU145 y TsuPr1, otras líneas celulares de cáncer de próstata transfectables o transducibles, células primarias (PrEC), así como varias células de mamífero usadas habitualmente para la expresión de proteínas recombinantes (por ejemplo, células COS, CHO, 293, 293T). Más particularmente, un polinucleótido que comprende la secuencia codificante de PSCA o un fragmento, análogo u homólogo del mismo puede usarse para generar proteínas PSCA o fragmentos de las mismas usando cualquier variedad de sistemas de hospedador-vector usados habitualmente y conocidos ampliamente en la técnica.

Están disponibles una amplia serie de sistemas de hospedador-vector adecuados para la expresión de proteínas PSCA o fragmentos de las mismas, véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, mencionado anteriormente; *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, mencionado anteriormente. Los vectores preferidos para expresión de mamíferos incluyen pero sin limitación pcDNA 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) y el vector retroviral pSRhtkneo (Muller *et al.*, 1991, MCB 11: 1785). Usando estos vectores de expresión, puede expresarse PSCA en varias líneas celulares de cáncer de próstata y no de próstata, incluyendo por ejemplo 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 y TsuPr1. Los sistemas de hospedador-vector son útiles para la producción de una proteína PSCA o fragmento de la misma. Dichos sistemas de hospedador-vector pueden emplearse para estudiar las propiedades funcionales de PSCA y mutaciones o análogos de PSCA.

Puede producirse una proteína PSCA humana recombinante o un análogo u homólogo o fragmento de la misma por células de mamífero transfectadas con una construcción que codifica un nucleótido relacionado con PSCA. Por ejemplo, pueden transfectarse células 293T con un plásmido de expresión que codifica PSCA o un fragmento, análogo u homólogo del mismo, se expresa una proteína relacionada con PSCA en las células 293T, y la proteína PSCA recombinante se aísla usando métodos de purificación convencionales (por ejemplo, purificación de afinidad usando anticuerpos anti PSCA). Como alternativa, se subclona una secuencia codificante de PSCA en el vector retroviral pSR α MSVtkneo y se usa para infectar diversas líneas celulares de mamífero, tales como NIH 3T3, TsuPr1, 293 y rat-1 para establecer líneas celulares que expresen PSCA. También pueden emplearse diversos otros sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. Pueden usarse construcciones de expresión que codifican un péptido líder unido en fase con una secuencia codificante de PSCA para la generación de una forma secretada de proteína PSCA recombinante.

65

Como se analiza en el presente documento, la redundancia del código genético permite variación en secuencias génicas de PSCA. En particular, se conoce en la técnica que especies hospedadoras específicas tienen con frecuencia preferencias codónicas específicas, y por lo tanto se puede adaptar la secuencia desvelada según se prefiera para un hospedador deseado. Por ejemplo, secuencias codónicas análogas preferidas normalmente tienen codones poco comunes (es decir, codones que tienen una frecuencia de uso de menos de aproximadamente el 20 % en secuencias conocidas del hospedador deseado) reemplazados con codones de mayor frecuencia. Las preferencias codónicas para una especie específica se calculan, por ejemplo, utilizando tablas de uso codónico disponibles en INTERNET tal como en la dirección web URL dna.afrcr.gov.jp/~nakamura/codon.html.

Se sabe que modificaciones de secuencia adicionales potencian la expresión de proteínas en un hospedador celular. Estas incluyen eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación espurias, señales de sitio de corte y empalme de intrones/exones, repeticiones de tipo transposón y/u otras de dichas secuencias bien caracterizadas que son deletéreas para expresión génica. El contenido de GC de la secuencia se ajusta a niveles promedios para un hospedador celular dado, como se calcula por referencia a genes conocidos expresados en la célula hospedadora. Cuando sea posible, la secuencia se modifica para evitar estructuras de ARNm secundarias en horquilla predichas. Otras modificaciones útiles incluyen la adición de una secuencia consenso de inicio de la traducción al comienzo de la fase abierta de lectura, como se describe en Kozak, *Mol. Cell Biol.*, 9: 5073-5080 (1989). Los expertos en la materia entienden que la regla general de que los ribosomas eucariotas inician la traducción exclusivamente en el codón AUG 5' próximo se anula solamente en condiciones muy poco habituales (véase, por ejemplo, Kozak *PNAS* 92(7): 2662-2666, (1995) y Kozak *NAR* 15(20): 8125-8148 (1987)).

III.) Proteínas relacionadas con PSCA

También se desvelan en el presente documento proteínas relacionadas con PSCA. Los ejemplos específicos de proteínas PSCA comprenden un polipéptido que tiene toda o una parte de la secuencia de aminoácidos de PSCA humana como se muestra en la Figura 1, preferentemente Figura 1A. Como alternativa, los ejemplos de proteínas PSCA comprenden polipéptidos variantes, homólogos o análogos que tiene alteraciones en la secuencia de aminoácidos de PSCA mostrados en la Figura 1.

Un polipéptido de PSCA puede incluir: un polipéptido de PSCA que tenga una secuencia mostrada en la Figura 1, una secuencia peptídica de un PSCA como se muestra en la Figura 1 en la que T es U; al menos 10 nucleótidos contiguos de un polipéptido que tienen la secuencia como se muestra en la Figura 1; o al menos 10 péptidos contiguos de un polipéptido que tiene la secuencia mostrada en la Figura 1 en la que T es U.

Se proporcionan abreviaturas de aminoácidos en la Tabla II. Pueden realizarse con frecuencia sustituciones de aminoácidos conservativas en una proteína sin alterar la conformación o la función de la proteína. Las proteínas pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 sustituciones conservativas.

Las divulgaciones en el presente documento incluyen una amplia diversidad de variantes o análogos aceptados en la técnica de proteínas PSCA tales como polipéptidos que tienen inserciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos. Pueden realizarse variantes de PSCA usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida, exploración de alanina y mutagénesis por PCR. Puede realizarse mutagénesis dirigida (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10: 6487 (1987)), mutagénesis de casete (Wells *et al.*, *Gene*, 34: 315 (1985)), mutagénesis de selección de restricción (Wells *et al.*, *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317: 415 (1986)) u otras técnicas conocidas en el ADN clonado para producir el ADN variante de PSCA.

También puede emplearse análisis de aminoácidos de exploración para identificar uno o más aminoácidos a lo largo de una secuencia contigua que está implicada en una actividad biológica específica tal como una interacción proteína-proteína. De entre los aminoácidos de exploración preferidos están los aminoácidos neutros, relativamente pequeños. Dichos aminoácidos incluyen alanina, glicina, serina y cisteína. La alanina es normalmente un aminoácido de exploración preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta y es menos probable que altere la conformación de cadena principal de la variante. La alanina también se prefiere normalmente porque es el aminoácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto internadas como expuestas (Creighton, *The Proteins*, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1976)). Si la sustitución de alanina no produce cantidades suficientes de variante, puede usarse un aminoácido isostérico.

Como se define en el presente documento, las variantes, los análogos o los homólogos de PSCA tiene el atributo distintivo de tener al menos un epítipo que es "reactivo de forma cruzada" con una proteína PSCA que tiene una secuencia de aminoácidos de la Figura 1. Como se usa en esta frase, "reactivo de forma cruzada" significa que un anticuerpo o linfocito T que se une específicamente con una variante de PSCA también se une específicamente con una proteína PSCA que tiene una secuencia de aminoácidos expuesta en la Figura 1. Un polipéptido deja de ser una variante de una proteína mostrada en la Figura 1, cuando no contiene ya ningún epítipo que pueda reconocerse por un anticuerpo o linfocito T que se une específicamente con la proteína PSCA de partida. Los expertos en la materia entienden que los anticuerpos que reconocen proteínas se unen con epítopos de diversos tamaños, y un agrupamiento del orden de aproximadamente cuatro o cinco aminoácidos, contiguos o no, se considera un número

típico de aminoácidos en un epítipo mínimo. Véase, por ejemplo, Nair *et al.*, J. Immunol 2000 165(12): 6949-6955; Hebbes *et al.*, Mol Immunol (1989) 26(9): 865-73; Schwartz *et al.*, J Immunol (1985) 135(4): 2598-608.

Otras clases de variantes de proteína relacionada con PSCA comparten 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % o más similitud con una secuencia de aminoácidos de la Figura 1, o un fragmento de la misma. Otra clase específica de variantes o análogos de proteína PSCA comprende uno o más de los motivos biológicos de PSCA descritos en el presente documento o conocidos en la actualidad en la técnica. Por lo tanto, las divulgaciones del presente documento abarcan análogos de fragmentos de PSCA (ácido nucleico o aminoácido) que tienen propiedades funcionales alteradas (por ejemplo, inmunogénicas) en relación con el fragmento de partida. Debe apreciarse que los motivos actuales o que pasen a formar parte de la técnica deben aplicarse a las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos de la Figura 1.

Como se analiza en el presente documento, los polipéptidos pueden tener menos de la secuencia de aminoácidos completa de una proteína PSCA mostrada en la Figura 1. Por ejemplo, los péptidos/proteínas pueden tener cualquiera de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos contiguos de una proteína PSCA mostrada en la Figura 1.

Se generan proteínas relacionadas con PSCA usando tecnología de síntesis peptídica convencional o usando métodos de escisión química bien conocidos en la técnica. Como alternativa, pueden usarse métodos recombinantes para generar moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína relacionada con PSCA. En un ejemplo, las moléculas de ácido nucleico proporcionan un medio para generar fragmentos definidos de una proteína PSCA (o variantes, homólogos o análogos de la misma).

III.A.) Realizaciones de Proteína portadora de Motivos

Divulgaciones ilustrativas adicionales del presente documento incluyen polipéptidos de PSCA que comprenden los restos de aminoácidos de uno o más de los motivos biológicos contenidos dentro de una secuencia polipeptídica de PSCA expuesta en la Figura 1. Se conocen en la técnica diversos motivos, y puede evaluarse una proteína con respecto a la presencia de dichos motivos por varios sitios de Internet disponibles públicamente (véase, por ejemplo, direcciones URL: pfam.wustl.edu/; searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html; psort.ims.u-tokyo.ac.jp/; cbs.dtu.dk/; ebi.ac.uk/interpro/scan.html; expasy.ch/tools/scnpsitl.html; Epimatrix™ y Epimer™, Universidad Brown, brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; y BIMAS, bimas.dcrn.nih.gov/).

Se exponen e identifican subsecuencias portadoras de motivos de todas las proteínas variantes de PSCA en las Tablas V-XVIII y XXII-LI.

La Tabla IV(h) expone varios motivos de aparición frecuente basándose en búsquedas de pfam (véase dirección URL pfam.wustl.edu/). Las columnas de la Tabla IV(h) enumeran (1) la abreviatura del nombre del motivo, (2) el porcentaje de identidad hallado entre los diferentes miembros de la familia del motivo, (3) nombre o descripción del motivo y (4) función más común; se incluye información de localización si el motivo es relevante para la localización.

Los polipéptidos que comprenden uno o más de los motivos de PSCA analizados anteriormente son útiles para dilucidar las características específicas de un fenotipo maligno a la vista de la observación de que los motivos de PSCA analizados anteriormente se asocian con desregulación del crecimiento y porque PSCA se sobreexpresa en ciertos cánceres (véase, por ejemplo, Tabla I). Caseína quinasa II, AMPc y proteína quinasa dependiente de AMPc, y Proteína Quinasa C, por ejemplo, son enzimas que se sabe que están asociadas con el desarrollo del fenotipo maligno (véase por ejemplo Chen *et al.*, Lab Invest., 78(2): 165-174 (1998); Gaiddon *et al.*, Endocrinology 136(10): 4331-4338 (1995); Hall *et al.*, Nucleic Acids Research 24(6): 1119-1126 (1996); Peterziel *et al.*, Oncogene 18(46): 6322-6329 (1999) y O'Brian, Oncol. Rep. 5(2): 305-309 (1998)). Además, tanto la glucosilación como la miristoilación son modificaciones de proteínas también asociadas con cáncer y progresión del cáncer (véase por ejemplo Dennis *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1473(1): 21-34 (1999); Raju *et al.*, Exp. Cell Res. 235(1): 145-154 (1997)). La amidación es otra modificación de proteínas también asociada con el cáncer y la progresión del cáncer (véase por ejemplo Treston *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (13): 169-175 (1992)).

En otra divulgación, las proteínas pueden comprender uno o más de los epítipos inmunorreactivos identificados de acuerdo con métodos aceptados en la técnica, tales como los péptidos expuestos en las Tablas V-XVIII y XXII-LI. Los epítipos de CTL pueden determinarse usando algoritmos específicos para identificar péptidos dentro de una proteína PSCA que sean capaces de unirse óptimamente con alelos de HLA específicos (por ejemplo, Tabla IV; Epimatrix™ y Epimer™, Universidad Brown, URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; y BIMAS, URL bimas.dcrn.nih.gov/). Además, se conocen bien en la técnica procesos para identificar péptidos que tienen suficiente afinidad de unión por moléculas de HLA y que se correlacionan con ser epítipos inmunogénicos, y se llevan a cabo sin experimentación indebida. Además, se conocen bien en la técnica procesos para identificar péptidos que son epítipos inmunogénicos, y se llevan a cabo sin experimentación indebida bien *in vitro* o bien *in vivo*.

- También se conocen en la técnica principios para crear análogos de dichos epítomos para modular la inmunogenicidad. Por ejemplo, se comienza con un epítomo que porta un motivo de CTL o HTL (véase, por ejemplo, los motivos/supermotivos de HLA de Clase I y HLA de Clase II de la Tabla IV). El epítomo se hace análogo sustituyendo un aminoácido en una de las posiciones específicas, y remplazándolo con otro aminoácido específico para esa posición. Por ejemplo, basándose en los restos definidos en la Tabla IV, se puede sustituir un resto deletéreo a favor de cualquier otro resto, tal como un resto preferido; sustituir un resto menos preferido con un resto preferido; o sustituir un resto preferido que aparecía originalmente con otro resto preferido. Las sustituciones pueden producirse en posiciones de anclaje primarias o en otras posiciones en un péptido; véase, por ejemplo, Tabla IV.
- Diversas referencias reflejan la técnica con respecto a la identificación y generación de epítomos en una proteína de interés así como análogos de la misma. Véase, por ejemplo, documento WO 97/33602 de Chesnut *et al.*; Sette, *Immunogenetics* 1999 50(3-4): 201-212; Sette *et al.*, *J. Immunol.* 2001 166(2): 1389-1397; Sidney *et al.*, *Hum. Immunol.* 1997 58(1): 12-20; Kondo *et al.*, *Immunogenetics* 1997 45(4): 249-258; Sidney *et al.*, *J. Immunol.* 1996 157(8): 3480-90; y Falk *et al.*, *Nature* 351: 290-6 (1991); Hunt *et al.*, *Science* 255: 1261-3 (1992); Parker *et al.*, *J. Immunol.* 149: 3580-7 (1992); Parker *et al.*, *J. Immunol.* 152: 163-75 (1994); Kast *et al.*, 1994 152(8): 3904-12; Borrás-Cuesta *et al.*, *Hum. Immunol.* 2000 61(3): 266-278; Alexander *et al.*, *J. Immunol.* 2000 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan *et al.*, *J. Immunol.* 1991 147(8): 2663-2669; Alexander *et al.*, *Immunity* 1994 1(9): 751-761 y Alexander *et al.*, *Immunol. Res.* 1998 18(2): 79-92.
- Las divulgaciones relacionadas incluyen polipéptidos que comprenden combinaciones de los diferentes motivos expuestos en las Tablas IV(a), IV(b), IV(c), IV(d), y IV(h), y/o uno o más de los epítomos de CTL predichos de las Tablas V-XVIII y XXII-LI, y/o uno o más de los epítomos de HTL predichos de las Tablas XLVIII-LI, y/o uno o más de los motivos de unión a linfocitos T conocidos en la técnica. Algunos polipéptidos no contienen inserciones, deleciones o sustituciones dentro de los motivos o dentro de las secuencias intermedias de los polipéptidos. Además, pueden ser deseables polipéptidos que incluyan varios restos de aminoácidos N terminales y/o C terminales en uno de los lados de estos motivos (por ejemplo, para incluir una mayor parte de la arquitectura polipeptídica en la que se localiza el motivo). Normalmente, el número de restos de aminoácidos N terminales y/o C terminales en uno de los lados de un motivo está entre aproximadamente 1 y aproximadamente 100 restos de aminoácidos, preferentemente entre 5 y aproximadamente 50 restos de aminoácidos.
- Las proteínas relacionadas con PSCA se realizan de muchas formas, preferentemente en forma aislada. Una molécula de proteína PSCA purificada estará sustancialmente sin otras proteínas o moléculas que alteren la unión de PSCA con el anticuerpo, linfocito T u otro ligando. La naturaleza y el grado de aislamiento y purificación dependerán del uso pretendido. Las proteínas relacionadas con PSCA pueden incluir proteínas relacionadas con PSCA purificadas y proteínas relacionadas con PSCA solubles, funcionales. En una divulgación, una proteína PSCA soluble, funcional, o fragmento de la misma conserva la capacidad para unirse con el anticuerpo, linfocito T u otro ligando.
- Las divulgaciones del presente documento también proporcionan proteínas PSCA que comprenden fragmentos biológicamente activos de una secuencia de aminoácidos de PSCA mostrada en la Figura 1. Dichas proteínas muestran propiedades de la proteína PSCA de partida, tal como la capacidad para inducir la generación de anticuerpos que se unen específicamente con un epítomo asociado con la proteína PSCA de partida; para unirse con dichos anticuerpos; para inducir la activación de HTL o CTL; y/o para reconocerse por HTL o CTL que también se unen específicamente con la proteína de partida.
- Pueden predecirse y/o identificarse polipéptidos relacionados con PSCA que contienen estructuras particularmente interesantes usando diversas técnicas analíticas bien conocidas en este campo, incluyendo, por ejemplo, los métodos de análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf, o basándose en inmunogenicidad. Los fragmentos que contienen dichas estructuras son particularmente útiles en la generación de anticuerpos anti PSCA específicos de subunidad o linfocitos T o en la identificación de factores celulares que se unen con PSCA. Por ejemplo, pueden generarse perfiles de hidrofilia e identificarse fragmentos peptídicos inmunogénicos, usando el método de Hopp, T. P. y Woods, K. R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3824-3828. Pueden generarse perfiles de hidropaticidad, e identificarse fragmentos peptídicos inmunogénicos usando el método de Kyte, J. y Doolittle, R. F., 1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105-132. Pueden generarse perfiles de Porcentaje (%) de Restos Accesibles e identificarse fragmentos peptídicos inmunogénicos usando el método de Janin J., 1979, *Nature* 277: 491-492. Pueden generarse perfiles de Flexibilidad Promedio e identificarse fragmentos peptídicos inmunogénicos, usando el método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32: 242-255. Pueden generarse perfiles de giro beta, e identificarse fragmentos peptídicos inmunogénicos, usando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, *Protein Engineering* 1: 289-294.
- Pueden determinarse epítomos de CTL usando algoritmos específicos para identificar péptidos dentro de una proteína PSCA que son capaces de unirse óptimamente con alelos de HLA específicos (por ejemplo, usando el sitio SYFPEITHI en la URL de la Web syfpeithi.bmi-heidelberg.com/; los listados en la Tabla IV(A)-(E); Epimatrix™ y Epimer™, Universidad Brown, URL (brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); y BIMAS, URL bimas.dcrf.nih.gov/). Ilustrando esto, se han predicho epítomos peptídicos de PSCA que se presentan en el contexto de moléculas del MHC de Clase I humano, por ejemplo, HLA-A1, A2, A3, A11, A24, B7 y B35 (véase, por ejemplo,

Tablas V-XVIII, XXII-LI). Específicamente, la secuencia de aminoácidos completa de la proteína PSCA y partes relevantes de otras variantes, es decir, para predicciones de HLA de Clase I 9 restos flanqueantes en uno de los lados de una mutación puntual o punto de unión del exón y para predicciones de HLA de Clase II 14 restos flanqueantes en uno de los lados de una mutación puntual o punto de unión del exón correspondiente a esa variante, se introdujeron en el algoritmo de Búsqueda de Motivos Peptídicos de HLA hallado en el sitio web de la Sección de Bioinformática y Análisis Molecular (BIMAS) enumerado anteriormente; además del sitio SYFPEITHI, at URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/.

El algoritmo de búsqueda de motivo peptídico de HLA se desarrolló por el Dr. Ken Parker basándose en la unión de secuencias peptídicas específicas en el surco de moléculas de HLA de Clase I, en particular HLA-A2 (véase, por ejemplo, Falk *et al.*, Nature 351: 290-6 (1991); Hunt *et al.*, Science 255: 1261-3 (1992); Parker *et al.*, J. Immunol. 149: 3580-7 (1992); Parker *et al.*, J. Immunol. 152: 163-75 (1994)). Este algoritmo permite la localización y la clasificación de péptidos de 8 unidades, 9 unidades y 10 unidades a partir de una secuencia proteica completa para unión predicha con HLA-A2 así como numerosas otras moléculas de HLA de Clase I. Muchos péptidos de unión de HLA de Clase I son de 8, 9, 10 u 11 unidades. Por ejemplo, para HLA-A2 de Clase I, los epítomos preferentemente contienen una leucina (L) o metionina (M) en la posición 2 y una valina (V) o leucina (L) en el extremo C terminal (véase, por ejemplo, Parker *et al.*, J. Immunol. 149: 3580-7 (1992)). Se muestran resultados seleccionados de péptidos de unión predichos de PSCA en las Tablas V-XVIII y XXII-LI en el presente documento. En las Tablas V-XVIII y XXII-XLVIII, se muestran candidatos seleccionados, de 9 unidades y 10 unidades, para cada miembro de la familia junto con su localización, la secuencia de aminoácidos de cada péptido específico, y una puntuación de unión estimada. En las Tablas XLVIII-LI, se muestran candidatos seleccionados, de 15 unidades, para cada miembro de la familia junto con su localización, la secuencia de aminoácidos de cada péptido específico, y una puntuación de unión estimada. La puntuación de unión corresponde a la semivida estimada de la disociación de complejos que contienen el péptido a 37 °C a pH 6,5. Se predice que los péptidos con la mayor puntuación de unión serán los más estrechamente unidos a HLA de Clase I en la superficie celular durante el mayor periodo de tiempo y por lo tanto representan las mejores dianas inmunogénicas para reconocimiento de linfocitos T.

La unión real de péptidos con un alelo de HLA puede evaluarse mediante estabilización de la expresión de HLA en la línea celular defectuosa para procesamiento de antígenos T2 (véase, por ejemplo, Xue *et al.*, Prostate 30: 73-8 (1997) y Peshwa *et al.*, Prostate 36: 129-38 (1998)). La inmunogenicidad de péptidos específicos puede evaluarse *in vitro* mediante estimulación de linfocitos T citotóxicos CD8+ (CTL) en presencia de células presentadoras de antígeno tales como células dendríticas.

Debe apreciarse que cada epítomo predicho por el sitio BIMAS, sitios Epimer™ y Epimatrix™, o especificados por los motivos del HLA de clase I o clase II disponibles en la técnica o que pasen a formar parte de la técnica tales como los expuestos en la Tabla IV (o determinado usando el sitio web URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/, o BIMAS, bimas.dcrf.nih.gov/) deben “aplicarse” a una proteína PSCA de acuerdo con la invención. Como se usa en este contexto “aplicarse” significa que una proteína PSCA se evalúa, por ejemplo, visualmente o por métodos de hallazgo de patrones basados en ordenador, como se apreciará por los expertos en la materia. Cada subsecuencia de una proteína PSCA de 8, 9, 10 u 11 restos de aminoácidos que porta un motivo de HLA de Clase I, o una subsecuencia de 9 o más restos de aminoácidos que portan un motivo de HLA de Clase II están dentro del alcance de las divulgaciones del presente documento.

III.B.) Expresión de Proteínas relacionadas con PSCA

En uno de los ejemplos a continuación, PSCA puede expresarse convenientemente en células (tales como células 293T) transfectadas con un vector de expresión disponible en el mercado tales como vector de expresión conducido por CMV que codifica PSCA con un His 6X C terminal y marcador MYC (pcDNA3.1/mycHis, Invitrogen o Tag5, GenHunter Corporation, Nashville TN). El vector Tag5 proporciona una señal de secreción de IgGK que puede usarse para facilitar la producción de una proteína PSCA secretada en células transfectadas. El PSCA marcado con HIS secretado en el medio de cultivo puede purificarse, por ejemplo, usando una columna de níquel usando técnicas convencionales.

III.C.) Modificaciones de Proteínas relacionadas con PSCA

Se desvelan en el presente documento modificaciones de proteínas relacionadas con PSCA tales como modificaciones covalentes. Un tipo de modificación covalente incluye hacer reaccionar restos de aminoácidos dirigidos de un polipéptido de PSCA con un agente de derivatización orgánica que es capaz de reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o los restos N o C terminales de una proteína PSCA. Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de PSCA comprende alterar el patrón de glucosilación nativo de una proteína de la invención. Otro tipo de modificación covalente de PSCA comprende unir un polipéptido de PSCA con uno de diversos polímeros no proteicos, por ejemplo polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol o polioxiálquilenos, de la manera expuesta en las Patentes de Estados Unidos N° 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337.

Las proteínas relacionadas con PSCA también pueden modificarse para formar una molécula quimérica que comprende PSCA fusionado con otra secuencia de aminoácidos o polipeptídica heteróloga. Dicha molécula quimérica puede sintetizarse químicamente o de forma recombinante. Una molécula quimérica puede tener una proteína como se desvela en el presente documento fusionada con otro antígeno asociado a tumor o fragmento del mismo. Como alternativa, una proteína de acuerdo con las divulgaciones del presente documento puede comprender una fusión de fragmentos de una secuencia de PSCA (aminoácidos o ácido nucleico) de modo que se crea una molécula que, en toda su longitud, no es homóloga directamente de las secuencias de aminoácidos o ácidos nucleicos mostradas en la Figura 1. Dicha molécula quimérica puede comprender múltiples de la misma subsecuencia de PSCA. Una molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína relacionada con PSCA con un marcador epitópico de polihistidina, que proporciona un epítipo con el que puede unirse selectivamente el níquel inmovilizado, con citocinas o con factores de crecimiento. El marcador epitópico se coloca en general en el extremo amino o carboxilo terminal de una proteína PSCA. En un ejemplo alternativo, la molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína relacionada con PSCA con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también denominada "inmunoadesina"), dicha fusión podría ser con la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones de Ig preferentemente incluyen la sustitución de una forma soluble (dominio transmembrana suprimido o inactivado) de un polipéptido de PSCA en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula Ig. La fusión de inmunoglobulina puede incluir las regiones bisagra, CH2 y CH3 o las bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.428.130 expedida el 27 de junio de 1995.

III.D.) Usos de Proteínas relacionadas con PSCA

Las proteínas desveladas en el presente documento tienen varios usos específicos diferentes. Como PSCA está altamente expresado en cánceres de próstata y otros, se usan proteínas relacionadas con PSCA en métodos que evalúan el estado de productos génicos de PSCA en tejidos cancerosos frente a normales, dilucidando de este modo el fenotipo maligno. Normalmente, se usan polipéptidos de regiones específicas de una proteína 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). Los ensayos ejemplares utilizan anticuerpos o linfocitos T que se dirigen a proteínas relacionadas con PSCA que comprenden los restos de aminoácidos de uno o más de los motivos biológicos contenidos dentro de una secuencia polipeptídica de PSCA para evaluar las características de esta región en tejidos normales frente a cancerosos o para inducir una respuesta inmunitaria al epítipo. Como alternativa, se usan proteínas relacionadas con PSCA que contienen los restos de aminoácidos de uno o más de los motivos biológicos en una proteína PSCA para explorar con respecto a factores que interactúan con esa región de PSCA.

Los fragmentos/subsecuencias de proteínas PSCA son particularmente útiles para generar y caracterizar anticuerpos específicos de dominio (por ejemplo, anticuerpos que reconocen un epítipo extracelular o intracelular de una proteína PSCA), para identificar agentes o factores celulares que se unen con 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 métodos para preparar dichas vacunas.

Las proteínas codificadas por los genes de PSCA, o por análogos, homólogos o fragmentos de los mismos, tienen diversos usos, incluyendo pero sin limitación generar anticuerpos y en métodos para identificar ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se unen con un producto génico de PSCA. Los anticuerpos inducidos contra una proteína PSCA o fragmento de la misma son útiles en ensayos de diagnóstico y pronóstico, y metodologías de captura de imágenes en el tratamiento de cánceres humanos caracterizados por la expresión de proteína PSCA, tales como los enumerados en la Tabla I. Dichos anticuerpos pueden expresarse de forma intracelular y usarse en métodos para tratar a pacientes con dichos cánceres. También se usan proteínas o ácidos nucleicos relacionados con PSCA en la generación de respuestas de 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), métodos inmunocitoquímicos y similares. Los anticuerpos pueden marcarse y usarse como reactivos de captura de imágenes inmunológicas capaces de detectar células que expresan PSCA (por ejemplo, en métodos de captura de imágenes radioescintigráficas). Las proteínas PSCA también son particularmente útiles en la generación de vacunas de cáncer, como se describe adicionalmente en el presente documento.

IV.) Anticuerpos de PSCA

Un aspecto de la invención proporciona anticuerpos que se unen con proteínas relacionadas con PSCA. Los anticuerpos preferidos se unen específicamente con una proteína relacionada con PSCA y no se unen (o se unen débilmente) con 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); estas reacciones tienen lugar preferentemente a pH 7,5, como alternativa en un intervalo de pH 7,0 a 8,0, o como alternativa en un intervalo de pH de 6,5 a 8,5; teniendo además estas reacciones lugar a una temperatura entre 4 °C y 37 °C. Por ejemplo, los anticuerpos que se unen con PSCA pueden unirse con proteínas relacionadas con PSCA tales como los homólogos o análogos de las mismas.

Los anticuerpos de PSCA de la invención son particularmente útiles en ensayos de diagnóstico y pronóstico de cáncer (véase, por ejemplo, Tabla I) y metodologías de captura de imágenes. De forma similar, dichos anticuerpos son útiles en el tratamiento, diagnóstico y/o pronóstico de cánceres de próstata y otros, en la medida en que PSCA también se expresa o sobreexpresa en estos otros cánceres. Además, los anticuerpos expresados de forma intracelular (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios) son terapéuticamente útiles en el tratamiento de cánceres en los que está implicada la expresión de PSCA, tales como cánceres de próstata avanzados o metastásicos u otros cánceres avanzados o metastásicos.

Los anticuerpos de la invención también pueden usarse en diversos ensayos inmunológicos útiles para la detección y cuantificación de PSCA y proteínas relacionadas con PSCA mutantes. Dichos ensayos pueden comprender uno o más anticuerpos de PSCA capaces de reconocer y unirse con 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.

Los ensayos inmunológicos no de anticuerpo también comprenden ensayos de inmunogenicidad de linfocitos T (inhibidores o estimuladores) así como ensayos de unión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Además, también se desvelan en el presente documento métodos de captura de imágenes inmunológicos capaces de detectar cáncer de próstata y otros cánceres que expresan PSCA, incluyendo pero sin limitación métodos de captura de imágenes radioescintigráficos que usan anticuerpos de PSCA marcados. Dichos ensayos son clínicamente útiles en la detección, control y pronóstico de cánceres que expresan PSCA tales como cáncer de próstata.

También se usan anticuerpos de PSCA en métodos para purificar una proteína relacionada con PSCA y para aislar homólogos de PSCA y moléculas relacionadas. Por ejemplo, un método para purificar una proteína relacionada con PSCA comprende incubar un anticuerpo de PSCA, que se ha acoplado con una matriz sólida, con un lisado u otra solución que contiene una proteína relacionada con PSCA en condiciones que permitan que el anticuerpo de PSCA se una con 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 PSCA.

Se conocen bien en la técnica diversos métodos para la preparación de anticuerpos. Por ejemplo, pueden prepararse anticuerpos inmunizando un hospedador mamífero adecuado usando una proteína, un péptido o un fragmento relacionado con PSCA, 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 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 1, y después se usa como un inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. En otra realización, se sintetiza una proteína relacionada con PSCA y se usa como un inmunógeno.

Además, se usan técnicas de inmunización de ADN desnudo conocidas en este campo (con o sin proteína relacionada con PSCA purificada o células que expresen PSCA) para generar una respuesta inmunitaria al inmunógeno codificado (para una revisión, véase Donnelly *et al.*, 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

La secuencia de aminoácidos de una proteína PSCA como se muestra en la Figura 1 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. Pueden identificarse fácilmente regiones de una proteína PSCA que muestran estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, usando diversos otros métodos 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 método de Hopp, T. P. y Woods, K. R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828. Pueden generarse perfiles de hidropaticidad usando el método de Kyte, J. y Doolittle, R. F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132. Pueden generarse perfiles de Porcentaje (%) de Restos Accesibles usando el método de Janin J., 1979, Nature 277: 491-492. Pueden generarse perfiles de flexibilidad promedio usando el método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255. Pueden generarse perfiles de giro beta usando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1: 289-294. Por lo tanto, cada región identificada por cualquiera de estos programas o métodos está dentro del alcance de la presente invención. Los métodos preferidos 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 métodos para preparar

una proteína o polipéptido para su uso como un inmunógeno. También se conocen bien en la técnica métodos para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo, tales 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 enlace tales como los proporcionados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL, are effective. Se realiza con frecuencia administración de un inmunógeno de PSCA mediante 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 títulos 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 linfocitos B productores de anticuerpos, como se conoce en general. Se exploran líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados por inmunoensayo en el que el antígeno es una proteína relacionada con PSCA. Cuando el cultivo celular inmortalizado apropiado se identifica, las células pueden expandirse y los anticuerpos producirse bien a partir de cultivos *in vitro* o bien de líquido ascítico.

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

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales completamente humanos incluyen métodos de presentación en fagos y transgénicos (para una revisión, véase Vaughan *et al.*, 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539). Pueden generarse anticuerpos monoclonales de PSCA completamente humanos usando tecnologías de clonación que emplean bibliotecas combinatorias de genes de Ig humanos grandes (es decir, presentación en fagos) (Griffiths y Hoogenboom, Building an *in vitro* immune system: human antibodies from phage display libraries. En: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man, Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, pp 45-64 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Misma referencia., pp 65-82). También pueden producirse anticuerpos monoclonales de PSCA completamente humanos usando ratones transgénicos modificados técnicamente para contener loci de genes de inmunoglobulina humana como se describe en la Solicitud de Patente de PCT WO98/24893, Kucherlapati y Jakobovits *et al.*, publicado 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 expedida el 19 de diciembre de 2000; 6.150.584 expedida el 12 de noviembre de 2000; y 6.114.598 expedida el 5 de septiembre de 2000). Este método evita la manipulación *in vitro* requerida con tecnología de presentación en 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, ELISA y análisis de FACS usando, según sea apropiado, proteínas relacionadas con PSCA, células que expresan PSCA o extractos de las mismas. Un anticuerpo de PSCA o fragmento del mismo puede marcarse 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, un compuesto quimioluminiscente, un quelante metálico o una enzima. Además, se generan anticuerpos biespecíficos específicos para dos o más epítomos de PSCA usando métodos conocidos en general en la técnica. También pueden generarse anticuerpos homodiméricos por técnicas de entrecruzamiento conocidas en este campo (por ejemplo, Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-2565).

En una realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales identificados como Ha1-4.121, se envió (mediante Federal Express) a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 el 4 de mayo de 2005 y se le asignó el número de Referencia PTA-6701. También se desvelan en el presente documento anticuerpos monoclonales identificados como Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.20, Ha1-4.37 que se enviaron (mediante Federal Express) a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 el 4 de mayo de 2005 y se les asignaron los números de Referencia PTA-6698, PTA-6703, PTA-6699, PTA-6700 y PTA-6702 respectivamente.

V.) Respuestas Inmunitarias Celulares a PSCA

El mecanismo por el que los linfocitos T reconocen antígenos se ha delimitado. Las composiciones de vacuna de epítomos peptídicos eficaces desveladas en el presente documento inducen respuestas inmunitarias terapéuticas o profilácticas en segmentos muy amplios de la población mundial. Para un entendimiento del valor y la eficacia de las composiciones que inducen respuestas inmunitarias celulares, se proporciona una breve revisión de la tecnología

relacionada con inmunología.

Un complejo de una molécula de HLA y un antígeno peptídico actúa como el ligando reconocido por linfocitos T restringidos por HLA (Buus, S. *et al.*, Cell 47: 1071, 1986; Babbitt, B. P. *et al.*, Nature 317: 359, 1985; Townsend, A. y Bodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7: 601, 1989; Germain, R. N., Annu. Rev. Immunol. 11: 403, 1993). A lo largo del estudio de análogos de antígenos con aminoácidos individuales sustituidos y la secuenciación de péptidos procesados de forma natural, unidos de forma endógena, se han identificado restos críticos que corresponden a motivos requeridos para unión específica con moléculas de antígeno de HLA y se exponen en la Tabla IV (véase también, por ejemplo, Southwood, *et al.*, J. Immunol. 160: 3363, 1998; Rammensee, *et al.*, Immunogenetics 41: 178, 1995; Rammensee *et al.*, SYFPEITHI, acceso a través de la Web en la URL (134.2.96.221/scripts.hlaserv-er.dll/home.htm); Sette, A. y Sidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10: 478, 1998; Engelhard, V. H., Curr. Opin. Immunol. 6: 13, 1994; Sette, A. y Grey, H. M., Curr. Opin. Immunol. 4: 79, 1992; Sinigaglia, F. y Hammer, J. Curr. Biol. 6: 52, 1994; Ruppert *et al.*, Cell 74: 929-937, 1993; Kondo *et al.*, J. Immunol. 155: 4307-4312, 1995; Sidney *et al.*, J. Immunol. 157: 3480-3490, 1996; Sidney *et al.*, Human Immunol. 45: 79-93, 1996; Sette, A. y Sidney, J. Immunogenetics nov 1999; 50(3-4):201-12, Revisión).

Además, los análisis cristalográficos de rayos x de complejos de HLA-péptido han revelado bolsillos dentro de la hendidura/surco de unión del péptido de moléculas HLA que acomodan, de una manera específica de alelo, restos portados por ligandos peptídicos; estos restos a su vez determinan la capacidad de unión de HLA de los péptidos en los que están presentes. (Véase, por ejemplo, Madden, D. R. Annu. Rev. Immunol. 13: 587, 1995; Smith, *et al.*, Immunity 4: 203, 1996; Fremont *et al.*, Immunity 8: 305, 1998; Stern *et al.*, Structure 2: 245, 1994; Jones, E. Y. Curr. Opin. Immunol. 9: 75, 1997; Brown, J. H. *et al.*, Nature 364: 33, 1993; Guo, H. C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8053, 1993; Guo, H. C. *et al.*, Nature 360: 364, 1992; Silver, M. L. *et al.*, Nature 360: 367, 1992; Matsumura, M. *et al.*, Science 257: 927, 1992; Madden *et al.*, Cell 70: 1035, 1992; Fremont, D. H. *et al.*, Science 257: 919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. y Wiley, D. C., J. Mol. Biol. 219: 277, 1991).

En consecuencia, la definición de motivos de unión a HLA específicos de alelo de clase I y clase II o supermotivos de clase I o clase II permite la identificación de regiones dentro de una proteína que están correlacionadas con la unión a un antígeno o antígenos de HLA particulares.

Por lo tanto, por un proceso de identificación de motivo de HLA, se han identificado candidatos para vacunas basadas en epítomos; dichos candidatos pueden evaluarse adicionalmente por ensayos de unión de HLA-péptido para determinar la afinidad de unión y/o el periodo de tiempo de asociación del epítomo y su molécula de HLA correspondiente. Puede realizarse trabajo de confirmación adicional para seleccionar, entre estos candidatos a vacuna, epítomos con características preferidas con respecto a cobertura de población y/o inmunogenicidad.

Pueden utilizarse diversas estrategias para evaluar la inmunogenicidad celular, incluyendo:

1) Evaluación de cultivos de linfocitos T primarios a partir de individuos normales (véase, por ejemplo, Wentworth, P. A. *et al.*, Mol. Immunol. 32: 603, 1995; Celis, E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2105, 1994; Tsai, V. *et al.*, J. Immunol. 158: 1796, 1997; Kawashima, I. *et al.*, Human Immunol. 59: 1, 1998). Este procedimiento implica la estimulación de linfocitos de sangre periférica (PBL) de sujetos normales con un péptido de ensayo en presencia de células presentadoras de antígeno *in vitro* durante un periodo de varias semanas. Los linfocitos T específicos para el péptido se activan durante este tiempo y se detectan usando, por ejemplo, un ensayo de liberación de linfocinas o ⁵¹Cr que implica células diana sensibilizadas a péptido.

2) Inmunización de ratones transgénicos para HLA (véase, por ejemplo, Wentworth, P. A. *et al.*, J. Immunol. 26: 97, 1996; Wentworth, P. A. *et al.*, Int. Immunol. 8: 651, 1996; Alexander, J. *et al.*, J. Immunol. 159: 4753, 1997). Por ejemplo, en dichos métodos los péptidos en adyuvante incompleto de Freund se administran por vía subcutánea a ratones transgénicos para HLA. Varias semanas después de la inmunización, los esplenocitos se retiran y se cultivan *in vitro* en presencia de péptido de ensayo durante aproximadamente una semana. Se detectan linfocitos T específicos de péptido usando, por ejemplo, un ensayo de liberación de ⁵¹Cr que implica células diana sensibilizadas a péptido y células diana que expresan antígeno generado de forma endógena.

3) Demostración de respuestas de linfocitos T de recuerdo de individuos inmunitarios que se han vacunado con éxito y/o de pacientes crónicamente enfermos (véase, por ejemplo, Rehmann, B. *et al.*, J. Exp. Med. 181: 1047, 1995; Doolan, D. L. *et al.*, Immunity 7: 97, 1997; Bertoni, R. *et al.*, J. Clin. Invest. 100: 503, 1997; Threlkeld, S. C. *et al.*, J. Immunol. 159: 1648, 1997; Diepolder, H. M. *et al.*, J. Virol. 71: 6011, 1997). En consecuencia, se detectan respuestas de recuerdo cultivando PBL de sujetos que se han expuesto al antígeno debido a una enfermedad y por lo tanto han generado una respuesta inmunitaria "de forma natural" o de pacientes que se han vacunado contra el antígeno. Se cultivan PBL de sujetos *in vitro* durante 1-2 semanas en presencia de péptido de ensayo más células presentadoras de antígeno (APC) para permitir la activación de linfocitos T de "memoria", en comparación con linfocitos T "vírgenes". Al final del periodo de cultivo, la actividad de linfocitos T se detecta usando ensayos incluyendo liberación de ⁵¹Cr que implica dianas sensibilizadas a péptido, proliferación de linfocitos T o liberación de linfocinas.

VI.) Animales Transgénicos para PSCA

También pueden usarse ácidos nucleicos que codifican una proteína relacionada con PSCA para generar animales transgénicos o animales "knock out" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y exploración de reactivos terapéuticamente útiles. De acuerdo con técnicas establecidas, puede usarse ADNc que codifica PSCA para clonar ADN genómico que codifica PSCA. Las secuencias genómicas clonadas pueden usarse después para generar animales transgénicos que contienen células que expresan ADN que codifica PSCA. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han hecho convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos N° 4.736.866 expedida el 12 de abril de 1988 y 4.870.009 expedida el 26 de septiembre de 1989. Normalmente, se dirigirá incorporación de transgenes de PSCA a células particulares con potenciadores específicos de tejido.

Pueden usarse animales transgénicos que incluyen una copia de un transgén que codifica PSCA para examinar el efecto de expresión aumentada de ADN que codifica PSCA. Dichos animales pueden usarse como animales de ensayo para reactivos que se cree que confieren protección de, por ejemplo, afecciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. De acuerdo con la presente divulgación, un animal se trata con un reactivo y una incidencia reducida de una afección patológica, en comparación con animales no tratados que porten el transgén, indicaría una intervención terapéutica potencial para la afección patológica.

Como alternativa, pueden usarse homólogos no humanos de PSCA para construir un animal "knock out" para PSCA que tenga un gen defectuoso o alterado que codifique PSCA como resultado de recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica PSCA y ADN genómico alterado que codifica PSCA introducido en una célula embrionaria de animal. Por ejemplo, puede usarse ADNc que codifica PSCA para clonar ADN genómico que codifica PSCA de acuerdo con técnicas establecidas. Una parte del ADN genómico que codifica PSCA puede suprimirse o reemplazarse con otro gen, tal como un gen que codifique un marcador seleccionable que pueda usarse para controlar la integración. Normalmente, se incluyen varias kilobases de ADN flanqueante inalterado (en los extremos tanto 5' como 3') en el vector (véase, por ejemplo, Thomas y Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos). El vector se introduce en una línea de células madre embrionarias (por ejemplo, por electroporación) y se seleccionan células en las que el ADN introducido se ha recombinado de forma homóloga con el ADN endógeno (véase, por ejemplo, Li *et al.*, Cell, 69: 915 (1992)). Las células seleccionadas se inyectan después en un blastocisto de un animal (por ejemplo, un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación (véase, por ejemplo, Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152). Después puede implantarse un embrión quimérico en un animal sustituto hembra pseudoembarazada adecuado, y el embrión se lleva a término para crear un animal "knock out". La descendencia que alberga el ADN recombinado de forma homóloga en sus células germinales puede identificarse por técnicas convencionales y usarse para criar animales en los que todas las células del animal contienen el ADN recombinado de forma homóloga. Los animales knock out pueden caracterizarse, por ejemplo, por su capacidad para defenderse contra ciertas afecciones patológicas o por su desarrollo de afecciones patológicas debido a ausencia de un polipéptido de PSCA.

VII.) Métodos para la detección de PSCA

Otra divulgación del presente documento se refiere a métodos para detectar polinucleótidos de PSCA y proteínas relacionadas con PSCA, así como métodos para identificar una célula que expresa 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 diversos factores incluyendo susceptibilidad a enfermedad de estadio avanzado, tasa de progresión y/o agresividad del tumor. Como se analiza en detalle en el presente documento, el estado de los productos génicos de PSCA en muestras de pacientes puede analizarse por diversos 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 por láser), análisis de transferencia de Western y análisis de matriz tisular.

Más particularmente, la divulgación 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 métodos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos de PSCA y pueden emplearse en la práctica de este aspecto de la invención.

Un método para detectar un ARNm de PSCA en una muestra biológica puede comprender producir ADNc de la muestra por transcripción inversa usando al menos un cebador; amplificar el ADNc producido de este modo usando polinucleótidos de PSCA como cebadores con sentido y antisentido para amplificar ADNc de PSCA en los mismos; y detectar la presencia del ADNc de PSCA amplificado. Opcionalmente, puede determinarse la secuencia del ADNc de PSCA amplificado.

Un método para detectar un gen de PSCA en una muestra biológica puede comprender aislar en primer lugar ADN

genómico de la muestra; amplificar el ADN genómico aislado usando polinucleótidos de PSCA como cebadores con sentido y antisentido; y detectar la presencia del gen de PSCA amplificado. Puede diseñarse cualquier variedad de combinaciones de sondas con sentido y antisentido apropiadas a partir de una secuencia de nucleótidos de PSCA (véase, por ejemplo, Figura 1) y usarse para este fin.

También se desvelan en el presente documento ensayos para detectar la presencia de una proteína PSCA en un tejido u otra muestra biológica tal como suero, semen, hueso, próstata, orina, preparaciones celulares y similares. También se conocen bien métodos para detectar una proteína relacionada con PSCA e incluyen, por ejemplo, inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de transferencia de Western, ensayos de unión molecular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, un método para detectar la presencia de una proteína relacionada con PSCA en una muestra biológica comprende poner en contacto en primer lugar la muestra con un anticuerpo de PSCA, un fragmento reactivo 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 la proteína relacionada con PSCA en la muestra.

También están dentro del alcance de las divulgaciones métodos para identificar una célula que exprese PSCA. Un ensayo para identificar una célula que exprese un gen de PSCA puede comprender detectar la presencia de ARNm de PSCA en la célula. Se conocen bien métodos para la detección de ARNm particulares en células e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación in situ usando ribosondas de PSCA marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas) y diversos ensayos de amplificación de ácidos nucleicos (tales como RT-PCR usando cebadores complementarios específicos para PSCA, y otros métodos 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 en la célula o secretada por la célula. Se conocen bien en la técnica diversos métodos 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 un agente biológico que inhibe la expresión o sobreexpresión de PSCA en células cancerosas tiene valor terapéutico. Por ejemplo, dicho agente puede identificarse usando una exploración que cuantifica la expresión de PSCA por RT-PCR, hibridación de ácido nucleico o unión a anticuerpo.

VIII.) Métodos 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 precanceroso y después estados cancerosos (véase, por ejemplo, Alers *et al.*, Lab Invest. 77(5): 437-438 (1997) y Isaacs *et al.*, Cancer Surv. 23: 19-32 (1995)). En este contexto, el examen de una muestra biológica con respecto a pruebas de crecimiento celular desregulado (tal como expresión de PSCA aberrante en cánceres) permite la detección temprana de dicha fisiológica aberrante, antes de que un estado patológico tal como cáncer halla progresado a un estadio en el que las opciones terapéuticas estén más limitadas y/o el pronóstico sea peor. En dichos exámenes, puede compararse el estado de PSCA en una muestra biológica de interés, 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 se ve afectado por una patología). Una alteración en el estado de PSCA en la muestra biológica (en comparación con la muestra normal) proporciona pruebas del crecimiento celular desregulado. Además de usar una muestra biológica que no se ve afectada por una patología como una muestra normal, también se puede usar un valor normativo predeterminado tal como un nivel normal predeterminado de expresión de ARNm (véase, por ejemplo, Grever *et al.*, J. Comp. Neurol. 9 dic 1996; 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. Normalmente, los expertos en la materia usan varios parámetros para evaluar la condición o el 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 la actividad biológica de productos génicos expresados (tales como ARNm de PSCA, polinucleótidos y polipéptidos). Normalmente, una alteración del estado de PSCA comprende un cambio en la localización de PSCA y/o células que expresan PSCA y/o un aumento en la expresión de ARNm y/o proteína 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 por RT-PCR en muestras microdisecionadas con captura por láser, análisis de transferencia de Western y análisis de matrices tisulares. Se encuentran protocolos típicos para evaluar el estado de un gen y productos génicos de PSCA, por ejemplo, en Ausubel *et al.* 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 métodos utilizados por expertos en la materia incluyendo, pero sin limitación análisis de Southern

genómico (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, alteraciones en las secuencias polinucleotídicas o niveles de expresión de ARNm de PSCA), y análisis de Western y/o inmunohistoquímica (para examinar, por ejemplo alteraciones en secuencias polipeptídicas, alteraciones en localización polipeptídica dentro de una muestra, alteraciones en niveles de expresión de proteínas PSCA y/o asociaciones de proteínas 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 potencial oncogénico de una muestra biológica. En particular, el estado de PSCA proporciona información útil para predecir la susceptibilidad a estadios de enfermedad particulares, progresión y/o agresividad tumoral. Se desvelan en el presente documento métodos y ensayos para determinar el estado de PSCA y diagnosticar cánceres que expresan PSCA, tales como cánceres de los tejidos enumerados en la Tabla I. Por ejemplo, debido a que el ARNm de PSCA se expresa en tan alta medida en próstata y otros cánceres en relación con el tejido de próstata 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 la desregulación de PSCA, y pueden proporcionar información de pronóstico útil para definir opciones terapéuticas apropiadas.

El estado de expresión de PSCA proporciona información incluyendo la presencia, el estadio y la localización de células displásicas, precancerosas y cancerosas, que predicen la susceptibilidad a diversos estadios de enfermedad y/o para calibrar la agresividad tumoral. Además, el perfil de expresión lo hace útil como un reactivo de captura de imágenes para enfermedad metastatizada. En consecuencia, se desvelan en el presente documento diversos métodos 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 expresen PSCA (por ejemplo las que expresan ARNm o proteínas de PSCA). Este examen puede proporcionar pruebas de crecimiento celular desregulado, por ejemplo, cuando se encuentren células que expresen PSCA en una muestra biológica que no contenga normalmente dichas células (tal como un ganglio linfático), porque dichas alteraciones en el estado de PSCA en una muestra biológica se asocian con frecuencia con crecimiento celular desregulado. Específicamente, un indicador del crecimiento celular desregulado es las metástasis de células cancerosas de un órgano de origen (tal como la próstata) a un área diferente del cuerpo (tal como un ganglio linfático). En este contexto, son importantes las pruebas de crecimiento celular desregulado por ejemplo porque pueden detectarse metástasis de ganglios linfático ocultas en una proporción sustancial de pacientes con cáncer de próstata, y dichas metástasis se asocian con predictores conocidos de progresión de enfermedad (véase, por ejemplo, Murphy *et al.*, *Prostate* 42(4): 315-317 (2000); Su *et al.*, *Semin. Surg. Oncol.* 18(1): 17-28 (2000) y Freeman *et al.*, *J Urol* Ago 1995 154(2 Pt 1): 474-8).

Se desvelan en el presente documento métodos para controlar los productos génicos de PSCA determinando el estado de los productos génicos de PSCA expresados por células de un individuo que se sospecha que tiene 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 una indicación de la presencia del crecimiento celular desregulado dentro de las células del individuo.

Se desvelan en el presente documento ensayos útiles para determinar la presencia de cáncer en un individuo, que comprenden detectar un aumento significativo en la expresión de proteína o ARNm de PSCA en una muestra celular o tisular de ensayo en relación con los niveles de expresión en la célula o el tejido normal correspondiente. La presencia de ARNm de PSCA puede evaluarse, por ejemplo, en tejidos incluyendo pero sin limitación los enumerados en la Tabla I. La presencia de la expresión de PSCA significativa en cualquiera de estos tejidos es útil para indicar la aparición, presencia y/o gravedad en un cáncer, ya que los tejidos normales correspondientes no expresan ARNm de PSCA o lo expresan a niveles menores.

En una divulgación relacionada, el estado de PSCA se determina al nivel de proteínas en lugar de al nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, dicho método comprende determinar el nivel de proteína de PSCA expresada por células en una muestra tisular de ensayo y comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de PSCA expresado en una muestra normal correspondiente. La presencia de proteína PSCA puede evaluarse, por ejemplo, usando métodos inmunohistoquímicos. Se usan anticuerpos de PSCA o compañeros de unión capaces de detectar expresión de la proteína PSCA en diversos formatos de ensayo bien conocidos en la técnica para este fin.

Se puede evaluar el estado de secuencias de nucleótidos y aminoácidos de PSCA en una muestra biológica para identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas. Estas perturbaciones pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones y similares. Dichas evaluaciones son útiles porque se observan perturbaciones en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos en un gran número de proteínas asociadas con un fenotipo de crecimiento desregulado (véase, por ejemplo, Marrogi *et al.*, 1999, *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378). Por ejemplo, una mutación en la secuencia de PSCA puede ser indicativa de la presencia o promoción de un tumor. Dichos ensayos tienen por lo tanto valor diagnóstico o predictivo en el que una mutación en PSCA indica una pérdida potencial de función o aumento del crecimiento tumoral.

Se conocen bien en la técnica una amplia diversidad de ensayos para observar perturbaciones en secuencias de nucleótidos y aminoácidos. Por ejemplo, el tamaño y la estructura de secuencias de ácido nucleico o aminoácidos de productos génicos de PSCA se observan por los protocolos de secuenciación de Northern, Southern, Western, PCR y ADN analizados en el presente documento. Además, se conocen bien en la técnica otros métodos para observar perturbaciones en secuencias de nucleótidos y aminoácidos tales como el análisis de polimorfismo de conformación monocatenaria (véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.382.510 expedida el 7 de septiembre de 1999 y 5.952.170 expedida el 17 de enero de 1995).

Adicionalmente, se puede examinar el estado de metilación de un gen de PSCA en una muestra biológica. Se produce desmetilación aberrante y/o hiperventilación de islas de CpG en regiones reguladoras 5' génicas que aparecen frecuentemente en células inmortalizadas y transformadas, y puede dar como resultado expresión alterada de diversos genes. Por ejemplo, la hipermetilación del promotor de glutatión S-transferasa de clase pi (una proteína expresada en próstata normal pero no expresada en > 90 % de carcinomas de próstata) parece silenciar permanentemente la transcripción de este gen y es la alteración genómica más frecuentemente detectada en carcinomas de próstata (De Marzo *et al.*, *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985-1992 (1999)). Además, esta alteración está presente en al menos el 70 % de casos de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) (Brooks *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, 7: 531-536). En otro ejemplo, se induce expresión del gen específico de tumor de LAGE-I (que no se expresa en próstata normal pero se expresa en el 25-50 % de cánceres de próstata) por desoxi-azacitidina en células linfoblastoides, lo que sugiere que la expresión tumoral se debe a la desmetilación (Lethe *et al.*, *Int. J. Cancer* 76(6): 903-908 (1998)). Se conocen bien en la técnica diversos 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 de CpG metilados para evaluar el estado de metilación de islas de CpG. Además la MSP (PCR específica de metilación) puede perfilar rápidamente el estado de metilación de todos los sitios de 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 metilado frente a no metilado. También pueden encontrarse protocolos que implican inferencia de metilación por ejemplo en *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidad 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995.

La amplificación génica es un método adicional para evaluar el estado de PSCA. La amplificación génica se mide en una muestra directamente, por ejemplo, por transferencia de Southern o transferencia de Northern convencionales 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 apropiadamente, 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 proteína y ADN. Los anticuerpos a su vez se marcan y se lleva a cabo el ensayo en el que la doble cadena se une a una superficie, de modo que tras la formación de la doble cadena a la superficie, puede detectarse la presencia de anticuerpo unido a la doble cadena.

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

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

susceptibilidad al cáncer (o la aparición o existencia de un tumor).

También se desvelan en el presente documento métodos para calibrar la agresividad tumoral. Un método para calibrar la agresividad de un tumor puede comprender determinar el nivel de ARNm de PSCA o proteína PSCA expresados por células tumorales, comparar el nivel determinado de este modo con el nivel de ARNm de PSCA o proteína PSCA expresado 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 PSCA en la muestra tumoral en relación con la muestra normal indica el grado de agresividad. En un método, la agresividad de un tumor se evalúa determinando el grado en el que se expresa PSCA en las células tumorales, indicando mayores niveles de expresión tumores más agresivos. Otro método es la evaluación de la integridad de 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.

Se desvelan en el presente documento métodos para observar la progresión de un tumor maligno en un individuo a lo largo del tiempo. Los métodos para observar la progresión de un tumor maligno de un individuo a lo largo del tiempo pueden comprender determinar el nivel de ARNm de PSCA o proteína 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 PSCA expresado en una muestra tisular equivalente tomada del mismo individuo en un momento diferente, en el que el grado de expresión de ARNm de PSCA o proteína PSCA en la muestra tumoral a lo largo del tiempo proporciona información sobre la progresión del cáncer. En un método, la progresión de un cáncer se evalúa determinando la expresión de PSCA en las células tumorales a lo largo del tiempo, en el que una expresión aumentada a lo largo del tiempo indica una progresión del cáncer. También 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 tales como inserciones, deleciones, sustituciones y similares, en el que la presencia de una o más perturbaciones indica 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 técnica. También se desvelan en el presente documento métodos para observar una coincidencia entre la expresión del gen de PSCA y productos génicos de PSCA (o perturbaciones en el gen de PSCA y productos génicos de PSCA) y un factor que está asociado con la malignidad, como un medio para diagnosticar y pronosticar el estado de una muestra tisular. Puede utilizarse una amplia diversidad de factores asociados con la malignidad, tales como la expresión de genes asociados con la malignidad (por ejemplo, expresión de PSA, PSCA y PSM para cáncer de próstata, etc.) así como observaciones citológicas generales (véase, por ejemplo, Bocking *et al.*, 1984, *Anal. Quant. Cytol.* 6(2): 74-88; Epstein, 1995, *Hum. Pathol.* 26(2): 223-9; Thorson *et al.*, 1998, *Mod. Pathol.* 11(6): 543-51; Baisden *et al.*, 1999, *Am. J. Surg. Pathol.* 23(8): 918-24). Los métodos para observar una coincidencia entre la expresión del 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 la malignidad son útiles, por ejemplo, porque la presencia de un conjunto de factores específicos que coinciden con la enfermedad proporciona información crucial para diagnosticar o pronosticar el estado de una muestra tisular.

Los métodos para observar una coincidencia entre la expresión del gen de PSCA y productos génicos de PSCA (o perturbaciones en el gen de PSCA y productos génicos de PSCA) y otro factor asociado con la malignidad pueden implicar 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 la sobreexpresión de ARNm o proteína de PSCA y ARNm y proteína de PSA (o expresión de PSCA o PSM). Puede examinarse la expresión de ARNm de PSCA y PSA en tejido de próstata, en el que la coincidencia de la sobreexpresión de ARNm de PSCA y PSA en la muestra indica la existencia de cáncer de próstata, susceptibilidad a cáncer de próstata o en la aparición o estado de un tumor prostático.

Se describen en el presente documento métodos 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 ácidos nucleicos y proteínas convencionales. Métodos convencionales para detección y cuantificación de ARNm de PSCA incluyen hibridación in situ usando ribosondas de PSCA marcadas, transferencia de Northern y técnicas relacionadas usando sondas polinucleotídicas de PSCA, análisis de RT-PCR usando cebadores específicos para PSCA y otros métodos 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. Pueden usarse anticuerpos policlonales o monoclonales específicamente reactivos con la proteína PSCA de tipo silvestre en un ensayo inmunohistoquímico de tejido de biopsia.

IX.) Identificación de Moléculas Que Interaccionan Con PSCA

Las secuencias de proteínas y ácidos nucleicos de PSCA desveladas en el presente documento permiten a un experto en la materia identificar proteínas, moléculas pequeñas y otros agentes que interaccionan con PSCA, así

como rutas activadas por PSCA mediante uno cualquiera de diversos protocolos aceptados en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar los llamados sistemas de trampa de interacción (también denominados “ensayos de dos híbridos”). En dichos sistemas, las moléculas interactúan y reconstituyen un factor de transcripción que dirige la expresión de un gen indicador, tras lo cual se ensaya la expresión del gen indicador. Otros sistemas identifican interacciones proteína-proteína *in vivo* mediante reconstitución de un activador transcripcional eucariota, véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.955.280 expedida el 21 de septiembre de 1999, 5.925.523 expedida el 20 de julio de 1999, 5.846.722 expedida el 8 de diciembre de 1998 y 6.004.746 expedida el 21 de diciembre de 1999. También están disponibles en la técnica algoritmos para predicciones basadas en genoma de la función proteica (véase, por ejemplo, Marcotte, *et al.*, Nature 402: 4 de noviembre de 1999, 83-86).

Como alternativa se pueden explorar bibliotecas de péptidos para identificar moléculas que interactúan con secuencias proteicas de PSCA. En dichos métodos, se identifican péptidos que se unen con PSCA explorando bibliotecas que codifiquen una colección aleatoria o controlada de aminoácidos. Se expresan péptidos codificados por las bibliotecas como proteínas de fusión de proteínas de recubrimiento de bacteriófagos, después se exploran las partículas de bacteriófagos frente a la proteína o las proteínas PSCA.

En consecuencia, se identifican de este modo péptidos que tengan una amplia diversidad de usos, tales como reactivos terapéuticos, de pronóstico o de diagnóstico, sin ninguna información previa sobre la estructura de la molécula receptora o ligando esperada. Se desvelan bibliotecas peptídicas y métodos de exploración típicos que pueden usarse para identificar moléculas que interactúan con secuencias proteicas de PSCA por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos N° 5.723.286 expedida el 3 de marzo de 1998 y 5.733.731 expedida el 31 de marzo de 1998.

Como alternativa, se usan líneas celulares que expresan PSCA para identificar interacciones proteína-proteína mediadas por PSCA. Dichas interacciones pueden examinarse usando técnicas de inmunoprecipitación (véase, por ejemplo, Hamilton B. J., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261: 646-51). La proteína PSCA puede inmunoprecipitarse a partir de líneas celulares que expresan PSCA usando anticuerpos anti PSCA. Como alternativa, pueden usarse anticuerpos contra marcador de His en una línea celular modificada técnicamente para expresar fusiones de PSCA y un marcador de His (vectores mencionados anteriormente). El complejo inmunoprecipitado puede examinarse con respecto a asociación a proteínas por procedimientos tales como transferencia de Western, marcaje con ³⁵S-metionina de proteínas, microsecuenciación de proteínas, tinción con plata y electroforesis en gel bidimensional.

Pueden identificarse moléculas pequeñas y ligandos que interactúan con PSCA mediante realizaciones relacionadas de dichos ensayos de exploración. Por ejemplo, pueden identificarse moléculas pequeñas que interfieren con la función proteica, incluyendo moléculas que interfieren con la capacidad de PSCA para mediar en la fosforilación y desfosforilación, interacción con moléculas de ADN o ARN como una indicación de regulación de ciclos celulares, señalización de segundo mensajero o tumorigénesis. De forma similar, se identifican moléculas pequeñas que modulan el canal de iones relacionado con PSCA, la bomba de proteínas o funciones de comunicación celular y se usan para tratar pacientes que tengan un cáncer que exprese PSCA (véase, por ejemplo, Hille, B., Ionic Channels of Excitable Membranes 2^a Ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992). Además, los ligandos que regulan la función de PSCA pueden identificarse basándose en su capacidad para unirse con PSCA y activar una construcción indicadora. Se analizan métodos típicos por ejemplo en la Patente de Estados Unidos N° 5.928.868 expedida el 27 de julio de 1999, e incluyen métodos para formar ligandos híbridos en los que al menos un ligando es una molécula pequeña. En un ejemplo ilustrativo, se usan células modificadas técnicamente para expresar una proteína de fusión de PSCA y una proteína de unión a ADN para coexpresar una proteína de fusión de una molécula pequeña/ligando híbrido y una proteína activadora transcripcional de biblioteca de ADNc. Las células contienen además un gen indicador, cuya expresión está condicionada por la proximidad de las primera y segunda proteínas de fusión entre sí, un acontecimiento que se produce solamente si el ligando híbrido se une con sitios diana en ambas proteínas híbridas. Se seleccionan las células que expresan el gen indicador y se identifica la molécula pequeña desconocida o el ligando desconocido. Este método proporciona un medio para identificar moduladores que activan o inhiben PSCA.

Se desvela en el presente documento un método para explorar con respecto a una molécula que interactúa con una secuencia de aminoácidos de PSCA mostrada en la Figura 1, que comprende las etapas de poner en contacto una población de moléculas con una secuencia de aminoácidos de PSCA, permitiendo que la población de moléculas y la secuencia de aminoácidos de PSCA interactúen en condiciones que faciliten una interacción, determinar la presencia de una molécula que interactúa con la secuencia de aminoácidos de PSCA y después separar moléculas que no interactúan con la secuencia de aminoácidos de PSCA de moléculas que sí. El método puede comprender además purificar, caracterizar e identificar una molécula que interactúa con la secuencia de aminoácidos de PSCA. La molécula identificada puede usarse para modular una función realizada por PSCA. La secuencia de aminoácidos de PSCA puede ponerse en contacto con una biblioteca de péptidos.

X.) Métodos y Composiciones Terapéuticos

La identificación de PSCA como una proteína que se expresa normalmente en un conjunto de tejidos restringido, pero que también se expresa en cánceres tales como los enumerados en la Tabla I, abre varios enfoques terapéuticos para el tratamiento de dichos cánceres.

Debe observarse que las terapias antitumorales dirigidas han sido útiles incluso cuando la proteína diana se expresa en tejidos normales, incluso tejidos orgánicos normales vitales. Un órgano vital es uno que es necesario para mantener la vida, tal como el corazón o el colon. Un órgano no vital es uno que puede retirarse, tras lo cual el individuo aún puede sobrevivir. Los ejemplos de órganos no vitales son ovario, mama y próstata.

Por ejemplo, Herceptin® es un producto farmacéutico aprobado por la FDA que consiste en un anticuerpo que es inmunorreactivo con la proteína conocida de diversas formas como HER2, HER2/neu y erb-b-2. Se comercializa por Genentech y ha sido un agente antitumoral comercialmente exitoso. Las ventas de Herceptin® alcanzaron casi 400 millones de dólares en 2002. Herceptin® es un tratamiento para cáncer de mama metastásico positivo para HER2. Sin embargo, la expresión de HER2 no se limita a dichos tumores. La misma proteína se expresa en varios tejidos normales. En particular, se sabe que HER2/neu está presente en riñón y corazón normales, por lo tanto estos tejidos están presentes en todos los receptores humanos de Herceptin. La presencia de HER2/neu en riñón normal también se confirma por Latif, Z., *et al.*, B.J.U. International (2002) 89: 5-9. Como se muestra en este artículo (que evaluó si el carcinoma de células renales debería ser una indicación preferida para anticuerpos anti HER2 tales como Herceptin) se produjeron tanto proteína como ARNm en tejidos renales benignos. Notablemente, la proteína HER2/neu se sobreexpresaba fuertemente en tejido renal benigno.

A pesar del hecho de que HER2/neu se expresa en tejidos vitales tales como corazón y riñón, Herceptin es un fármaco muy útil, aprobado por la FDA y comercialmente exitoso. El efecto de Herceptin en tejido cardiaco, es decir, la "cardiotoxicidad", ha sido únicamente un efecto secundario del tratamiento. Cuando los pacientes se trataron con Herceptin solamente, se produjo cardiotoxicidad significativa en un porcentaje muy bajo de pacientes. Para minimizar la cardiotoxicidad hay un requisito de entrada más riguroso para el tratamiento con HER2/neu. Se evalúan factores tales como la predisposición a afección cardiaca antes de que pueda producirse el tratamiento.

Cabe destacar en particular, que aunque se ha indicado que el tejido de riñón muestra expresión normal, posiblemente expresión aún mayor que el tejido cardiaco, el riñón no tiene un efecto secundario de Herceptin apreciable en absoluto. Además, de la matriz diversa de tejidos normales en los que se expresa HER2, hay poca aparición de ningún efecto secundario. Solamente el tejido cardiaco ha manifestado algún efecto secundario apreciable. Un tejido tal como riñón, en el que la expresión de HER2/neu es especialmente notable, no ha sufrido ningún efecto secundario.

Además, se han descubierto efectos terapéuticos favorables para terapias antitumorales que se dirigen a receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); Erbitux (ImClone). El EGFR también se expresa en numerosos tejidos normales. Ha habido efectos secundarios muy limitados en tejidos normales después del uso de productos terapéuticos anti EGFR. Un efecto secundario general que se produce con el tratamiento con EGFR es una erupción cutánea grave observada en el 100 % de los pacientes que se someten a tratamiento.

Por lo tanto, la expresión de una proteína diana en tejido normal, incluso normal vital, no contrarresta la utilidad de un agente de dirección para la proteína como un producto terapéutico para ciertos tumores en los que también se sobreexpresa la proteína. Por ejemplo, la expresión en órganos vitales no es por sí misma perjudicial. Además, pueden retirarse órganos considerados prescindibles, tales como la próstata y el ovario, sin afectar a la mortalidad. Finalmente, algunos órganos vitales no se ven afectados por expresión en órganos normales debido a un inmunoprivilegio. Los órganos inmunoprivilegiados son órganos que están protegidos de la sangre por una barrera hematoorgánica y por lo tanto no son accesibles a la inmunoterapia. Son ejemplos de órganos inmunoprivilegiados el cerebro y el testículo.

En consecuencia, los enfoques terapéuticos que inhiben la actividad de una proteína PSCA son útiles para pacientes que padecen un cáncer que expresa PSCA. Estos enfoques terapéuticos generalmente se clasifican en tres clases. La primera clase modula la función de PSCA en lo que respecta a su relación con el crecimiento de células tumorales que conduce a la inhibición o retardo del crecimiento de células tumorales o que induce su destrucción. La segunda clase comprende diversos métodos para inhibir la unión o asociación de una proteína PSCA con su compañero de unión o con otras proteínas. La tercera clase comprende diversos métodos para inhibir la transcripción de un gen de PSCA o traducción de ARNm de PSCA.

X.A.) Vacunas Anti Neoplásicas

Se desvelan en el presente documento vacunas que comprenden una proteína relacionada con PSCA o ácido nucleico relacionado con PSCA. A la vista de la expresión de PSCA, las vacunas de cáncer previenen y/o tratan cánceres que expresan PSCA con efectos mínimos o nulos en tejidos no diana. El uso de un antígeno tumoral en una vacuna que genera respuestas inmunitarias humorales mediadas por células como terapia antineoplásica se

conoce bien en la técnica y se ha empleado en cáncer de próstata usando PSMA humano e inmunógenos de PAP de roedor (Hodge *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 63: 231-237; Fong *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 159: 3113-3117).

Dichos métodos pueden practicarse fácilmente empleando una proteína relacionada con PSCA o una molécula de ácido nucleico que codifica PSCA y vectores recombinantes capaces de expresar y presentar el inmunógeno de PSCA (que normalmente comprende varios epítomos de linfocitos T o anticuerpo). Los expertos en la materia entienden que se conocen en la técnica una amplia diversidad de sistemas de vacuna para suministro de epítomos inmunorreactivos (véase, por ejemplo, Heryln *et al.*, *Ann Med* feb 1999 31(1): 66-78; Maruyama *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* jun 2000 49(3): 123-32). Brevemente, dichos métodos para generar una respuesta inmunitaria (por ejemplo mediada por células y/o humoral) en un mamífero, comprenden las etapas de: exponer el sistema inmunitario del mamífero a un epítomo inmunorreactivo (por ejemplo un epítomo presente en una proteína PSCA mostrado en la Figura 1 o análogo u homólogo del mismo) de modo que el mamífero genere una respuesta inmunitaria que es específica para ese epítomo (por ejemplo genera anticuerpos que reconocen específicamente ese epítomo).

La proteína PSCA completa, regiones inmunogénicas o epítomos de la misma pueden combinarse y suministrarse por diversos medios. Dichas composiciones de vacuna pueden incluir, por ejemplo, lipopéptidos (por ejemplo, Vitiello, A. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95: 341, 1995), composiciones peptídicas encapsuladas en microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) ("PLG") (véase, por ejemplo, Eldridge, *et al.*, *Molec. Immunol.* 28: 287-294, 1991; Alonso *et al.*, *Vaccine* 12: 299-306, 1994; Jones *et al.*, *Vaccine* 13: 675-681, 1995), composiciones peptídicas contenidas en complejos inmunoestimulantes (ISCOM) (véase, por ejemplo, Takahashi *et al.*, *Nature* 344: 873-875, 1990; Hu *et al.*, *Clin Exp Immunol.* 113: 235-243, 1998), sistemas de múltiples péptidos antigénicos (MAP) (véase por ejemplo Tam, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85: 5409-5413, 1988; Tam, J. P., *J. Immunol. Methods* 196: 17-32, 1996), péptidos formulados como péptidos multivalentes; péptidos para su uso en sistemas de suministro balísticos, normalmente péptidos cristalizados, vectores de suministro viral (Perkus, M. E. *et al.*, En: *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 379, 1996; Chakrabarti, S. *et al.*, *Nature* 320: 535, 1986; Hu, S. L. *et al.*, *Nature* 320: 537, 1986; Kieny, M.-P. *et al.*, *AIDS Bio/Technology* 4: 790, 1986; Top, F. H. *et al.*, *J. Infect. Dis.* 124: 148, 1971; Chanda, P. K. *et al.*, *Virology* 175: 535, 1990), partículas de origen viral o sintético (por ejemplo, Kofler, N. *et al.*, *J. Immunol. Methods.* 192: 25, 1996; Eldridge, J. H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30: 16, 1993; Faló, L. D., Jr. *et al.*, *Nature Med.* 7: 649, 1995), adyuvantes (Warren, H. S., Vogel, F. R., y Chedid, L. A. *Annu. Rev. Immunol.* 4: 369, 1986; Gupta, R. K. *et al.*, *Vaccine* 11: 293, 1993), liposomas (Reddy, R. *et al.*, *J. Immunol.* 148: 1585, 1992; Rock, K. L., *Immunol. Today* 17: 131, 1996), o ADNc desnudo o absorbido en una partícula (Ulmer, J. B. *et al.*, *Science* 259: 1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A., y Webster, R. G., *Vaccine* 11: 957, 1993; Shiver, J. W. *et al.*, En: *Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 423, 1996; Cease, K. B., y Berzofsky, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* 12: 923, 1994 y Eldridge, J. H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30: 16, 1993). También pueden usarse tecnologías de suministro dirigidas a toxina, también conocidas como dirección mediada por receptor, tales como las de Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts).

En pacientes con cáncer asociado con PSCA, las composiciones de vacuna también pueden usarse junto con otros tratamientos usados para cáncer, por ejemplo, cirugía, quimioterapia, terapias farmacológicas, radioterapias, etc. incluyendo uso en combinación con adyuvantes inmunitarios tales como IL-2, IL-12, GM-CSF, y similares.

Vacunas celulares:

Los epítomos de CTL pueden determinarse usando algoritmos específicos para identificar péptidos dentro de la proteína PSCA que se unen con alelos de HLA correspondientes (véase por ejemplo, Tabla IV; Epimer™ y Epimatrix™, Universidad Brown (URL brown.edu/Re-search/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); y, BIMAS, (URL bimas.dcrf.nih.gov/; SYFPEITHI en URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/). Un inmunógeno de PSCA puede contener una o más secuencias de aminoácidos identificadas usando técnicas bien conocidas en este campo, tales como las secuencias mostradas en las Tablas V-XVIII y XXII-LI o un péptido de 8, 9, 10 u 11 aminoácidos especificados por un motivo/supermotivo de HLA de Clase I (por ejemplo, Tabla IV (A), Tabla IV (D), o Tabla IV (E)) y/o un péptido de al menos 9 aminoácidos que comprende un motivo/supermotivo de HLA de Clase II (por ejemplo, Tabla IV (B) o Tabla IV (C)). Como se aprecia en la técnica, el surco de unión de HLA de Clase I está esencialmente cerrado de modo que solamente péptidos de un intervalo de tamaños particular puedan caber en el surco y unirse, generalmente los epítomos de HLA de Clase I son de 8, 9, 10 u 11 aminoácidos de longitud. Por el contrario, el surco de unión de HLA de Clase II está esencialmente abierto; por lo tanto puede unirse un péptido de aproximadamente 9 o más aminoácidos con una molécula de HLA de Clase II. Debido a las diferencias del surco de unión entre HLA de Clase I y II, los motivos de HLA de Clase I son específicos de longitud, es decir, la posición dos de un motivo de Clase I es el segundo aminoácido en una dirección amino a carboxilo del péptido. Las posiciones de aminoácidos en un motivo de Clase II son solamente relativas entre sí, no al péptido general, es decir, pueden unirse aminoácidos adicionales con los extremos amino y/o carboxilo terminales de una secuencia portadora de motivos. Los epítomos de HLA de Clase II son con frecuencia de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud, o de más de 25 aminoácidos.

Se conocen en la técnica una amplia diversidad de métodos para generar una respuesta inmunitaria en un mamífero (por ejemplo como la primera etapa en la generación de hibridomas). Los métodos para generar una respuesta

inmunitaria en un mamífero comprenden exponer el sistema inmunitario del mamífero a un epítipo inmunogénico en una proteína (por ejemplo una proteína PSCA) de modo que se genere una respuesta inmunitaria. Una realización típica consiste en un método para generar una respuesta inmunitaria a PSCA en un hospedador, poniendo en contacto el hospedador con una cantidad suficiente de al menos un linfocito B de PSCA o epítipo de linfocito T citotóxico o análogo del mismo; y al menos un intervalo periódico que vuelve a poner en contacto a continuación el hospedador con el linfocito B de PSCA o epítipo de linfocito T citotóxico o análogo del mismo. Una realización específica consiste en un método para generar una respuesta inmunitaria contra una proteína relacionada con PSCA o un péptido multiepitópico artificial que comprende: administrar el inmunógeno de PSCA (por ejemplo una proteína PSCA o un fragmento peptídico de la misma, una proteína de fusión de PSCA o análogo etc.) en una preparación de vacuna a un ser humano u otro mamífero. Normalmente, dichas preparaciones de vacuna contienen además un adyuvante adecuado (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 6.146.635) o un epítipo auxiliar universal tal como péptido PADRETM (Epimmune Inc., San Diego, CA; véase, por ejemplo, Alexander *et al.*, J. Immunol. 2000 164(3); 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, Immunity 1994 1(9): 751-761 y Alexander *et al.*, Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92). Un método alternativo comprende generar una respuesta inmunitaria en un individuo contra un inmunógeno de PSCA: administrando *in vivo* al músculo o la piel del cuerpo del individuo una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un inmunógeno de PSCA, la secuencia de ADN unida operativamente con secuencias reguladoras que controlan la expresión de la secuencia de ADN; en el que la molécula de ADN se capta por células, la secuencia de ADN se expresa en las células y se genera una respuesta inmunitaria contra el inmunógeno (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.962.428). Opcionalmente también se administra un facilitador de vacuna genética tal como lípidos aniónicos; saponinas; lectinas; compuestos estrógenos; alquilos inferiores hidroxilados; dimetil sulfóxido; y urea. Además, puede administrarse un anticuerpo antiidiotípico que imita PSCA, para generar una respuesta al antígeno diana.

Vacunas de ácido nucleico:

Las composiciones de vacuna desveladas en el presente documento incluyen modalidades mediadas por ácido nucleico. Puede administrarse a un paciente ADN o ARN que codifica proteína o proteínas de la invención. Pueden emplearse métodos de inmunización genética para generar respuestas inmunitarias humorales y celulares profilácticas o terapéuticas dirigidas contra células cancerosas que expresan PSCA. Pueden inyectarse construcciones que comprenden ADN que codifica una proteína/inmunógeno relacionado con PSCA y secuencias reguladoras apropiadas directamente en el músculo o la piel de un individuo, de modo que las células del músculo o la piel capten la construcción y expresen la proteína/el inmunógeno de PSCA codificado. Como alternativa, una vacuna comprende una proteína relacionada con PSCA. La expresión del inmunógeno de proteína relacionada con PSCA da como resultado la generación de inmunidad humoral y celular profiláctica o terapéutica contra células que portan una proteína PSCA. Pueden usarse diversas técnicas de inmunización genética profilácticas y terapéuticas conocidas en este campo (para una revisión, véase información y referencias publicadas en la dirección de Internet genweb.com). Se describe el suministro basado en ácidos nucleicos, por ejemplo, en Wolff *et al.*, Science 247: 1465 (1990) así como en las Patentes de Estados Unidos N° 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; documento WO 98/04720. Los ejemplos de tecnologías de suministro basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", suministro facilitado (bupivacaína, polímeros, mediado por péptidos), complejos de lípidos catiónicos y suministro mediado por partículas ("pistola génica") o mediado por presión (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.922.687).

Para fines de inmunización terapéuticos o profilácticos, las proteínas desveladas en el presente documento pueden expresarse mediante vectores virales o bacterianos. Los diversos sistemas de suministro de genes virales que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, vaccinia, viruela aviar, viruela del canario, adenovirus, gripe, poliovirus, virus adenoasociado, lentivirus y virus sindbis (véase, por ejemplo, Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663; Tsang *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 87: 982-990 (1995)). También pueden emplearse sistemas de suministro no viral introduciendo ADN desnudo que codifica una proteína relacionada con PSCA en el paciente (por ejemplo, por vía intramuscular o por vía intradérmica) para inducir una respuesta antitumoral.

Se usa el virus vaccinia, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótidos que codifican los péptidos desvelados en el presente documento. Tras la introducción en un hospedador, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido inmunogénico de proteína, e induce de este modo una respuesta inmunitaria del hospedador. Se describen vectores y métodos de vaccinia útiles en protocolos de inmunización, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 4.722.848. Otro vector es BCG (Bacilo Calmette Guerin). Se describen vectores BCG en Stover *et al.*, Nature 351: 456-460 (1991). Una amplia diversidad de otros vectores útiles para administración terapéutica o inmunización de los péptidos, por ejemplo vectores de adenovirus y de virus adenoasociados, vectores retrovirales, vectores de *Salmonella typhi*, vectores de toxina de carbunco detoxificada y similares, resultarán evidentes para los expertos en la materia a partir de la descripción del presente documento.

Por lo tanto, se usan sistemas de suministro génico para suministrar una molécula de ácido nucleico relacionada con PSCA. Puede emplearse el ADNc de PSCA humano de longitud completa. En otro método, se emplean moléculas de ácido nucleico de PSCA que codifican linfocitos T citotóxicos específicos (CTL) y/o epítipos de anticuerpo.

Vacunas ex vivo

Pueden emplearse también diversas estrategias *ex vivo* para generar una respuesta inmunitaria. Un enfoque implica el uso de células presentadoras de antígenos (APC) tales como células dendríticas (DC) para presentar el antígeno PSCA al sistema inmunitario de un paciente. Las células dendríticas expresan moléculas del MHC de clase I y II, coestimulador de B7 e IL-12, y son por lo tanto células presentadoras de antígenos altamente especializadas. En cáncer de próstata, se están usando células dendríticas autólogas pulsadas con péptidos del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) en un ensayo clínico de Fase I para estimular los sistemas inmunitarios de los pacientes con cáncer de próstata (Tjoa *et al.*, 1996, *Prostate* 28: 65-69; Murphy *et al.*, 1996, *Prostate* 29: 371-380). Por lo tanto, pueden usarse células dendríticas para presentar péptidos de PSCA a linfocitos T en el contexto de moléculas del MHC de clase I o II. En un método, se pulsan células dendríticas autólogas con péptidos de PSCA capaces de unirse con moléculas del MHC de clase I y/o clase II. En otro método, se pulsan células dendríticas con la proteína PSCA completa. Otra estrategia más implica la modificación técnica de la sobreexpresión de un gen de PSCA en células dendríticas usando diversos vectores de implementación conocidos en la técnica, tales como adenovirus (Arthur *et al.*, 1997, *Cancer Gene Ther.* 4: 17-25), retrovirus (Henderson *et al.*, 1996, *Cancer Res.* 56:3763-3770), lentivirus, virus adenoasociado, transfección de ADN (Ribas *et al.*, 1997, *Cancer Res.* 57: 2865-2869), o transfección de ARN derivado de tumor (Ashley *et al.*, 1997, *J. Exp. Med.* 186: 1177-1182). También pueden modificarse técnicamente células que expresan PSCA para expresar moduladores inmunitarios, tales como GM-CSF, y usarse como agentes de inmunización.

X.B.) PSCA como una Diana para Terapia basada en Anticuerpos

PSCA es una diana atractiva para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpos. Se conocen en la técnica varias estrategias de anticuerpos para dirigir moléculas tanto extracelulares como intracelulares (véase, por ejemplo, destrucción mediada por complemento y ADCC así como el uso de intracuerpos). Debido a que PSCA se expresa por células cancerosas de diversos linajes en relación con células normales correspondientes, se prepara la administración sistémica de composiciones inmunorreactivas a PSCA que muestran excelente sensibilidad sin efectos tóxicos, no específicos y/o no de diana uniendo la composición inmunorreactiva con órganos y tejidos no diana. Los anticuerpos específicamente reactivos con dominios de PCA son útiles para tratar cánceres que expresan PSCA de forma sistémica, bien como conjugados con una toxina o agente terapéutico o bien como anticuerpos desnudos capaces de inhibir la proliferación o función celular.

Pueden introducirse anticuerpos de PSCA en un paciente de modo que el anticuerpo se una con PSCA y module una función, tal como una interacción con un compañero de unión, y en consecuencia medie en la destrucción de las células tumorales y/o inhiba el crecimiento de las células tumorales. Los mecanismos por los que dichos anticuerpos ejercen un efecto terapéutico pueden incluir citólisis mediada por complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, modulación de la función fisiológica de PSCA, inhibición de la unión de ligando o rutas de transducción de señales, modulación de la diferenciación de células tumorales, alteración de perfiles de factores de angiogénesis tumoral y/o apoptosis. Los ejemplos incluyen Rituxan® para Linfoma No de Hodgkin, Herceptin® para cáncer de mama metastásico y Erbitux® para cáncer colorrectal.

Los expertos en la materia entienden que los anticuerpos pueden usarse para dirigirse específicamente a y unirse con moléculas inmunogénicas tales como una región inmunogénica de una secuencia de PSCA mostrada en la Figura 1. Además, los expertos en la materia entienden que es rutinario conjugar anticuerpos con agentes citotóxicos (véase, por ejemplo, Slevers *et al.* *Blood* 93: 11 3678-3684 (1 de junio de 1999)). Cuando se suministran agentes citotóxicos y/o terapéuticos directamente a células, tal como conjugándolos con anticuerpos específicos para una molécula expresada por esa célula (por ejemplo, PSCA), el agente citotóxico ejercerá su efecto biológico conocido (es decir citotoxicidad) en esas células.

Se conocen en la técnica una amplia diversidad de composiciones y métodos para usar conjugados de anticuerpo-agente citotóxico para destruir células. En el contexto de cánceres, los métodos típicos implican administrar a un animal que tenga un tumor una cantidad biológicamente eficaz de un conjugado que comprende un agente citotóxico y/o terapéutico seleccionado unido a un agente de dirección (por ejemplo un anticuerpo anti PSCA) que se une con un marcador (por ejemplo PSCA) expresado, accesible a la unión o localizado en las superficies celulares. Una realización típica es un método para suministrar un agente citotóxico y/o terapéutico a una célula que expresa PSCA, que comprende conjugar el agente citotóxico con un anticuerpo que se une inmunoespecíficamente con un epítipo de PSCA y exponer la célula al conjugado de anticuerpo-agente. Otra realización ilustrativa es un método para tratar a un individuo que se sospecha que padece cáncer metastatizado, que comprende una etapa de administrar por vía parenteral a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico y/o terapéutico.

Pueden realizarse inmunoterapia de cáncer usando anticuerpos anti PSCA de acuerdo con diversos enfoques que se han empleado con éxito en el tratamiento de otros tipos de cáncer, incluyendo pero sin limitación cáncer de colon (Arlen *et al.*, 1998, *Crit. Rev. Immunol.* 18: 133-138), mieloma múltiple (Ozaki *et al.*, 1997, *Blood* 90: 3179-3186), Tsunenari *et al.*, 1997, *Blood* 90: 2437-2444), cáncer gástrico (Kasprzyk *et al.*, 1992, *Cancer Res.* 52: 2771-2776), linfoma de linfocitos B (Funakoshi *et al.*, 1996, *J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol.* 19: 93-101), leucemia

(Zhong *et al.*, 1996, Leuk. Res. 20: 581-589), cáncer colorrectal (Moun *et al.*, 1994, Cancer Res. 54: 6160-6166; Velders *et al.*, 1995, Cancer Res. 55: 4398-4403), y cáncer de mama (Shepard *et al.*, 1991, J. Clin. Immunol. 11: 117-127). Algunos enfoques terapéuticos implican la conjugación de anticuerpo desnudo con una toxina o un radioisótopo, tal como la conjugación de Y⁹¹ o I¹³¹ con anticuerpos anti CD20 (por ejemplo, ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp. o BexxarTM, Coulter Pharmaceuticals) respectivamente, aunque otros implican la coadministración de anticuerpos y otros agentes terapéuticos, tales como HerceptinTM (trastuzumab) con paclitaxel (Genentech, Inc.). Los anticuerpos pueden conjugarse con un agente terapéutico. Para tratar el cáncer de próstata, por ejemplo, pueden administrarse anticuerpos de PSCA junto con radiación, quimioterapia o ablación hormonal. Además, los anticuerpos pueden conjugarse con una toxina tal como caliqueamicina (por ejemplo, MylotargTM, Wyeth-Ayerst, Madison, NJ, un anticuerpo kappa IgG₄ humanizado recombinante conjugado con el antibiótico antitumoral caliqueamicina) o un maitansinoide (por ejemplo, el Profármaco Activado por Tumor basado en taxano, TAP, plataforma, ImmunoGen, Cambridge, MA, véase también por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.416.064) o Auristatina E (Nat Biotechnol. Jul 2003; 21(7): 778-84. (Seattle Genetics)).

Aunque la terapia de anticuerpo de PSCA es útil para todos los estadios del cáncer, la terapia de anticuerpo puede ser particularmente apropiada en cánceres avanzados o metastásicos. El tratamiento con la terapia de anticuerpo de la invención se indica para pacientes que han recibido uno o más ciclos de quimioterapia. Como alternativa, la terapia de anticuerpo de la invención se combina con un régimen quimioterapéutico o de radiación para pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico. Adicionalmente, la terapia de anticuerpos puede permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia conjunta, particularmente para pacientes que no toleran la toxicidad del agente quimioterapéutico muy bien. Fan *et al.* (Cancer Res. 53: 4637-4642, 1993), Prewett *et al.* (International J. of Onco. 9: 217-224, 1996), y Hancock *et al.* (Cancer Res. 51: 4575-4580, 1991) describen el uso de diversos anticuerpos junto con agentes quimioterapéuticos.

Los pacientes con cáncer pueden evaluarse con respecto a la presencia y nivel de expresión de PSCA, preferentemente usando evaluaciones inmunohistoquímicas de tejido tumoral, captura de imágenes de PSCA cuantitativa, u otras técnicas que indiquen con fiabilidad la presencia y el grado de expresión de PSCA. Se prefiere para este fin el análisis inmunohistoquímico de biopsias tumorales o muestras de ensayo quirúrgicas. Se conocen bien en la técnica métodos para análisis inmunohistoquímico de tejidos tumorales.

Los anticuerpos monoclonales anti PSCA que tratan la próstata y otros cánceres incluyen los que inician una respuesta humanitaria potente contra el tumor o los que son directamente citotóxicos. A este respecto, los anticuerpos monoclonales anti PSCA (MAb) pueden inducir lisis de células tumorales por mecanismos mediados por complemento o de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), ambos de los cuales requieren una parte Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para interacción con sitios receptores de Fc de células efectoras en proteínas de acoplamiento. Además, los MAb anti PSCA que ejercen un efecto biológico directo en el crecimiento tumoral son útiles para tratar cánceres que expresan PSCA. Los mecanismos por los que los MAb directamente citotóxicos actúan incluyen: inhibición del crecimiento celular, modulación de la diferenciación celular, modulación de los perfiles de factor de angiogénesis tumoral y la inducción de apoptosis. El mecanismo o los mecanismos por los que un MAb anti PSCA particular ejerce un efecto antitumoral se evalúan usando cualquier variedad de ensayos *in vitro* que evalúen la muerte celular tales como ADCC, ADMMC, lisis celular mediada por complemento y así sucesivamente, como se conoce en general en la técnica.

En algunos pacientes, el uso de anticuerpos monoclonales murinos u otros no humanos, o MAb quiméricos humanos/de ratón pueden inducir respuestas inmunitarias de moderadas a fuertes contra el anticuerpo no humano. Esto puede dar como resultado la eliminación del anticuerpo de la circulación y eficacia reducida. En los casos más graves, dicha respuesta inmunitaria puede conducir a la formación extensiva de complejos inmunitarios que, potencialmente, pueden provocar insuficiencia renal. En consecuencia, son anticuerpos monoclonales preferidos usados en los métodos terapéuticos de la invención los que son completamente humanos o son humanizados y que se unen específicamente con el antígeno PSCA diana con alta afinidad pero muestran antigenicidad baja o nula en el paciente.

Los usos terapéuticos de la invención contemplan la administración de MAb anti PSCA individuales mientras que otros usos desvelados en el presente documento contemplan combinaciones, o cócteles, de diferentes MAb. Dichos cócteles de MAb pueden tener ciertas ventajas en la medida en que contienen MAb que se dirigen a epítopos diferentes, aprovechan diferentes mecanismos efectoros o combinan MAb directamente citotóxicos con MAb que se basan en la funcionalidad efectora inmunitaria. Dichos MAb en combinación pueden mostrar efectos terapéuticos sinérgicos. Además, pueden administrarse MAb anti PSCA conjuntamente con otras modalidades terapéuticas, incluyendo pero sin limitación diversos agentes quimioterapéuticos, bloqueadores de andrógenos, moduladores inmunitarios (por ejemplo IL-2, GM-CSF), cirugía o radiación. Los MAb anti PSCA se administran en su forma "desnuda" o no conjugada, o pueden tener un agente o agentes terapéuticos conjugados con ellos.

Se administran formulaciones de anticuerpo anti PSCA mediante cualquier vía capaz de suministrar los anticuerpos a una célula tumoral. Las vías de administración incluyen, pero sin limitación, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica y similares. El tratamiento implica en general administración repetida de la preparación de anticuerpo anti PSCA, mediante una vía aceptable de administración tal como inyección intravenosa

(IV), normalmente una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 o 25 mg/kg de peso corporal. En general, las dosis en el intervalo de 10-1000 mg de MAb por semana son eficaces y se toleran bien.

5 Basándose en la experiencia clínica con el MAb Herceptin™ en el tratamiento de cáncer de mama metastásico, una
 10 dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente IV, seguido de dosis semanales
 de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de MAb anti PSCA representa un régimen de dosificación
 aceptable. Preferentemente, la dosis de carga inicial se administra como una infusión de 90 minutos o más larga. La
 15 dosis de mantenimiento periódica se administra como una infusión de 30 minutos o más larga, siempre que la dosis
 inicial se tolere bien. Como se aprecia por los expertos en la materia, diversos factores pueden influir en el régimen
 de dosis ideal en un caso particular. Dichos factores incluyen, por ejemplo, la afinidad de unión y la semivida de los
 Ab o MAb usados, el grado de expresión de PSCA en el paciente, el alcance de antígeno PSCA desprendido en
 circulación, el nivel de concentración de anticuerpos de estado estacionario deseado, la frecuencia de tratamiento y
 la influencia de agentes quimioterapéuticos u otros usados en combinación con el método de tratamiento así como el
 estado de salud de un paciente particular.

Opcionalmente, los pacientes deberían evaluarse con respecto a los niveles de PSCA en una muestra dada (por
 ejemplo, los niveles de antígeno PSCA en circulación y/o células que expresan PSCA) para ayudar en la
 20 determinación del régimen de dosificación más eficaz, etc. Dichas evaluaciones también se usan para fines de
 control mediante terapia, y son útiles para calibrar el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros
 parámetros (por ejemplo, citología de orina y/o niveles de InmunoCyt en terapia de cáncer de vejiga, o por analogía,
 niveles de PSA en suero en terapia de cáncer de próstata).

También pueden usarse anticuerpos anti PSCA antiidiotípicos en terapia antineoplásica como una vacuna para
 25 inducir una respuesta inmunitaria a células que expresan una proteína relacionada con PSCA. En particular, la
 generación de anticuerpos antiidiotípicos se conoce bien en la técnica; esta metodología puede adaptarse fácilmente
 para generar anticuerpos anti PSCA antiidiotípicos que imitan un epítipo en una proteína relacionada con PSCA
 (véase, por ejemplo, Wagner *et al.*, 1997, *Hybridoma* 16: 33-40; Foon *et al.*, 1995, *J. Clin. Invest.* 96: 334-342; Herlyn
 30 *et al.*, 1996, *Cancer Immunol. Immunother.* 43: 65-76). Dicho anticuerpo antiidiotípico puede usarse en estrategias
 de vacunas de cáncer.

Un objeto de la presente invención es proporcionar anticuerpos de PSCA, que inhiben o retardan el crecimiento de
 células tumorales que expresan PSCA. Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar métodos que
 35 inhiban la angiogénesis y otras funciones biológicas y de este modo reduzcan el crecimiento tumoral en mamíferos,
 preferentemente en seres humanos, usando dichos anticuerpos de PSCA, y en particular usando dichos anticuerpos
 de PSCA combinados con radiación y quimioterapia o ambos.

En una realización, hay sinergia cuando los tumores, incluyendo tumores humanos, se tratan con anticuerpos de
 40 PSCA junto con agentes quimioterapéuticos o radiación o combinaciones de los mismos. En otras palabras, la
 inhibición del crecimiento tumoral por un anticuerpo de PSCA se potencia más de lo esperado cuando se combina
 con agentes quimioterapéuticos o radiación o combinaciones de los mismos. Puede mostrarse sinergia, por ejemplo,
 por mayor inhibición del crecimiento tumoral con tratamiento combinado de lo que se esperaría de un tratamiento
 solamente de anticuerpos de PSCA o el efecto aditivo del tratamiento con un anticuerpo de PSCA y un agente
 45 quimioterapéutico o radiación. Preferentemente, se demuestra sinergia por remisión del cáncer cuando no se espera
 remisión de tratamiento bien de un anticuerpo de PSCA desnudo o bien con tratamiento usando una combinación
 aditiva de un anticuerpo de PSCA y un agente quimioterapéutico o radiación.

El método para inhibir el crecimiento de células tumorales usando un anticuerpo de PSCA y una combinación de
 50 quimioterapia o radiación o ambos comprende administrar el anticuerpo de PSCA antes, durante o después
 de comenzar la quimioterapia o radioterapia, así como cualquier combinación de los mismos (es decir antes y durante,
 antes y después, durante y después o antes, durante y después de comenzar la quimioterapia y/o radioterapia). Por
 ejemplo, el anticuerpo de PSCA se administra normalmente entre 1 y 60 días, preferentemente entre 3 y 40 días,
 más preferentemente entre 5 y 12 días antes de comenzar la radioterapia y/o quimioterapia. Sin embargo,
 dependiendo del protocolo de tratamiento y las necesidades específicas del paciente, el método se realiza de
 55 manera que proporcione el tratamiento más eficaz y en última instancia prolongue la vida del paciente.

La administración de agentes quimioterapéuticos puede conseguirse de diversas maneras incluyendo de forma
 sistémica por las vías parenteral y entérica. En una realización, el anticuerpo de PSCA y el agente quimioterapéutico
 60 se administran como moléculas separadas. En otra realización, el anticuerpo de PSCA se une, por ejemplo, por
 conjugación, con un agente quimioterapéutico (Véase el Ejemplo titulado "Ensayos Clínicos para el Tratamiento y
 Diagnóstico de Carcinomas Humanos Mediante el Uso de Anticuerpos Humanos Anti PSCA *in vivo*") y (Véase
 sección titulada "PSCA como una Diana para Terapia basada en Anticuerpos"). Los ejemplos particulares de
 65 agentes quimioterapéuticos o quimioterapia incluyen cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomina, mecloretamina
 (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BC-NU), lomustina (CCNU), doxorubicina
 (adriamicina), daunorrubicina, procarbina, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo,
 vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleuquina, asparaginasa, busulfán,

carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxiaurea, ifosfamida, interferón alfa, leuprolide, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, taxol y combinaciones de los mismos.

5 La fuente de radiación, usada en combinación con un anticuerpo de PSCA, puede ser externa o interna al paciente que se trata. Cuando la fuente es externa al paciente, la terapia se conoce como terapia de radiación de haz externo (EBRT). Cuando la fuente de radiación es interna al paciente, el tratamiento se denomina braquiterapia (BT).

10 La radiación se administra de acuerdo con técnicas convencionales bien conocidas usando equipamiento convencional fabricado para este fin, tal como AECL Theratron y Varian Clinac. La dosis de radiación depende de numerosos factores como se conoce bien en la técnica. Dichos factores incluyen el órgano que se trata, los órganos sanos en la ruta de la radiación que podrían verse afectados inadvertidamente de forma adversa, la tolerancia del paciente para radioterapia y el área del cuerpo que necesite tratamiento. La dosis será normalmente de entre 1 y 15 100 Gy y más particularmente entre 2 y 80 Gy. Algunas dosis que se han indicado incluyen 35 Gy para la médula espinal, 15 Gy para los riñones, 20 Gy para el hígado y 65-80 Gy para la próstata. Debería enfatizarse, sin embargo, que la invención no se limita a ninguna dosis particular. La dosis se determinará por el médico tratante de acuerdo con los factores particulares en una situación dada, incluyendo los factores mencionados anteriormente.

20 La distancia entre la fuente de la radiación externa y el punto de entrada en el paciente puede ser cualquier distancia que representa un equilibrio aceptable entre destrucción de células diana y minimización de efectos secundarios. Normalmente, la fuente de radiación externa está entre 70 y 100 cm del punto de entrada en el paciente.

25 La braquiterapia se lleva a cabo en general colocando la fuente de radiación en el paciente. Normalmente, la fuente de radiación se coloca a aproximadamente 0-3 cm del tejido que se trate. Las técnicas conocidas incluyen braquiterapia intersticial, intercavitaria y de superficie. Las semillas radiactivas pueden implantarse de forma permanente o temporal. Algunos átomos radiactivos típicos que se han usado en implantes permanentes incluyen yodo 125 y radón. Algunos átomos radiactivos típicos que se han usado en implantes temporales incluyen radio, cesio 137 e iridio 192. Algunos átomos radiactivos adicionales que se han usado en braquiterapia incluyen americio 30 241 y oro 198. La dosis de radiación para braquiterapia puede ser la misma que se ha mencionado anteriormente para terapia de radiación de haz externo. Además de los factores mencionados anteriormente para determinar la dosis de radioterapia de haz externo, la naturaleza el átomo radiactivo usado también se tiene en cuenta para determinar la dosis de braquiterapia.

35 X.C.) PSCA como una Diana para Respuestas Inmunitarias Celulares

Se desvelan además en el presente documento vacunas y métodos para preparar vacunas que contienen una cantidad inmunogénicamente eficaz de uno o más péptidos de unión a HLA como se describe en el presente documento. Además, las vacunas de acuerdo con las divulgaciones del presente documento abarcan composiciones 40 de uno o más de los péptidos desvelados. Un péptido puede estar presente en una vacuna individualmente. Como alternativa, el péptido puede existir como un homopolímero que comprende múltiples copias del mismo péptido, o como un heteropolímero de diversos péptidos. Los polímeros tienen la ventaja de relación inmunológica aumentada y, cuando se usen diferentes epítopos peptídicos para componer el polímero, la capacidad adicional de inducir anticuerpos y/o CTL que reaccionen con diferentes determinantes antigénicos del organismo patógeno o péptido 45 relacionado con tumor al que se dirige una respuesta inmunitaria. La composición puede ser una región de origen natural de un antígeno o puede prepararse, por ejemplo, de forma recombinante o por síntesis química.

Se conocen bien en la técnica vehículos que pueden usarse con vacunas desveladas en el presente documento, e incluyen, por ejemplo, tiroglobulina, albúminas tales como albúmina de suero humano, toxoide del tétanos, 50 poliaminoácidos tales como poli L-lisina, poli L-ácido glutámico, gripe, proteína del núcleo del virus de hepatitis B y similares. Las vacunas pueden contener un diluyente fisiológicamente tolerable (es decir, aceptable) tal como agua, o solución salina, preferentemente solución salina tamponada con fosfato. Las vacunas también incluyen normalmente un adyuvante. Adyuvantes tales como adyuvante incompleto de Freund, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio o alumbre son ejemplos de materiales bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, como se desvela 55 en el presente documento, las respuestas de CTL pueden iniciarse conjugando péptidos de la invención con lípidos tales como tripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina (P₃CSS). Además, se ha descubierto que un adyuvante tal como oligonucleótidos que contienen citosina-guanina fosforotiolada (CpG) sintéticos aumentan las respuestas de CTL de 10 a 100 veces (véase, por ejemplo, Davila y Celis, J. Immunol. 165: 539-547 (2000)).

60 Tras la inmunización con una composición peptídica, mediante las vías de inyección, aerosol, oral, transdérmica, transmucosa, intrapleural, intratecal u otras adecuadas, el sistema inmunitario del hospedador responde a la vacuna produciendo grandes cantidades de CTL y/o HTL específicas para el antígeno deseado. En consecuencia, el hospedador se hace al menos parcialmente inmune al desarrollo posterior de células que expresan o sobreexpresan antígeno PSCA, o deriva al menos algún beneficio terapéutico cuando el antígeno estaba asociado a tumor.

65

En algunos ejemplos, puede ser deseable combinar los componentes peptídicos de clase I con componentes que inducen o facilitan respuestas de anticuerpo neutralizador y/o linfocito T auxiliar dirigidas al antígeno diana. Se desvela en el presente documento una composición que comprende epítomos de clase I y clase II. Un ejemplo alternativo de dicha composición comprende un epítomo de clase I y/o de clase II, junto con un epítomo de HTL de reacción cruzada tal como la molécula PADRE™ (Epimmune, San Diego, CA) (descrita por ejemplo en la Patente de Estados Unidos Número 5.736.142).

Una vacuna también puede incluir células presentadora de antígeno (APC), tales como células dendríticas (DC), como un vehículo para presentar péptidos de la invención. Las composiciones de vacuna pueden crearse *in vitro*, después de movilización y recogida de células dendríticas, de modo que la carga de células dendríticas se produce *in vitro*. Por ejemplo, las células dendríticas se transfectan, por ejemplo, con un minigén de acuerdo con la invención, o se pulsan con péptidos. La célula dendrítica puede después administrarse a un paciente para inducir respuestas inmunitarias *in vivo*. Las composiciones de vacuna, bien basadas en ADN o bien basadas en péptidos, también pueden administrarse *in vivo* en combinación con movilización de células dendríticas de modo que la carga de células dendríticas se produce *in vivo*.

Preferentemente, se utilizan los siguientes principios cuando se seleccione una serie de epítomos para inclusión en una composición poliepitópica para su uso en una vacuna, o para seleccionar epítomos discretos para incluir en una vacuna y/o para codificar por ácidos nucleicos tales como un minigén. Se prefiere que cada uno de los siguientes principios esté equilibrado para realizar la selección. Los múltiples epítomos para incorporar en una composición de vacuna dada pueden ser, pero no es necesario que sean, contiguos en secuencia en el antígeno nativo del que derivan los epítomos.

1.) Se seleccionan epítomos que, tras su administración, imitan a las respuestas inmunitarias que se ha observado que están correlacionadas con la eliminación de tumores. Para HLA de Clase I esto incluye 3-4 epítomos que vienen de al menos un antígeno asociado a tumor (TAA). Para HLA de Clase II se emplea una lógica similar; de nuevo se seleccionan 3-4 epítomos de al menos un TAA (véase, por ejemplo, Rosenberg *et al.*, Science 278: 1447-1450). Pueden usarse epítomos de un TAA en combinación con epítomos de uno o más TAA adicionales para producir una vacuna que se dirige a tumores con diversos patrones de expresión de TAA frecuentemente expresados.

2.) Se seleccionan epítomos que tienen la afinidad de unión requerida que se ha establecido que está correlacionada con la inmunogenicidad: para HLA de Clase I una CI_{50} de 500 nM o menos, con frecuencia 200 nM o menos; y para Clase II una CI_{50} de 1000 nM o menos.

3.) Se seleccionan péptidos portadores de supermotivo suficientes, o una serie suficiente de péptidos portadores de motivo específicos de alelo para proporcionar una cobertura de población amplia. Por ejemplo, es preferible tener al menos una cobertura de población del 80 %. Se puede emplear un análisis de Monte Carlo, una evaluación estadística conocida en la técnica para evaluar la amplitud, o redundancia, de la cobertura de población.

4.) Cuando se seleccionen epítomos de antígenos relacionados con cáncer es con frecuencia útil seleccionar análogos porque el paciente puede haber desarrollado tolerancia al epítomo nativo.

5.) Son particularmente relevantes epítomos denominados "epítomos anidados". Los epítomos anidados se producen cuando al menos dos epítomos solapan en una secuencia peptídica dada. Una secuencia peptídica anidada puede comprender epítomos de linfocitos B, HLA de clase I y/o HLA de clase II. Cuando se proporcionan epítomos anidados, un objetivo general es proporcionar el mayor número de epítomos por secuencia. Por lo tanto, un aspecto es evitar proporcionar un péptido que sea cualquiera más largo que el extremo amino terminal del epítomo amino terminal y el extremo carboxilo terminal del epítomo carboxilo terminal en el péptido. Cuando se proporciona una secuencia multiepitópica, tal como una secuencia que comprende epítomos anidados, es generalmente importante explorar la secuencia para asegurar que no tenga propiedades biológicas patológicas u otras deletéreas.

6.) Si se crea una proteína poliepitópica, o cuando se crea un minigén, un objetivo es generar el péptido más pequeño que abarque los epítomos de interés. Este principio es similar, si no igual que el empleado cuando se selecciona un péptido que comprende epítomos anidados. Sin embargo, con un péptido poliepitópico artificial, el objetivo de minimización de tamaño está equilibrado frente a la necesidad de integrar cualquier secuencia espaciadora entre epítomos en la proteína poliepitópica. Los restos de aminoácidos espaciadores pueden, por ejemplo, introducirse para evitar epítomos de unión (un epítomo reconocido por el sistema inmunitario, no presente en el antígeno diana, y creado solamente por la yuxtaposición artificial de epítomos) o para facilitar la escisión entre epítomos y de este modo potenciar la presentación de epítomos. En general deben evitarse los epítomos de unión porque el receptor puede generar una respuesta inmunitaria a ese epítomo no nativo. Es particularmente preocupante un epítomo de unión que sea un "epítomo dominante". Un epítomo dominante puede conducir a una respuesta tan potente que las respuestas inmunitarias a otros epítomos se reduzcan o supriman.

7.) Cuando las secuencias de múltiples variantes de la misma proteína diana están presentes, también pueden seleccionarse epítomos peptídicos potenciales basándose en su conservación. Por ejemplo, un criterio para la conservación puede definir que la secuencia completa de un péptido de unión a HLA de clase I o el núcleo de 9 unidades completo de un péptido de unión de clase II se conserve en un porcentaje designado de las secuencias evaluadas para un antígeno proteico específico.

X.C.1. Vacunas de Minigenes

Están disponibles varios enfoques diferentes que permiten el suministro simultáneo de múltiples epítomos. Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos desvelados en el presente documento son una realización particularmente útil de la invención. Los epítomos para inclusión en un minigén se seleccionan preferentemente de acuerdo con las directrices expuestas en la sección previa. Un medio preferido para administrar ácidos nucleicos que codifican los péptidos desvelados usa construcciones de minigenes que codifican un péptido que comprende uno o múltiples epítomos de la invención.

El uso de minigenes multiepitópicos se describe posteriormente y en Ishioka *et al.*, J. Immunol. 162: 3915-3925, 1999; An, L. y Whitton, J. L., J. Virol. 71: 2292, 1997; Thomson, S. A. *et al.*, J. Immunol. 157: 822, 1996; Whitton, J. L. *et al.*, J. Virol. 67: 348, 1993; Hanke, R. *et al.*, Vaccine 16: 426, 1998. Por ejemplo, puede obtenerse por ingeniería genética un plásmido de ADN multiepitópico que codifica PSCA derivado de epítomos portadores de motivo y/o supermotivo, el epítomo de linfocitos T auxiliares universal PADRE™ o múltiples epítomos de HTL de PSCA (véase por ejemplo, Tablas V-XVIII y XXII a LI) y una secuencia señal de translocación al retículo endoplásmico. Una vacuna también puede comprender epítomos que derivan de otros TAA.

La inmunogenicidad de un minigén multiepitópico puede confirmarse en ratones transgénicos para evaluar la magnitud de respuestas de inducción de CTL contra los epítomos ensayados. Además, la inmunogenicidad de epítomos codificados por ADN *in vivo* puede correlacionarse con las respuestas *in vitro* de líneas de CTL específicas contra células diana transfectadas con el plásmido de ADN. Por lo tanto, estos experimentos pueden mostrar que el minigén sirve tanto para: 1.) generar una respuesta de CTL como para 2.) que los CTL inducidos reconozcan células que expresen los epítomos codificados.

Por ejemplo, para crear una secuencia de ADN que codifique los epítomos seleccionados (minigén) para expresión en células humanas, las secuencias de aminoácidos de los epítomos pueden traducirse de forma inversa. Puede usarse una tabla de uso codónico humano para guiar la elección de codones para cada aminoácido. Estas secuencias de ADN que codifican epítomos pueden unirse directamente, de modo que cuando se traduzcan, se cree una secuencia polipeptídica continua. Para optimizar la expresión y/o inmunogenicidad, pueden incorporarse elementos adicionales en el diseño del minigén. Los ejemplos de secuencias de aminoácidos que pueden traducirse de forma inversa e incluirse en la secuencia del minigén incluyen: epítomos de HLA de clase I, epítomos de HLA de clase II, epítomos de anticuerpos, una secuencia señal de ubiquitinación, y/o una señal de dirección de retículo endoplásmico. Además, puede mejorarse la presentación de HLA de epítomos de CTL y HTL incluyendo secuencias flanqueantes sintéticas (por ejemplo de poli alanina) o de origen natural adyacentes a los epítomos de CTL o HTL; estos péptidos mayores que comprenden el epítomo o los epítomos están dentro del alcance de la invención.

La secuencia del minigén puede convertirse a ADN ensamblando oligonucleótidos que codifiquen las cadenas más y menos del minigén. Los oligonucleótidos solapantes (30-100 bases de longitud) pueden sintetizarse, fosforilarse, purificarse e hibridarse en condiciones apropiadas usando técnicas bien conocidas. Los extremos de los oligonucleótidos pueden unirse, por ejemplo, usando ADN ligasa T4. Este minigén sintético, que codifica el polipéptido epitópico, puede después clonarse en un vector de expresión deseado.

Se incluyen preferentemente secuencias reguladoras convencionales bien conocidas por los expertos en la materia en el vector para asegurar la expresión en las células diana. Son deseables varios elementos de vector: un promotor con un sitio de clonación cadena abajo para inserción del minigén; una señal de poliadenilación para terminación de la transcripción eficaz; un origen de replicación de *E. coli*; y un marcador seleccionable de *E. coli* (por ejemplo, resistencia a ampicilina o kanamicina). Pueden usarse numerosos promotores para este fin, por ejemplo, el promotor de citomegalovirus humano (hCMV). Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 5.580.859 y 5.589.466 para otras secuencias promotoras adecuadas.

Pueden desearse modificaciones de vectores adicionales para optimizar la expresión de minigenes e inmunogenicidad. En algunos casos, se requieren intrones para expresión génica eficaz, y podrían incorporarse uno o más intrones sintéticos o de origen natural en la región transcrita del minigén. La inclusión de secuencias de estabilización del ARNm y secuencias para replicación en células de mamífero también puede tenerse en cuenta para expresión de minigenes creciente.

Una vez que se ha seleccionado un vector de expresión, el minigén se clona en la región polienlazadora cadena abajo del promotor. Este plásmido se transforma en una cepa de *E. coli* apropiada, y se prepara ADN usando técnicas convencionales. La orientación y secuencia de ADN del minigén, así como los otros elementos incluidos en el vector, se confirman usando mapeo de restricción y análisis de secuencia de ADN. Las células bacterianas que albergan el plásmido correcto pueden almacenarse como un banco de células maestro y un banco de células de trabajo.

Además, las secuencias inmunoestimuladoras (ISS o CpG) parecen desempeñar un papel en la inmunogenicidad de vacunas de ADN. Estas secuencias pueden incluirse en el vector, fuera de la secuencia codificante de minigén, si se desea potenciar la inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, puede usarse un vector de expresión bicistrónico que permite la producción tanto de epítomos codificados por minigenes como de una segunda proteína (incluida para potenciar o reducir la inmunogenicidad). Los ejemplos de proteínas o polipéptidos que podrían potenciar beneficiosamente la respuesta inmunitaria si se coexpresaran incluyen citocinas (por ejemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), moléculas inductoras de citocinas (por ejemplo, LelF), moléculas coestimuladoras o para respuestas de HTL, proteínas de unión pan DR (PADRE™, Epimmune, San Diego, CA). Los epítomos auxiliares (HTL) pueden unirse con señales de dirección intracelular y expresarse por separado a partir de epítomos de CTL expresados; esto permite la dirección de los epítomos de HTL a un compartimento celular diferente del de los epítomos de CTL. Si se requiere, esto podría facilitar una entrada más eficaz de epítomos de HTL en la ruta de HTL de clase II, mejorando de este modo la inducción de HTL. A diferencia de la inducción de HTL o CTL, la reducción específica de la respuesta inmunitaria por coexpresión de moléculas inmunosupresoras (por ejemplo TGF-β) puede ser beneficiosa en ciertas enfermedades.

Pueden producirse cantidades terapéuticas de ADN plasmídico por ejemplo, por fermentación en *E. coli*, seguido de purificación. Las alícuotas del banco de células de trabajo se usan para inocular medio de cultivo, y cultivar hasta saturación en matraces de agitación o en un biorreactor de acuerdo con técnicas bien conocidas. Puede purificarse ADN plasmídico usando tecnologías de bioseparación convencionales tales como resinas de intercambio aniónico de fase sólida proporcionadas por QIAGEN, S.A. (Valencia, California). Si es necesario, puede aislarse ADN superenrollado de las formas lineal y circular abierta usando electroforesis en gel u otros métodos.

Puede prepararse ADN plasmídico purificado para inyección usando diversas formulaciones. La más sencilla de estas es la reconstitución de ADN liofilizado en una solución salina tamponada con fosfato estéril (PBS). Este enfoque, conocido como "ADN desnudo" se usa en la actualidad para administración intramuscular (IM) en ensayos clínicos. Para maximizar los efectos inmunoterapéuticos de vacunas de ADN de minigenes, puede ser deseable un método alternativo para formular ADN plasmídico purificado. Se ha descrito diversos métodos, y pueden ponerse a disposición nuevas técnicas. También pueden usarse lípidos catiónicos, glucolípidos y liposomas fusogénicos en la formulación (véase, por ejemplo, como se describe en el documento WO 93/24640 Mannino y Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7): 682 (1988); Patente de Estados Unidos N° 5.279.833; documento WO 91/06309; y Felgner, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413 (1987)). Además, los péptidos y compuestos denominados colectivamente compuestos protectores, interactivos, no condensadores (PINC) también podrían formar complejo con ADN plasmídico purificado para influir en variables tales como la estabilidad, la dispersión intramuscular o tráfico a órganos o tipos celulares específicos.

Puede usarse sensibilización de células diana como un ensayo funcional para la expresión y presentación de HLA de clase I de epítomos de CTL codificados por minigenes. Por ejemplo, el ADN plasmídico se introduce en una línea celular de mamífero que es adecuada como una diana para ensayos de liberación de cromo de CTL convencionales. El método de transfección usado dependerá de la formulación final. La electroporación puede usarse para ADN "desnudo", mientras que los lípidos catiónicos permiten la transfección directa *in vitro*. Un plásmido que expresa proteína verde fluorescente (GFP) puede cotransfectarse para permitir el enriquecimiento de células transfectadas usando separación de células activadas por fluorescencia (FACS). Estas células se marca después con cromo 51 (⁵¹Cr) y se usan como células diana para líneas de CTL específicas de epítomo; la citolisis, detectada por liberación de ⁵¹Cr indica tanto producción de, como presentación de HLA de epítomos de CTL codificados por minigenes. La expresión de epítomos de HTL puede evaluarse de una manera análoga usando ensayos para evaluar la actividad HTL.

La inmunogenicidad *in vivo* es un segundo enfoque para ensayos funcionales de formulaciones de ADN de minigén. Los ratones transgénicos que expresan proteínas de HLA humanas apropiadas se inmunizan con el producto de ADN. La dosis y vía de administración son dependientes de la formulación (por ejemplo, IM para ADN en PBS, intraperitoneal (i.p.) para ADN en complejo con lípidos). Veintiún días después de la inmunización, los esplenocitos se recogen y se reestiman durante una semana en presencia de péptidos que codifican cada epítomo que se ensaya. A continuación para células efectoras de CTL, se realizan ensayos para citolisis de células diana marcadas con ⁵¹Cr, cargadas con péptidos usando técnicas convencionales. La lisis de células diana que se sensibilizaron por HLA cargado con epítomos peptídicos, correspondientes a epítomos codificados por minigenes, demuestra la función de vacuna de ADN para inducción *in vivo* de CTL. La inmunogenicidad de epítomos de HTL se confirma en ratones transgénicos de una manera análoga.

Como alternativa, los ácidos nucleicos puede administrarse usando suministro balístico como se describe, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N° 5.204.253. Usando esta técnica, se administran partículas comprendidas solamente de ADN. En una realización alternativa adicional, el ADN puede adherirse a partículas, tales como partículas de oro.

Los minigenes también pueden suministrarse usando otros sistemas de suministro bacterianos o virales bien conocidos en la técnica, por ejemplo, una construcción de expresión que codifica epítomos como se desvela en el presente documento puede incorporarse en un vector viral tal como vaccinia.

X.C.2. Combinaciones de Péptidos de CTL con Péptidos Auxiliares

Pueden modificarse composiciones de vacuna que comprenden péptidos de CTL como se desvela en el presente documento, por ejemplo, hacerse análogas, para proporcionar atributos deseados, tales como semivida en suero mejorada, cobertura de población ampliada o inmunogenicidad potenciada.

Por ejemplo, la capacidad de un péptido para inducir actividad de CTL puede potenciarse uniendo el péptido con una secuencia que contiene al menos un epítipo que es capaz de inducir una respuesta de linfocitos T auxiliares. Aunque un péptido de CTL puede estar unido directamente con un péptido auxiliar T, con frecuencia los conjugados de epítipo de CTL/epítipo de HTL se unen por una molécula espaciadora. El espaciador está comprendido normalmente por moléculas neutras, relativamente pequeñas, tales como aminoácidos o miméticos de aminoácidos, que están sustancialmente sin carga en condiciones fisiológicas. Los espaciadores se seleccionan normalmente de, por ejemplo, Ala, Gly u otros espaciadores neutros de aminoácidos no polares o aminoácidos polares neutros. Se entenderá que no es necesario que el espaciador opcionalmente presente esté comprendido por los mismos restos y por lo tanto pueda ser un hetero u homo oligómero. Cuando esté presente, el espaciador será habitualmente de al menos uno o dos restos, más habitualmente de tres a seis restos y en ocasiones de 10 o más restos. El epítipo peptídico de CTL puede unirse con el epítipo peptídico T auxiliar bien directamente o bien mediante un espaciador en el extremo amino o carboxilo terminal del péptido de CTL. El extremo amino terminal del péptido inmunogénico o el péptido auxiliar T puede acilarse.

Los epítipos peptídicos de HTL también pueden modificarse para alterar sus propiedades biológicas. Por ejemplo, pueden modificarse para incluir aminoácidos D para aumentar su resistencia a proteasas y de este modo extender su semivida en suero, o pueden conjugarse con otras moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y similares para aumentar su actividad biológica. Por ejemplo, un péptido T auxiliar puede conjugarse con una o más cadenas de ácido palmítico en el extremo amino o carboxilo terminal.

X.C.3. Combinaciones de Péptidos de CTL con Agentes de Sensibilización de Linfocitos T

Puede ser deseable incluir en las composiciones farmacéuticas como se desvela en el presente documento al menos un componente que sensibilice linfocitos B o linfocitos T. Se han identificado lípidos como agentes capaces de sensibilizar CTL *in vivo*. Por ejemplo, pueden unirse restos de ácidos palmítico con los grupos ϵ y α amino de un resto de lisina y después unirse, por ejemplo, mediante uno o más restos de enlace tales como Gly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser, o similares, con un péptido inmunogénico. El péptido lipidado puede después administrarse directamente en una micela o partícula, incorporarse en un liposoma, o emulsionarse en un adyuvante, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund. Una composición inmunogénica particularmente eficaz puede comprender ácido palmítico unido a grupos ϵ y α amino de Lys, que se une mediante enlace, por ejemplo, Ser-Ser, con el extremo amino terminal del péptido inmunogénico.

Como otro ejemplo de sensibilización por lípidos de respuestas de CTL, pueden usarse lipoproteínas de *E. coli*, tales como tripalmitoil-S-gliceril-cisteinilseril-serina (P₃CSS) para sensibilizar CTL específicos de virus cuando se unen covalentemente con un péptido apropiado (véase, por ejemplo, Deres, *et al.*, Nature 342: 561, 1989). Los péptidos pueden acoplarse con P₃CSS, por ejemplo y el lipopéptido administrarse a un individuo para sensibilizar específicamente una respuesta inmunitaria al antígeno diana. Además, debido a que la inducción de anticuerpos neutralizadores también puede sensibilizarse con epítipos conjugados con P₃CSS, pueden combinarse dos de dichas composiciones para inducir más eficazmente respuestas tanto humorales como mediadas por células.

X.C.4. Composiciones de Vacuna que Comprenden DC Pulsadas con Péptidos de CTL y/o HTL

Un ejemplo de una composición de vacuna de acuerdo con las divulgaciones del presente documento comprende la administración *ex vivo* de un cóctel de péptidos portadores de epítipos a PBMC, o DC aisladas de las mismas, de la sangre del paciente. Puede usarse un producto farmacéutico para facilitar la recogida de DC, tal como Progenipoietin™ (Pharmacia-Monsanto, San Louis, Missouri) o GM-CSF IL-4. Después de pulsar las DC con péptidos y antes de la reinfusión en pacientes, las DC se lavan para retirar péptidos no unidos. Una vacuna puede comprender DC pulsadas por péptidos que presentan los epítipos peptídicos pulsados en complejo con moléculas de HLA en sus superficies.

Las DC pueden pulsarse *ex vivo* con un cóctel de péptidos, algunos de los cuales estimulan respuestas de CTL a PSCA. Opcionalmente, un péptido de linfocito T auxiliar (HTL), tal como un péptido de HLA de Clase II natural o artificial poco restringido, puede incluirse para facilitar la respuesta de CTL. Por lo tanto, una vacuna puede usarse para tratar un cáncer que expresa o sobreexpresa PSCA.

X.D.) Inmunoterapia Adoptiva

Se usan péptidos relacionados con PSCA antigénicos para inducir una respuesta de CTL y/o HTL *ex vivo* también. Las células de CTL o HTL resultantes pueden usarse para tratar tumores en pacientes que no responden a otras formas convencionales de terapia, o no responderán a péptido de vacuna terapéutica o ácido nucleico de acuerdo

con las divulgaciones del presente documento. Se inducen respuestas de CTL o HTL *ex vivo* a un antígeno particular incubando en cultivo tisular las células precursoras de CTL o HTL del paciente, o genéticamente compatibles, junto con una fuente de células presentadoras de antígenos (APC), tales como células dendríticas, y el péptido inmunogénico apropiado. Después de un tiempo de incubación apropiado (normalmente aproximadamente 7-28 días), en el que las células precursoras se activan y expanden en células efectoras, las células se infunden de vuelta al paciente, donde destruirán (CTL) o facilitarán la destrucción (HTL) de su célula diana específica (por ejemplo, una célula tumoral). Las células dendríticas transfectadas también pueden usarse como células presentadoras de antígeno.

10 X.E.) Administración de Vacunas para Fines Terapéuticos o Profilácticos

Pueden usarse composiciones farmacéuticas y de vacuna como se desvela en el presente documento para tratar y/o prevenir un cáncer que exprese o sobreexpresen PSCA. En aplicaciones terapéuticas, se administran composiciones peptídicas y/o de ácido nucleico a un paciente en una cantidad suficiente para inducir una respuesta de linfocitos B, CTL y/o HTL eficaz al antígeno y para curar o al menos detener parcialmente o ralentizar los síntomas y/o complicaciones. Una cantidad adecuada para conseguir esto se define como "dosis terapéuticamente eficaz". Las cantidades eficaces para este uso dependerán de, por ejemplo, la composición particular administrada, el modo de administración, el estadio y gravedad de la enfermedad que se trate, el peso y estado general de salud del paciente, y el criterio del médico a cargo.

Para composiciones farmacéuticas, los péptidos inmunogénicos de la invención, o ADN que los codifica, se administran en general a un individuo que ya porta un tumor que expresa PSCA. Los péptidos o ADN que los codifica pueden administrarse individualmente o como fusiones de una o más secuencias peptídicas. Los pacientes pueden tratarse con los péptidos inmunogénicos por separado o junto con otros tratamientos, tales como cirugía, según sea apropiado.

Para uso terapéutico, la administración debería comenzar en general en el primer diagnóstico de cáncer asociado a PSCA. Esto se sigue de dosis de refuerzo hasta que al menos los síntomas han disminuido sustancialmente y durante un periodo posterior. La composición de vacuna (es decir, incluyendo, pero sin limitación, realizaciones tales como cócteles peptídicos, polipéptidos epitópicos, minigenes, o CTL específicos de TAA o células dendríticas pulsadas) suministrada al paciente puede variar de acuerdo con el estadio de la enfermedad o el estado de salud del paciente. Por ejemplo, en un paciente con un tumor que expresa PSCA, una vacuna que comprende CTL específica de PSCA puede ser más eficaz en la destrucción de células tumorales en pacientes con enfermedad avanzada que realizaciones alternativas.

Es generalmente importante proporcionar una cantidad del epítipo peptídico suministrado por un modo de administración suficiente para estimular eficazmente una respuesta de linfocitos T citotóxica; también pueden proporcionarse composiciones que estimulen respuestas de linfocitos T auxiliares de acuerdo con la presente divulgación.

La dosificación para una inmunización terapéutica inicial se produce generalmente en un intervalo de dosificación unitario en el que el menor valor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500 o 1,000 μg y el valor mayor es de aproximadamente 10.000; 20.000; 30.000; o 50.000 μg . Los valores de dosificación para un ser humano normalmente varían de aproximadamente 500 μg a aproximadamente 50.000 μg para un paciente de 70 kilogramos. Pueden administrarse dosificaciones de refuerzo de entre aproximadamente 1,0 μg y aproximadamente 50.000 μg de péptido de acuerdo con un régimen de refuerzo durante semanas o meses dependiendo de la respuesta del paciente y la condición como se determina midiendo la actividad específica de CTL y HTL obtenidos de la sangre del paciente. La administración debería continuar hasta que al menos los síntomas clínicos o ensayos de laboratorio indiquen que la neoplasia se ha eliminado o reducido y durante un periodo posterior. Las dosificaciones, vías de administración y programas de dosis se ajustan de acuerdo con metodologías conocidas en este campo.

Los péptidos y composiciones desvelados en el presente documento pueden emplearse en patologías graves, es decir, con peligro para la vida o situaciones potencialmente con peligro para la vida. En dichos casos, como resultado de las cantidades mínimas de sultanas ajenas y la naturaleza relativamente no tóxica de los péptidos en composiciones preferidas desveladas en el presente documento, es posible y puede parecer deseable para el médico tratante administrar excesos sustanciales de estas composiciones peptídicas en relación con estas cantidades de dosificación indicadas.

Las composiciones de vacuna también pueden usarse puramente como agentes profilácticos. En general la dosificación para una inmunización profiláctica inicial se produce en general en un intervalo de dosificación unitaria en el que el menor valor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500 o 1000 μg y el mayor valor es de aproximadamente 10.000; 20.000; 30.000; o 50.000 μg . Los valores de dosificación para un ser humano normalmente varían de aproximadamente 500 μg a aproximadamente 50.000 μg para un paciente de 70 kilogramos. Esto se sigue de dosis de refuerzo de entre aproximadamente 1,0 μg y aproximadamente 50.000 μg de péptido administrado a intervalos definidos de aproximadamente cuatro semanas a seis meses después de la administración inicial de vacuna. La

inmunogenicidad de la vacuna puede evaluarse midiendo la actividad específica de CTL y HTL obtenidos de una muestra de sangre del paciente.

Se pretende que las composiciones farmacéuticas para tratamiento terapéutico sean para administración parenteral, tópica, oral, nasal, intratecal o local (por ejemplo como una crema o pomada tópica). Preferentemente, las composiciones farmacéuticas se administran por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intradérmica o por vía intramuscular. Por lo tanto, se desvelan en el presente documento composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de los péptidos inmunogénicos disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferentemente un vehículo acuoso.

Puede usarse diversos vehículos acuosos, por ejemplo, agua, agua tamponada, solución salina 0,8 %, glicina 0,3 %, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden esterilizarse por técnicas de esterilización bien conocidas, convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas resultantes pueden envasarse para su uso tal cual, o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con una solución estéril antes de la administración.

Las composiciones pueden contener sustancias adyuvantes farmacéuticamente aceptables según se requiera para imitar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, conservantes y similares, por ejemplo, acetato sódico, lactato sódico, cloruro sódico, cloruro potásico, cloruro cálcico, sorbitán monolaurato, trietanolamina oleato, etc.

La concentración de péptidos desvelados en el presente documento en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, es decir, de menos de aproximadamente 0,1 %, habitualmente a o al menos aproximadamente 2 % hasta tanto como el 20 % al 50 % o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo de administración particular seleccionado.

Una forma de dosis unitaria humana de una composición se incluye normalmente en una composición farmacéutica que comprende una dosis unitaria humana de un vehículo aceptable, en una realización un vehículo acuoso, y se administra en una cantidad/volumen que se conoce por los expertos en la materia para usar para administración de dichas composiciones a seres humanos (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edición, A. Gennaro, Editor, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 1985). Por ejemplo una dosis de péptido para inmunización inicial puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 50.000 μg , generalmente 100-5.000 μg , para un paciente de 70 kg. Por ejemplo, para ácidos nucleicos puede realizarse una inmunización inicial usando un vector de expresión en forma de ácido nucleico desnudo administrado IM (o SC o ID) en las cantidades de 0,5-5 mg en múltiples sitios. El ácido nucleico (0,1 a 1000 μg) también puede administrarse usando un pistola génica. Después de un periodo de incubación de 3-4 semanas, se administra a continuación una dosis de refuerzo. El refuerzo puede ser virus de viruela aviar recombinante administrado a una dosis de $5 \cdot 10^7$ a 5×10^9 ufp.

Para anticuerpos, un tratamiento implica en general la administración repetida de la preparación de anticuerpo anti PSCA, mediante una vía aceptable de administración tal como inyección intravenosa (IV), normalmente una dosis en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En general, las dosis en el intervalo de 10-500 mg de MAb por semana son eficaces y se toleran bien. Además, una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente IV, seguido de dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de MAb anti PSCA representa un régimen de dosificación aceptable. Como se apreciará por los expertos en la materia, diversos factores pueden influir en la dosis ideal en un caso particular. Dichos factores incluyen, por ejemplo, la semivida de una composición, la afinidad de unión de un Ab, la inmunogenicidad de una sustancia, el grado de expresión de PSCA en el paciente, el alcance de antígeno PSCA desprendido en circulación, el nivel de concentración de estado estacionario deseado, la frecuencia de tratamiento y la influencia del producto quimioterapéutico u otros agentes usados en combinación con el uso de la invención, así como el estado de salud de un paciente en particular. Son dosis unitarias humanas preferidas no limitantes, por ejemplo, 500 μg - 1 mg, 1 mg - 50 mg, 50 mg - 100 mg, 100 mg - 200 mg, 200 mg - 300 mg, 400 mg - 500 mg, 500 mg - 600 mg, 600 mg - 700 mg, 700 mg - 800 mg, 800 mg - 900 mg, 900 mg - 1 g, o 1 mg - 700 mg. En ciertas realizaciones, la dosis está en un intervalo de 2-5 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, con dosis semanales de seguimiento de 1-3 mg/kg; 0,5 mg, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/kg de peso corporal seguido, por ejemplo, en dos, tres o cuatro semanas de dosis semanales; 0,5 - 10 mg/kg de peso corporal, por ejemplo, seguido en dos, tres o cuatro semanas de dosis semanales: 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 mg/m² de área corporal semanalmente; 1-600 mg/m² de área corporal semanalmente; 225-400 mg/m² de área corporal semanalmente; estas dosis pueden seguirse de dosis semanales durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19, 11, 12 o más semanas.

En una realización, las formas de dosis unitaria humana de polinucleótidos comprenden un intervalo de dosificación adecuado o una cantidad eficaz que proporciona cualquier efecto terapéutico. Como se aprecia por un experto habitual en la materia un efecto terapéutico depende de varios factores, incluyendo la secuencia del polinucleótido, el peso molecular del polinucleótido y la vía de administración. Las dosificaciones se seleccionan en general por el médico u otro profesional de cuidados sanitarios de acuerdo con diversos parámetros conocidos en la técnica, tales como gravedad de síntomas, historial del paciente y similares. En general, para un polinucleótido de aproximadamente 20 bases, un intervalo de dosificación puede seleccionarse de, por ejemplo, un límite inferior

seleccionado de forma independiente tal como aproximadamente 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 mg/kg hasta un límite superior seleccionado independientemente, mayor que el límite inferior, de aproximadamente 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10.000 mg/kg. Por ejemplo, una dosis puede ser de aproximadamente cualquiera de las siguientes: de 0,1 a 100 mg/kg, de 0,1 a 50 mg/kg, de 0,1 a 25 mg/kg, de 0,1 a 10 mg/kg, de 1 a 500 mg/kg, de 100 a 400 mg/kg, de 200 a 300 mg/kg, de 1 a 100 mg/kg, de 100 a 200 mg/kg, de 300 a 400 mg/kg, de 400 a 500 mg/kg, de 500 a 1000 mg/kg, de 500 a 5000 mg/kg, o de 500 a 10.000 mg/kg. En general, las vías parenterales de administración pueden requerir dosis mayores de polinucleótido en comparación con aplicación más directa del polinucleótido a tejido enfermo, así como polinucleótidos de longitud creciente.

Las formas de dosis unitarias humanas de linfocitos T pueden comprender un intervalo de dosificación adecuado o cantidad eficaz que proporciona cualquier efecto terapéutico. Como se aprecia por un experto habitual en la materia, un efecto terapéutico depende de varios factores. Las dosificaciones se seleccionan en general por el médico u otro profesional de cuidados sanitarios de acuerdo con diversas parámetros conocidos en la técnica, tales como gravedad de síntomas, historial del paciente y similares. Una dosis puede ser de aproximadamente 10^4 células a aproximadamente 10^6 células, de aproximadamente 10^6 células a aproximadamente 10^8 células, de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células o de aproximadamente 10^8 a aproximadamente 5×10^{10} células. Una dosis también puede ser de aproximadamente 10^6 células/m² a aproximadamente 10^{10} células/m² o de aproximadamente 10^6 células/m² a aproximadamente 10^8 células/m².

También pueden administrarse una proteína o proteínas y/o ácidos nucleicos que codifican la proteína o las proteínas, mediante liposomas, que también pueden servir para: 1) dirigir la proteína o las proteínas a un tejido particular, tal como tejido linfóide; 2) dirigir selectivamente a células enfermas; o 3) aumentar la semivida de la composición peptídica. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones fosfolípídicas, capas lamelares y similares. En estas preparaciones, el péptido para suministrar se incorpora como parte de un liposoma, solo o junto con una molécula que se une con un receptor prevalente entre células linfoides, tales como anticuerpos monoclonales que se unen con el antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. Por lo tanto, los liposomas cargados o decorados con un péptido deseado pueden dirigirse al sitio de células linfoides, en el que los liposomas suministran después las composiciones peptídicas. Los liposomas pueden formarse a partir de lípidos formadores de vesículas convencionales, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros y con carga negativa y un esteroles, tal como colesterol. La selección de lípidos se guía en general por la consideración de, por ejemplo, el tamaño del liposoma, la labilidad ácida y estabilidad de los liposomas en el torrente sanguíneo. Está disponible diversos métodos para preparar liposomas, como se describe, por ejemplo, en Szoka, *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980), y Patentes de Estados Unidos N° 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 y 5.019.369.

Para dirigirse a células del sistema inmunitario, un ligando para incorporar en el liposoma puede incluir, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para determinantes de superficie celular de las células del sistema inmunitario deseadas. Una suspensión de liposomas que contiene un péptido puede administrarse por vía intravenosa, por vía local, por vía tópica, etc. en una dosis que varía de acuerdo con, entre otros, la manera de administración, el péptido que se suministra y el estadio de la enfermedad que se trata.

Para composiciones sólidas, pueden usarse vehículos sólidos no tóxicos convencionales que incluyen, por ejemplo, uso farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio, y similares. Para administración oral, se forma una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable incorporando cualquiera de los excipientes normalmente empleados, tales como los vehículos enumerados anteriormente, y generalmente 10-95 % de principio activo, es decir, uno o más péptidos de la invención y más preferentemente a una concentración de 25 %-75 %.

Para administración en aerosol, se proporcionan preferentemente péptidos inmunogénicos en forma finamente dividida junto con un tensioactivo y propulsor. Los porcentajes típicos de péptidos son de aproximadamente 0,01 % - 20 % en peso, preferentemente de aproximadamente 1 %-10 %. El tensioactivo debe, por supuesto, ser no tóxico, y preferentemente soluble en el propulsor. Son representativos de dichos agentes los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de aproximadamente 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácidos caproico, octanoico, láurico, palmítico, esteárico, linoleico, linoléico, olestérico y oleico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Pueden emplearse ésteres mixtos, tales como glicéridos mixtos o naturales. El tensioactivo puede constituir aproximadamente 0,1 %-20 % en peso de la composición, preferentemente aproximadamente 0,25-5 %. El equilibrio de la composición es habitualmente propulsor. También puede incluirse un vehículo, según se desee, como con, por ejemplo, lecitina para suministro intranasal.

XI.) Realizaciones de Diagnóstico y Pronóstico de PSCA.

Como se desvela en el presente documento, se usan polinucleótidos de PSCA, polipéptidos, linfocitos T citotóxicos (CTL) reactivos, linfocitos T auxiliares (HTL) reactivos y anticuerpos antipolipeptídicos en ensayos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos bien conocidos que examinan las condiciones asociadas con crecimiento celular desregulado tales 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”).

El PSCA puede hacerse análogo a 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 *et al.*, J. Urol. 163(2): 503-5120 (2000); Polascik *et al.*, J. Urol. Aug; 162(2): 293-306 (1999) y Fortier *et al.*, J. Nat. Cancer Inst. 91(19): 1635-1640(1999)). También se usa otros diversos marcadores de diagnóstico en contextos similares incluyendo p53 y K-ras (véase, por ejemplo, Tulchinsky *et al.*, Int J Mol Med Jul 1999 4(1): 99-102 y Minimoto *et al.*, 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 métodos que son análogos a los usados, por ejemplo, en diversos ensayos de diagnóstico dirigidos a examinar las condiciones asociadas con el cáncer.

Son ejemplos típicos de métodos de diagnóstico que utilizan los polinucleótidos de PSCA, polipéptidos, linfocitos T reactivos y anticuerpos los análogos a los métodos de ensayos de diagnóstico bien establecidos que emplean, por ejemplo, polinucleótidos de PSA, polipéptidos, linfocitos T reactivos y anticuerpos. Por ejemplo, al igual que los polinucleótidos de PSA se usan como sondas (por ejemplo en análisis de Northern, véase, por ejemplo, Sharief *et al.*, Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3): 567-74(1994)) y cebadores (por ejemplo en análisis de PCR, véase, por ejemplo, Okegawa *et al.*, J. Urol. 163(4): 1189-1190 (2000)) para observar la presencia y/o el nivel de ARNm de PSA en métodos 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 la sobreexpresión de PSCA o la metástasis de próstata y otros cánceres que expresan este gen. Como alternativa, al igual que los polipéptidos de PSA se usan para generar anticuerpos específicos para PSA que pueden usarse después para observar la presencia y/o el nivel de proteínas PSA en métodos para controlar la sobreexpresión de proteína PSA (véase, por ejemplo, Stephan *et al.*, Urology 55(4): 560-3 (2000)) o la metástasis de células prostáticas (véase, por ejemplo, Alanen *et al.*, 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.

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 no contiene normalmente células que expresan PSCA (ganglios linfáticos) contiene células que expresan PSCA tal como la expresión de PSCA vista en LAPC4 y LAPC9, xenoinjertos aislados de metástasis de ganglios linfáticos y 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 las células en una muestra biológica que no expresan normalmente PSCA o expresan PSCA a un 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 pacientes etc. mostradas en las Figuras adjuntas). En dichos ensayos, los expertos en la materia pueden desear además generar pruebas complementarias de metástasis ensayando la muestra biológica con respecto a la presencia de un segundo marcador restringido a tejido (además de PSCA) tales como PSA, PSCA etc. (véase, por ejemplo, Alanen *et al.*, 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 un modo de diagnosticar la presencia de enfermedad, estadio de enfermedad, progresión y/o agresividad del tumor. Dicho anticuerpo 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 composiciones inmunogénicas también son útiles a la vista de los fenómenos de la localización de proteína subcelular alterada en patologías. La alteración de células del estado normal al enfermo provoca cambios en la morfología celular y se asocia con frecuencia con cambios en 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 la distribución de la proteína de una manera no polar sobre la superficie celular completa.

El fenómeno de la localización de proteína subcelular alterada en una patología se ha demostrado con expresión de proteínas MUC1 y Her2 mediante el uso de medios inmunohistoquímicos. Las células epiteliales normales tienen una distribución apical típica de MUC1, además de alguna localización supranuclear de la glucoproteína, mientras que las lesiones malignas demuestran con frecuencia un patrón de tinción apolar (Diaz *et al.*, The Breast Journal, 7;

40-45 (2001); Zhang *et al*, *Clinical Cancer Research*, 4; 2669-2676 (1998); Cao, *et al*, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45: 1547-1557 (1997)). Además, el epitelio de mama normal es negativo para la proteína Her2 o muestra solamente una distribución basolateral mientras que las células malignas pueden expresar la proteína sobre la superficie celular completa (De Potter, *et al*, *International Journal of Cancer*, 44; 969-974 (1989); McCormick, *et al*, 117; 935-943 (2002)). Como alternativa, la distribución de la proteína puede alterarse desde una localización solo en superficie para incluir la expresión citoplasmática difusa en la patología. Dicho ejemplo puede verse con MUC1 (Diaz, *et al*, *The Breast Journal*, 7: 40-45 (2001)).

La alteración en la localización/distribución de una proteína en la célula, como se detecta por métodos inmunohistoquímicos, también puede proporcionar información valiosa con respecto a la favorabilidad 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 de superficie celular hace a las células favorablemente susceptibles a regímenes de diagnóstico y tratamiento basados en anticuerpos. Cuando dicha alteración de la localización proteica aparece para PSCA, la proteína PSCA y respuestas inmunitarias relacionadas con la misma son muy útiles. En consecuencia, la capacidad de determinar si la alteración de la localización de proteína subcelular se ha producido para 24P4C12 hace a la proteína PSCA y respuestas inmunitarias relacionadas con la misma muy útiles. El uso de las composiciones de PSCA permite que los expertos en la materia tomen decisiones de diagnóstico y terapéuticas importantes.

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.

Por lo tanto, los polipéptidos de PSCA y anticuerpos resultantes de respuestas inmunitarias a los mismos son útiles en diversos contextos importantes tales como fines de diagnóstico, pronóstico, preventivo y/o terapéutico conocidos por los expertos en la materia.

Igual que los fragmentos de polinucleótidos y variantes de polinucleótidos de PSA se emplean por los expertos en la materia para su uso en métodos 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 métodos 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 de cadena de la polimerasa. En el contexto de dichas reacciones de PCR, los expertos en la materia crean en general diversos fragmentos polinucleotídicos diferentes que pueden usarse como cebadores para amplificar partes diferentes de un polinucleótido de interés o para optimizar reacciones de amplificación (véase, por ejemplo, Caetano-Anolles, G. *Biotechniques* 25(3): 472-476, 478-480 (1998); Robertson *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 98: 121-154 (1998)). Una ilustración adicional del uso de dichos 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 normalmente secuencias polinucleotídicas variantes como cebadores y sondas para los ARNm correspondientes en análisis de PCR y Northern (véase, por ejemplo, Sawai *et al.*, *Fetal Diagn. Ther.* Nov-Dic 1996 11(6): 407-13 y *Current Protocols In Molecular Biology*, Volumen 2, Unidad 2, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995)). Los fragmentos y variantes de polinucleótidos son útiles en este contexto cuando son capaces de unirse con una secuencia polinucleotídica diana (por ejemplo, un polinucleótido de PSCA mostrado en la Figura 1 o 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 con ese epítipo se usan en métodos para controlar PSA. También pueden usarse fragmentos de polipéptidos y análogos o variantes de polipéptidos de PSCA de una manera análoga. Esta práctica de uso de los fragmentos de polipéptidos o variantes de polipéptidos para generar anticuerpos (tales como anticuerpos o linfocitos T anti PSA) es típica en la técnica con una amplia diversidad de sistemas tales como proteínas de fusión que se usan por los practicantes (véase, por ejemplo, *Current Protocols In Molecular Biology*, Volumen 2, Unidad 16, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995). En este contexto, cada epítipo o epítipos actúan para proporcionar la arquitectura con la que es reactivo un anticuerpo o linfocito T. Normalmente, los expertos en la materia crean diversos fragmentos polipeptídicos diferentes que pueden usarse para generar respuestas inmunitarias específicas para diferentes partes de un polipéptido de interés (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.840.501 y Patente de Estados Unidos N° 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 portadora de motivos 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 normalmente útiles en este contexto siempre que comprendan un epítipo capaz de generar un anticuerpo o linfocito T específico para una secuencia polipeptídica diana (por ejemplo un polipéptido de PSCA mostrado en la Figura 1).

Como se muestra en el presente documento, los polinucleótidos y polipéptidos de PSCA (así como las sondas polinucleotídicas de PSCA y anticuerpos o linfocitos T anti PSCA 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. Se usan ensayos de diagnóstico que miden la presencia de productos génicos de PSCA,

para evaluar la presencia o aparición de una afección descrita en el presente documento, tal como cáncer de próstata, para identificar pacientes para medidas preventivas o control adicional, como se ha realizado con éxito 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 para PSA solamente (véase, por ejemplo, Alanen *et al.*, *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)), y en consecuencia, es necesario emplear 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 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 con oncogenética en la región cromosómica en la que se mapea el gen de PSCA (véase el Ejemplo titulado "mapeo cromosómico de PSCA" posterior). Además, aparte de su uso en ensayos de diagnóstico, las proteínas y los polinucleótidos relacionados con PSCA desvelados 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* 28 jun 1996; 80(1-2): 63-9).

Adicionalmente, pueden usarse proteínas o polinucleótidos relacionados con PSCA como se desvelan en el presente documento para tratar una condición patológica caracterizada por la sobreexpresión de PSCA. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos o ácido nucleico de la Figura 1, o fragmentos de una de ellas, puede usarse para generar una respuesta inmunitaria a un antígeno PSCA. Pueden usarse anticuerpos u otras moléculas que reaccionan con PSCA para modular la función de esta molécula, y proporcionar de este modo un beneficio terapéutico.

XII.) Inhibición de la Función de la Proteína PSCA

La invención incluye diversos métodos y composiciones para inhibir la unión de PSCA con su compañero de unión o su asociación con otra proteína u otras proteínas así como métodos para inhibir la función de PSCA.

XII.A.) Inhibición de PSCA Con Anticuerpos Intracelulares

En un enfoque, un vector recombinante que codifica anticuerpos monocatenarios que se unen específicamente con PSCA se introduce en células que expresan PSCA mediante tecnologías de transferencia génica. En consecuencia, el anticuerpo anti PSCA monocatenario codificado se expresa de forma intracelular, se une con proteína PSCA e inhibe de este modo su función. Se conocen bien métodos para modificar técnicamente dichos anticuerpos monocatenarios intracelulares. Dichos anticuerpos intracelulares, también conocido como "intracuerpos", se dirigen específicamente a un compartimento particular dentro de la célula, proporcionando control sobre dónde se centra la actividad inhibitoria del tratamiento. Esta tecnología se ha aplicado con éxito en la técnica (para una revisión, véase Richardson y Marasco, 1995, *TIBTECH* vol. 13). Se ha mostrado que los intracuerpos prácticamente eliminan la expresión de receptores de superficie celular de otro modo abundantes (véase, por ejemplo, Richardson *et al.*, 1995, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3137-3141; Beerli *et al.*, 1994, *J. Biol. Chem.* 289: 23931-23936; Dshane *et al.*, 1994, *Gene Ther.* 1: 332-337).

Los anticuerpos monocatenarios comprenden los dominios variables de la cadena pesada y ligera unidos por un polipéptido enlazador flexible y se expresan como un único polipéptido. Opcionalmente, se expresan anticuerpos monocatenarios como un único fragmento de región variable monocatenario unido con la región constante de cadena ligera. Se modifican técnicamente señales de tráfico intracelular bien conocidas en vectores polinucleotídicos recombinantes que codifican dichos anticuerpos monocatenarios para dirigir con precisión el intracuerpo al compartimento intracelular deseado. Por ejemplo, se modifican técnicamente intracuerpos dirigidos al retículo endoplásmico (RE) para incorporar un péptido líder y, opcionalmente, una señal de retención del RE C terminal, tal como el motivo de aminoácidos KDEL. Los intracuerpos que se pretende que ejerzan actividad en el núcleo se modifican técnicamente para incluir una señal de localización nuclear. Los restos lipídicos se unen con intracuerpos para unir el intracuerpo con el lado citosólico de la membrana plasmática. Los intracuerpos también pueden dirigirse para ejercer función en el citosol. Por ejemplo, se usan intracuerpos citosólicos para secuestrar factores dentro del citosol, evitando de este modo que se transporten a su destino celular natural.

En una realización, se usan intracuerpos para capturar PSCA en el núcleo, evitando de este modo su actividad dentro del núcleo. Se modifican técnicamente señales de dirección nuclear en dichos intracuerpos de PSCA para conseguir la dirección deseada. Dichos intracuerpos de PSCA se diseñan para unirse específicamente con un dominio de PSCA particular. En otra realización, se usan intracuerpos citosólicos que se unen específicamente con una proteína PSCA para evitar que PSCA consiga acceder al núcleo, evitando de este modo que ejerza cualquier actividad biológica dentro del núcleo (por ejemplo, evitando que PSCA forme complejos de transcripción con otros factores).

Para dirigir específicamente la expresión de dicho intracuerpos a células particulares, la transcripción del intracuerpo se coloca bajo el control regulador de un promotor y/o potenciador específico de tumor apropiado. Para dirigir la

expresión de intracuerpos específicamente a próstata, por ejemplo, puede utilizarse el promotor y/o promotor/potenciador de PSA (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos N° 5.919.652 expedida el 6 julio de 1999).

5 XII.B.) Inhibición de PSCA con Proteínas Recombinantes

En otro enfoque, las moléculas recombinantes se unen con PSCA e inhiben de este modo la función de PSCA. Por ejemplo, estas moléculas recombinantes previenen o inhiben que PSCA acceda/se una a su compañero o sus compañeros de unión o se asocien con otra proteína u otras proteínas. Dichas moléculas recombinantes pueden, por ejemplo, contener la parte o las partes reactivas de una molécula de anticuerpo específica de PSCA. El dominio de unión a PSCA de un compañero de unión a PSCA pueden introducirse técnicamente en una proteína de fusión dimérica, de modo que la proteína de fusión comprenda dos dominios de unión a ligando de PSCA unidos a la parte Fc de un IgG humano, tal como IgG1 humano. Dicha parte IgG puede contener, por ejemplo, los dominios CH2 y CH3 y la región bisagra, pero no el dominio CH1. Dichas proteínas de fusión diméricas se administran en forma soluble a pacientes que padecen un cáncer asociado con la expresión de PSCA, de modo que la proteína de fusión dimérica se una específicamente con PSCA y bloquee la interacción de PSCA con un compañero de unión. Dichas proteínas de fusión diméricas se combinan además en proteínas multiméricas usando tecnologías de enlace de anticuerpos conocidas.

20 XII.C.) Inhibición de la Transcripción o Traducción de PSCA

Se desvelan en el presente documento diversos métodos y composiciones para inhibir la transcripción del gen de PSCA. De forma similar, se desvelan en el presente documento métodos y composiciones para inhibir la traducción de ARNm de PSCA en proteína.

En un enfoque, un método para inhibir la transcripción del gen de PSCA comprende poner en contacto el gen de PSCA con un polinucleótido antisentido de PSCA. En otro enfoque, un método para inhibir la traducción de ARNm de PSCA comprende poner en contacto un ARNm de PSCA con un polinucleótido antisentido. En otro enfoque, se usa una ribozima específica de PSCA para escindir un mensaje de PSCA, inhibiendo de este modo la traducción. Dichos métodos basados en antisentido y ribozimas también pueden dirigirse a las regiones reguladoras del gen de PSCA, tales como los elementos promotores y/o potenciadores de PSCA. De forma similar, se usan proteínas capaces de inhibir un factor de transcripción del gen de PSCA para inhibir la transcripción de ARNm de PSCA. Los diversos polinucleótidos y composiciones útiles en los métodos anteriormente mencionados se han descrito anteriormente. El uso de las moléculas antisentido y de ribozimas para inhibir la transcripción y la traducción se conoce bien en la técnica.

Otros factores que inhiben la transcripción de PSCA interfiriendo con la activación de la transcripción de PSCA también son útiles para tratar cánceres que expresan PSCA. De forma similar, los factores que interfieren con el procesamiento de PSCA son útiles para tratar cánceres que expresen PSCA. Los métodos del tratamiento del cáncer que utilizan dichos factores también están dentro del alcance de la invención.

XII.D.) Consideraciones Generales para Estrategias Terapéuticas

Puede usarse tecnologías de transferencia génica y terapia génica para suministrar moléculas polinucleotídicas terapéuticas a células tumorales que sintetizan PSCA (es decir, moléculas antisentido, ribozima, polinucleótidos que codifican intracuerpos y otras inhibidoras de PSCA). Se conocen en la técnica varios enfoques de terapia génica. Pueden suministrarse vectores recombinantes que codifican polinucleótidos antisentido de PSCA, ribozimas, factores capaces de interferir con la transcripción de PSCA, y así sucesivamente, a células tumorales diana usando dichos enfoques de terapia génica.

Los enfoques terapéuticos anteriores pueden combinarse con uno cualquiera de una amplia diversidad de regímenes quirúrgicos, quimioterapéuticos o radioterapéuticos. Los enfoques terapéuticos de la invención pueden permitir el uso de dosificaciones reducidas de quimioterapia (u otras terapias) y/o administración menos frecuente, una ventaja para todos los pacientes y particularmente para los que no toleran bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

La actividad antitumoral de una composición particular (por ejemplo, antisentido, ribozima, intracuerpo), o una combinación de dichas composiciones, puede evaluarse usando diversos sistemas de ensayo *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* que evalúan la actividad terapéutica incluyen ensayos de crecimiento celular, ensayos de agar blando y otros ensayos indicativos de la actividad promotora de tumores, ensayos de unión capaces de determinar el grado en que una composición terapéutica inhibirá la unión de PSCA con un compañero de unión, etc.

In vivo, el efecto de una composición terapéutica de PSCA puede evaluarse en un modelo animal adecuado. Por ejemplo, pueden usarse modelos de cáncer de próstata xenogénicos, en los que se introducen explantes de cáncer de próstata humana o tejidos de xenoinjertos pasados en animales inmunocomprometidos, tales como ratones desnudos o SCID (Klein *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por ejemplo, la Solicitud de Patente de PCT

WO98/16628 y la Patente de Estados Unidos 6.107.540 describen diversos modelos de xenoinjertos de cáncer de próstata humano capaces de recapitular el desarrollo de tumores primarios, micrometástasis y la formación de metástasis osteoblásticas características de enfermedad de estadio tardío. La eficacia puede predecirse usando ensayos que miden la inhibición de la formación de tumores, regresión de tumores o metástasis, y similares.

Los ensayos *in vivo* que evalúan la promoción de la apoptosis son útiles en la evaluación de las composiciones terapéuticas. En un ejemplo, pueden examinarse xenoinjertos de ratones que portan tumores tratados con la composición terapéutica con respecto a la presencia de focos apoptóticos y compararse con ratones que portan xenoinjertos de control no tratados. El grado en que se encuentran focos apoptóticos en los tumores de los ratones tratados proporciona un indicio de eficacia terapéutica de la composición.

Las composiciones terapéuticas usadas en la práctica de los métodos anteriores pueden formularse en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el método de suministro deseado. Los vehículos adecuados incluyen cualquier material que cuando se combine con la composición terapéutica conserve la función antitumoral de la composición terapéutica y es en general no reactivo con el sistema inmunitario del paciente. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, cualquiera de varios vehículos farmacéuticos convencionales tales como soluciones salinas tamponadas con fosfato estériles, agua bacteriostática y similares (véase, en general, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edición, A. Osal., Ed., 1980).

Pueden solubilizarse formulaciones terapéuticas y administrarse mediante cualquier vía capaz de suministrar la composición terapéutica al sitio tumoral. Las vías de administración potencialmente eficaces incluyen, pero sin limitación, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intraorgánica, ortotópica y similares. Una formulación preferida para inyección intravenosa comprende la composición terapéutica en una solución de agua bacteriostática conservada, agua no conservada estéril y/o diluida en bolsas de polivinilcloruro o polietileno que contienen Cloruro Sódico para inyección estéril 0,9 %, USP. Las preparaciones de proteínas terapéuticas pueden liofilizarse y almacenarse como polvos estériles, preferentemente al vacío, y después reconstituirse en agua bacteriostática (que contiene, por ejemplo, conservante de alcohol bencilico) o en agua estéril antes de inyección.

Las dosificaciones y protocolos de administración para el tratamiento de cánceres usando los métodos anteriores variarán según el método y el cáncer diana, y dependerán en general de varios otros factores apreciados en la técnica.

XIII.) Identificación, Caracterización y Uso de Moduladores de PSCA

Métodos para identificar y usar moduladores

Puede realizarse exploración para identificar moduladores que inducen o suprimen un perfil de expresión particular, suprimen o inducen rutas específicas, generando preferentemente el fenotipo asociado con los mismos. En otro ejemplo, habiendo identificado genes expresados diferencialmente importantes en un estado particular; se realizan exploraciones para identificar moduladores que alteren la expresión de genes individuales, bien aumentando o bien reduciendo. Puede realizarse exploración para identificar moduladores que alteren una función biológica del producto de expresión de un gen expresado diferencialmente. De nuevo, habiendo identificado la importancia de un gen en un estado particular, se realizan exploraciones para identificar agentes que se unan con y/o modulen la actividad biológica del producto génico.

Además, se realizan exploraciones para genes que se inducen en respuesta a un agente candidato. Después de identificar un modulador (uno que suprime un patrón de expresión de cáncer que conduce a patrón de expresión normal, o un modulador de un gen de cáncer que conduce a expresión del gen como en el tejido normal) se realiza una exploración para identificar genes que se modulan específicamente en respuesta al agente. La comparación de perfiles de expresión entre tejido normal y tejido canceroso tratado con agente revela genes que no se expresan en tejido normal o tejido canceroso, pero se expresan en tejido tratado con agente y viceversa. Estas secuencias específicas de agente se identifican y se usan por métodos descritos en el presente documento para genes o proteínas de cáncer. En particular estas secuencias y las proteínas que codifican se usan en el marcaje o identificación de células tratadas con agente. Además, se inducen anticuerpos contra proteínas inducidas por agente y se usan para dirigir productos terapéuticos nuevos a la muestra tisular de cáncer tratada.

Ensayos de identificación y exploración relacionados con modulador:

Ensayos relacionados con la expresión génica

Pueden usarse en ensayos de exploración proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos de la invención y como se desvela de otro modo en el presente documento. Las proteínas, los anticuerpos, los ácidos nucleicos, las proteínas modificadas y las células que contienen estas secuencias asociados a cáncer se usan en ensayos de exploración, tales como evaluar el efecto de candidatos farmacológicos en un "perfil de expresión génica", perfil de expresión de polipéptidos o alteración de función biológica. En un ejemplo, se usan los perfiles de expresión, preferentemente

junto con técnicas de exploración de alto rendimiento para permitir el control para genes de perfiles de expresión después del tratamiento con un agente candidato (por ejemplo, Davis, GF, *et al*, J Biol Screen 7: 69 (2002); Zlokarnik, *et al*, Science 279: 84-8 (1998); Heid, Genome Res 6: 986-94,1996).

5 Las proteínas, los anticuerpos, los ácidos nucleicos, las proteínas modificadas de cáncer y células que contienen las proteínas de cáncer nativas o modificadas o genes de cáncer se usan en ensayos de exploración. Es decir, se desvelan en el presente documento métodos para explorar con respecto a composiciones que modulen el fenotipo canceroso o una función fisiológica de una proteína de cáncer de la invención. Esto se realiza en un gen en sí mismo o evaluando el efecto de candidatos farmacológicos en un “perfil de expresión génica” o función biológica.
10 Pueden usarse perfiles de expresión, preferentemente junto con técnicas de exploración de alto rendimiento para permitir el control después del tratamiento con un agente candidato, véase Zlokarnik, mencionado anteriormente.

Se ejecuta diversos ensayos dirigidos a los genes y proteínas de la invención. Se procesan ensayos en un nivel de ácido nucleico o proteína individual. Es decir, habiendo identificado un gen particular como regulado positivamente en cáncer, se exploran compuestos de ensayo con respecto a la capacidad de modular la expresión génica o con respecto a unión con la proteína de cáncer como se desvela en el presente documento. La “modulación” en este contexto incluye un aumento o una reducción de la expresión génica. La cantidad preferida de modulación dependerá del cambio original de la expresión génica en tejido normal frente a tejido que experimenta cáncer, con cambios de al menos 10 %, preferentemente 50 %, más preferentemente 100-300 % y en algunas realizaciones 300-1000 % o más. Por lo tanto, si un gen muestra un aumento cuádruple en el tejido canceroso en comparación con tejido normal, se desea con frecuencia una reducción aproximadamente cuádruple; de forma similar, una reducción décuple en tejido canceroso en comparación con tejido normal, se desea con frecuencia un valor diana de un aumento décuple de la expresión por el compuesto de ensayo. También son útiles moduladores que exacerban el tipo de expresión génica visto en cáncer, por ejemplo, como una diana regulada positivamente en análisis adicionales.
15
20
25

La cantidad de expresión génica se controla usando sondas de ácido nucleico y se controla la cuantificación de niveles de expresión génica, o, como alternativa, un producto génico en sí mismo, por ejemplo, mediante el uso de anticuerpos para la proteína del cáncer e inmunoensayos convencionales. La proteómica y técnicas de separación también permiten la cuantificación de la expresión.
30

Control de la expresión para identificar compuestos que modifican la expresión génica

El control de la expresión génica, es decir, un perfil de expresión, puede controlarse simultáneamente con respecto a varias entidades. Dichos perfiles implicarán normalmente uno o más de los genes de la Figura 1. En este ejemplo, por ejemplo, se unen sondas de ácido nucleico de cáncer con biomicroplacas para detectar y cuantificar secuencias de cáncer en una célula particular. Como alternativa, puede usarse PCR. Por lo tanto, puede usarse una serie, por ejemplo, pocillos de una placa de microtitulación con cebadores repartidos en pocillos deseados. Puede después realizarse una reacción de PCR y analizarse para cada pocillo.
35
40

Se realiza control de la expresión para identificar compuestos que modifiquen la expresión de una o más secuencias asociadas a cáncer, por ejemplo, una secuencia polinucleotídica expuesta en la Figura 1. En general, se añade un modulador de ensayo a las células antes de su análisis. Además, también se proporcionan exploraciones para identificar agentes que modulan el cáncer, modulan proteínas del cáncer de la invención, se unen con una proteína de cáncer como se desvela en el presente documento, o interfieren con la unión de una proteína de cáncer y un anticuerpo u otro compañero de unión.
45

Los métodos de exploración de alto rendimiento pueden implicar proporcionar una biblioteca que contenga un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos candidatos). Dichas “bibliotecas químicas combinatorias” se exploran después en uno o más ensayos para identificar los miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que presentan una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de este modo pueden actuar como “compuestos candidatos” convencionales, como compuestos para exploración o como productos terapéuticos.
50

Pueden explorarse bibliotecas combinatorias de moduladores potenciales con respecto a una capacidad para unirse con un polipéptido de cáncer o para modular la actividad. Convencionalmente, se generan nuevas entidades químicas con propiedades útiles identificando un compuesto químico (denominado un “compuesto candidato”) con alguna actividad o propiedad deseable, por ejemplo, actividad inhibidora, creando variantes del compuesto candidato, y evaluando la propiedad y actividad de esos compuestos variantes. Con frecuencia, se emplean métodos de exploración de alto rendimiento (HTS) para dicho análisis.
55
60

Como se ha observado anteriormente, el control de la expresión génica se usa convenientemente para ensayar moduladores candidatos (por ejemplo, proteína, ácido nucleico o molécula pequeña). Después de haberse añadido el agente candidato y permitirse que las células se incuben durante un periodo, la muestra que contiene una secuencia diana para analizar se añade, por ejemplo, a una biomicroplaca.
65

Si es necesario, la secuencia diana se prepara usando técnicas conocidas. Por ejemplo, una muestra se trata para lisar las células, usando tampones de lisis conocidos, electroporación, etc., con purificación y/o amplificación tal como PCR realizada según sea apropiado. Por ejemplo, se realiza una transcripción *in vitro* con marcadores unidos covalentemente a los nucleótidos. En general, los ácidos nucleicos se marcan con biotina-FITC o PE, o con cy3 o cy5.

La secuencia diana puede marcarse con, por ejemplo, una señal fluorescente, una quimioluminiscente, una química o una radiactiva para proporcionar un medio para detectar la unión específica de secuencia diana con una sonda. El marcador también puede ser una enzima, tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano rusticano, que cuando se proporciona con un sustrato apropiado produce un producto que se detecta. Como alternativa, el marcador es un compuesto marcado o una molécula pequeña, tal como un inhibidor de enzima, que se une con pero no se cataliza o se altera por la enzima. El marcador también puede ser un resto o compuesto, tal como un marcador epitópico o biotina que se une específicamente con estreptavidina. Para el ejemplo de biotina, la estreptavidina se marca como se ha descrito anteriormente, por lo tanto, proporcionando una señal detectable para la secuencia diana unida. La estreptavidina marcada no unida normalmente se retira antes del análisis.

Como se apreciará por los expertos en la materia, estos ensayos pueden ser ensayos de hibridación directos o pueden comprender "ensayos de tipo sándwich", que incluyen el uso de múltiples sondas, como se perfila en general en las Patentes de Estados Unidos N° 5.681.702; 5.597.909; 5.545.730; 5.594.117; 5.591.584; 5.571.670; 5.580.731; 5.571.670; 5.591.584; 5.624.802; 5.635.352; 5.594.118; 5.359.100; 5.124.246; y 5.681.697. En este método, en general, el ácido nucleico diana se prepara como se ha perfilado anteriormente, y después se añade a la biomicroplaca que comprende una pluralidad de sondas de ácido nucleico, en condiciones que permiten la formación de un complejo de hibridación.

Puede usarse diversas condiciones de hibridación, incluyendo condiciones de rigurosidad alta, moderada y baja como se ha perfilado anteriormente. Los ensayos se procesan en general en condiciones de rigurosidad que permiten la formación del complejo de hibridación de sonda marcada solamente en presencia de diana. La rigurosidad puede controlarse alterando un parámetro de etapa que es una variable termodinámica, incluyendo, pero sin limitación, temperatura, concentración de formamida, concentración salina, concentración de sal caotrópica, pH, concentración de disolvente orgánico, etc. Estos parámetros también pueden usarse para controlar la unión no específica, como se perfila en general en la Patente de Estados Unidos N° 5.681.697. Por lo tanto, puede ser deseable realizar ciertas etapas en condiciones de mayor rigurosidad para reducir la unión no específica.

Las reacciones perfiladas en el presente documento pueden conseguirse de diversas maneras. Pueden añadirse componentes de la reacción simultáneamente, o secuencialmente, en diferentes órdenes, con realizaciones preferidas perfiladas posteriormente. Además, la reacción puede incluir otros diversos reactivos. Estos incluyen sales, tampones, proteínas neutras, por ejemplo albúmina, detergentes, etc. que pueden usarse para facilitar la hibridación y detección óptima y/o reducir interacciones no específicas o de fondo. También pueden usarse reactivos que de otro modo mejoren la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos, etc., dependiendo de los métodos de preparación de muestras y la pureza de la diana. Los datos de ensayo se analizan para determinar los niveles de expresión de genes individuales, y cambios en los niveles de expresión como entre estados, formando un perfil de expresión génica.

Ensayos relacionados con la actividad biológica

Se desvelan en el presente documento métodos para identificar o explorar con respecto a un compuesto que modula la actividad de un gen o una proteína relacionado con cáncer como se desvela en el presente documento. Los métodos comprenden añadir un compuesto de ensayo, como se ha definido anteriormente, a una célula que comprende una proteína de cáncer de la invención. Las celdas contienen un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína de cáncer. Puede ensayarse una biblioteca de agentes candidatos en una pluralidad de células.

En un método, los ensayos se evalúan en presencia o ausencia o exposición previa o posterior de señales fisiológicas, por ejemplo hormonas, anticuerpos, péptidos, antígenos, citocinas, factores de crecimiento, potenciales de acción, agentes farmacológicos incluyendo productos quimioterapéuticos, radiación, productos carcinogénicos u otras células (es decir, contactos célula-célula). En otro ejemplo, las determinaciones se realizan en diferentes estadios del proceso del ciclo celular. De esta manera, se identificaron compuestos que modulan genes o proteínas de la invención. Los compuestos con actividad farmacológica son capaces de potenciar o interferir con la actividad de la proteína de cáncer de la invención. Una vez identificadas, se evalúan estructuras similares para identificar características estructurales críticas del compuesto.

Se desvela un método para modular (por ejemplo, inhibir) la división de células cancerosas; el método comprende la administración de un modulador de cáncer. También se desvela un método para modular (por ejemplo, inhibir) el cáncer; el método comprende la administración de un modulador de cáncer. En un ejemplo adicional, se proporcionan métodos para tratar células o individuos con cáncer; el método comprende la administración de un modulador de cáncer.

Se desvela un método para modular el estado de una célula que expresa un gen de la invención. Como se usa en el presente documento el estado comprende parámetros aceptados en la técnica tales como el crecimiento, la proliferación, la supervivencia, la función, la apoptosis, la senescencia, la localización, la actividad enzimática, la transducción de señales, etc. de una célula. En un método, un inhibidor de cáncer es un anticuerpo como se
5 analizado anteriormente. En otro método, el inhibidor de cáncer es una molécula antisentido. Los expertos en la materia conocen diversos ensayos de crecimiento celular, proliferación, y metástasis, como se describe en el presente documento.

Exploración de alto rendimiento para identificar moduladores

10 Los ensayos para identificar moduladores adecuados son susceptibles de exploración de alto rendimiento. Ensayos preferidos detectan de este modo la potenciación o la inhibición de transcripción de genes de cáncer, inhibición o potenciación de expresión de polipéptidos e inhibición o potenciación de actividad polipeptídica.

15 En un ejemplo, los moduladores evaluados en métodos de exploración de alto rendimiento son proteínas, con frecuencia proteínas de origen natural o fragmentos de proteínas de origen natural. Por lo tanto, por ejemplo, se usan extractos celulares que contienen proteínas, o productos de digestión aleatorios o dirigidos de extractos celulares proteicos. De esta manera, se preparan bibliotecas de proteínas para exploración en los métodos de la invención. Se prefieren particularmente en este método bibliotecas de proteínas bacterianas, fúngicas, virales y de
20 mamífero, prefiriéndose estas últimas, y prefiriéndose especialmente proteínas humanas. Se dirigirán compuestos de ensayo particularmente útiles a la clase de proteínas a la que pertenezca la diana, por ejemplo, sustratos para enzimas o ligandos y receptores.

Uso de cultivo en agar blando y formación de colonias para identificar y caracterizar moduladores

25 Las células normales requieren un sustrato sólido para unirse y crecer. Cuando las células se transforman, pierden este fenotipo y crecen separadas del sustrato. Por ejemplo, las células transformadas pueden crecer en cultivo de suspensión agitado o suspendidas en medios semisólidos, tales como agar semisólido o blando. Las células transformadas, cuando se transfectan con genes supresores de tumores, pueden regenerar un fenotipo normal y requieren de nuevo un sustrato sólido para unirse y crecer. Se usan crecimiento en agar blando o formación de
30 colonias en ensayos para identificar moduladores de secuencias de cáncer, que cuando se expresan en células hospedadoras, inhiben la proliferación y transformación celular anómala. Un modulador reduce o elimina la capacidad de las células hospedadoras para crecer suspendidas en medios semisólidos o sólidos, tales como agar.

35 Se describen técnicas para crecimiento en agar blando o formación de colonias en ensayos de suspensión en Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (3ª ed., 1994). Véase también, la sección de métodos de Garkavtsev *et al.* (1996), mencionado anteriormente.

Evaluación de la inhibición por contacto y limitación de la densidad de crecimiento para identificar y caracterizar moduladores

40 Las células normales crecen normalmente en un patrón plano y organizado en cultivo celular hasta que tocan a otras células. Cuando las células se tocan entre sí, se inhiben por contacto y dejan de crecer. Las células transformadas, sin embargo, no se inhiben por contacto y continúan creciendo a altas densidades en focos desorganizados. Por lo tanto, las células transformadas crecen hasta una mayor densidad de saturación que las células normales correspondientes. Esto se detecta morfológicamente por la formación de una monocapa desorientada de células o células en focos. Como alternativa, se usa un índice de marcaje con (³H)-timidina a densidad de saturación para
45 medir la densidad de limitación del crecimiento, de forma similar un ensayo de MTT o azul de Alamar revelará la capacidad de proliferación de células y la capacidad de los moduladores para afectar a las mismas. Véase Freshney (1994), mencionado anteriormente. Las células transformadas, cuando se transfectan con genes supresores de tumores, pueden regenerar un fenotipo normal e inhibirse por contacto y crecerían a una menor densidad.

50 En este ensayo, el índice de marcaje con (³H)-timidina a densidad de saturación es un método preferido para medir la limitación de densidad de crecimiento. Se transfectan células hospedadoras transformadas con una secuencia asociada a cáncer y se cultivan durante 24 horas a densidad de saturación en condiciones de medio no limitante. El porcentaje de células que se marcan con (³H)-timidina se determina por cpm incorporado.

55 El crecimiento independiente de contacto se usa para identificar moduladores de secuencias de cáncer, que han conducido a proliferación celular anómala y transformación. Un modulador reduce o elimina el crecimiento independiente de contacto, y devuelve las células a un fenotipo normal.

Evaluación de la dependencia del factor de crecimiento o suero para identificar y caracterizar moduladores

60 Las células transformadas tienen menor dependencia de suero que sus homólogos normales (véase, por ejemplo, Temin, J. Natl. Cancer Inst. 37: 167-175 (1966); Eagle *et al.*, J. Exp. Med 131: 836-879 (1970)); Freshney, mencionado anteriormente. Esto se debe en parte a la liberación de diversos factores de crecimiento por las células

transformadas. El grado de dependencia del factor de crecimiento o suero de células hospedadoras transformadas puede compararse con el del control. Por ejemplo, la dependencia del factor de crecimiento o suero de una célula se controla en métodos para identificar y caracterizar compuestos que modulan las secuencias asociadas a cáncer desveladas en el presente documento.

5

Uso de niveles de marcadores específicos de tumor para identificar y caracterizar moduladores

Las células tumorales liberan una cantidad aumentada de ciertos factores (en lo sucesivo en el presente documento "marcadores específicos de tumor") que sus homólogos normales. Por ejemplo, se libera activador de plasminógeno (PA) de glioma humano a un mayor nivel que de células cerebrales normales (véase, por ejemplo, Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, en *Biological Responses in Cancer*, pp. 178-184 (Mihich (ed.) 1985)). De forma similar, se libera Factor de Angiogénesis Tumoral (TAF) a un mayor nivel en células tumorales que sus homólogos normales. Véase, por ejemplo, Folkman, *Angiogenesis and Cancer*, Sem. Cancer Biol. (1992)), mientras que bFGF se libera de tumores endoteliales (Ensoli, B *et al.*).

15

Se describen diversas técnicas que miden la liberación de estos factores en Freshney (1994), mencionado anteriormente. Además, véase, Unkless *et al.*, J. Biol. Chem. 249: 4295-4305 (1974); Strickland y Beers, J. Biol. Chem. 251: 5694-5702 (1976); Whur *et al.*, Br. J. Cancer 42: 305 312 (1980); Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, en *Biological Responses in Cancer*, pp. 178-184 (Mihich (ed.) 1985); Freshney, *Anticancer Res.* 5: 111-130 (1985). Por ejemplo, los niveles de marcadores específicos de tumor se controlan en métodos para identificar y caracterizar compuestos que modulan secuencias asociadas a cáncer como se desvela en el presente documento.

20

Invasividad en Matrigel para identificar y caracterizar moduladores

25

El grado de invasividad en Matrigel o un constituyente de matriz extracelular pueden usarse como un ensayo para identificar y caracterizar compuestos que modulan las secuencias asociadas a cáncer. Las células tumorales muestran una correlación positiva entre malignidad e invasividad de células en Matrigel o algún otro constituyente de la matriz extracelular. En este ensayo, se usan normalmente células tumorogénicas como células hospedadoras. La expresión de un gen supresor de tumores en estas células hospedadoras reduciría la invasividad de las células hospedadoras. Pueden usarse técnicas descritas en *Cancer Res.* 1999; 59: 6010; Freshney (1994), mencionado anteriormente. Brevemente, el nivel de invasión de células hospedadoras se mide usando filtros recubiertos con Matrigel o algún otro constituyente de matriz extracelular. La penetración en el gel, o hasta el lado distal del filtro se clasifica como invasividad, y se clasifica histológicamente por el número de células y la distancia alcanzada, o premarcando las células con ¹²⁵I y contando la radiactividad en el lado distal del filtro o el fondo de la placa. Véase, por ejemplo, Freshney (1984), mencionado anteriormente.

30

35

Evaluación del crecimiento tumoral *in vivo* para identificar y caracterizar moduladores

Los efectos de secuencias asociadas a cáncer en el crecimiento celular se ensayan en organismos transgénicos o inmunosuprimidos. Se preparan organismos transgénicos en diversas formas aceptadas en la técnica. Por ejemplo, se preparan organismos transgénicos knock out, por ejemplo mamíferos tales como ratones, en los que un gen de cáncer se altera o en el que se inserta un gen de cáncer. Se preparan ratones transgénicos knock out mediante inserción de un gen marcador u otro gen heterólogo en el sitio de gen de cáncer endógeno en el genoma de ratón mediante recombinación homóloga. Dichos ratones también pueden prepararse sustituyendo el gen de cáncer endógeno con una versión mutada del gen de cáncer, o mutando el gen de cáncer endógeno, por ejemplo, mediante exposición a carcinógenos.

45

Para preparar animales quiméricos transgénicos, por ejemplo, ratones, se introduce una construcción de ADN en los núcleos de células madre embrionarias. Se inyectan células que contienen la lesión genética recién realizada técnicamente en un embrión de ratón hospedador, que se vuelve a implantar en una hembra receptora. Algunos de estos embriones se desarrollan a ratones quiméricos que poseen células germinales algunas de las cuales derivan de la línea celular mutante. Por lo tanto, criando los ratones quiméricos es posible obtener una nueva línea de ratones que contienen la lesión genética introducida (véase, por ejemplo, Capecchi *et al.*, *Science* 244: 1288 (1989)). Los ratones quiméricos pueden derivar de acuerdo con la Patente de Estados Unidos 6.365.797, expedida el 2 de abril de 2002; Patente de Estados Unidos 6.107.540 expedida el 22 de agosto de 2000; Hogan *et al.*, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D. C., (1987).

55

Como alternativa, pueden usarse diversos animales hospedadores inmunosuprimidos o inmunodeficientes. Por ejemplo, puede usarse como un hospedador un ratón "desnudo" genéticamente atímico (véase, por ejemplo, Giovanella *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 52: 921 (1974)), un ratón SCID, un ratón timectomizado o un ratón irradiado (véase, por ejemplo, Bradley *et al.*, Br. J. Cancer 38: 263 (1978); Selby *et al.*, Br. J. Cancer 41: 52 (1980)). Las células tumorales trasplantables (normalmente aproximadamente 10⁶ células) inyectadas en hospedadores isogénicos producen tumores invasivos en una alta proporción de casos, mientras que las células normales de origen similar no. En hospedadores que desarrollaron tumores invasivos, se inyectan por vía subcutánea o por vía

65

ortotópica células que expresan secuencias asociadas con cáncer. Los ratones se separan después en grupos, incluyendo grupos de control y grupos experimentales tratados (por ejemplo tratados con un modulador). Después de un periodo de tiempo adecuado, preferentemente 4-8 semanas, se mide el crecimiento tumoral (por ejemplo, por volumen o por sus dos dimensiones mayores, o peso) y se compara con el control. Se dice que los tumores que tienen una reducción estadísticamente significativa (usando, por ejemplo, ensayo de T de Student) tienen crecimiento inhibido.

Ensayos *in vitro* para identificar y caracterizar moduladores

Pueden realizarse ensayos para identificar compuestos con actividad moduladora *in vitro*. Por ejemplo, un polipéptido de cáncer se pone en contacto primero con un modulador potencial y se incuba durante un periodo de tiempo adecuado, por ejemplo, de 0,5 a 48 horas. En un ejemplo, los niveles de polipéptidos de cáncer se determinan *in vitro* midiendo el nivel de proteína o ARNm. El nivel de proteína se mide usando inmunoensayos tales como transferencia de Western, ELISA y similares con un anticuerpo que se une selectivamente con el polipéptido de cáncer o un fragmento del mismo. Para medición de ARNm, se prefiere amplificación, por ejemplo, usando ensayos de PCR, LCR o hibridación, por ejemplo, hibridación de Northern, protección de RNAsa, transferencia puntual. El nivel de proteína o ARNm se detecta usando agentes de detección marcados directa o indirectamente, por ejemplo, ácidos nucleicos marcados con fluorescencia o radiactividad, anticuerpos marcados con radiactividad o enzimáticamente y similares, como se describe en el presente documento.

Como alternativa, puede idearse un sistema de gen indicador usando un promotor de proteína de cáncer unido operativamente con un gen indicador tal como luciferasa, proteína verde fluorescente, CAT, o P-gal. La construcción indicadora se transfecta normalmente a una célula. Después del tratamiento con un modulador potencial, se mide la cantidad de transcripción, traducción, o actividad del gen indicador de acuerdo con técnicas conocidas por los expertos en la materia (Davis GF, mencionado anteriormente; Gonzalez, J. y Negulescu, P. Curr. Opin. Biotechnol. 1998: 9:624).

Como se ha perfilado anteriormente se realizan exploraciones *in vitro* en genes y productos génicos individuales. Es decir, habiendo identificado que un gen expresado diferencialmente particular es importante en un estado particular, se realiza exploración de moduladores de la expresión del gen o el producto génico en sí mismo.

Puede realizarse exploración con respecto a moduladores de la expresión de un gen o genes específicos. Normalmente, se evalúa la expresión de solamente uno o algunos genes. Pueden diseñarse exploraciones para encontrar en primer lugar compuestos que se unan con proteínas expresadas diferencialmente. Estos compuestos se evalúan después con respecto a la capacidad para modular la actividad expresada diferencialmente. Además, una vez que se han identificado compuestos candidatos iniciales, pueden explorarse adicionalmente variantes para evaluar mejor las relaciones de actividad estructural.

Ensayos de unión para identificar y caracterizar moduladores

En ensayos de unión de acuerdo con las divulgaciones del presente documento, se usa en general un producto génico purificado o aislado de invención. Por ejemplo, se generan anticuerpos para una proteína de la invención, y se procesan inmunoensayos para determinar la cantidad y/o localización de la proteína. Como alternativa, se usan en los ensayos células que comprenden las proteínas de cáncer.

Por lo tanto, los métodos comprenden combinar una proteína de cáncer como se desvela en el presente documento y un compuesto candidato tal como un ligando, y determinar la unión del compuesto con la proteína de cáncer de la invención. Algunos ejemplos utilizan la proteína de cáncer humano; también pueden desarrollarse y usarse modelos animales de enfermedad humana. Además, también pueden usarse otras proteínas de mamífero análogas como se aprecia por los expertos en la materia. Además, en algunas realizaciones se usan proteínas de cáncer variantes o derivadas.

En general, la proteína de cáncer como se desvela en el presente documento, o el ligando, se une de forma no difundible a un soporte insoluble. El soporte puede, por ejemplo, ser uno que tenga áreas que reciben muestras aisladas (una placa de microtitulación, una matriz, etc.). Los soportes insolubles pueden realizarse de cualquier composición con la que puedan unirse las composiciones, se separa fácilmente del material soluble, y es de otro modo compatible con el método de exploración general. La superficie de dichos soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente.

Los ejemplos de soportes insolubles adecuados incluyen placas de microtitulación, matrices, membranas y perlas. Estos se realizan normalmente de vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacárido, nylon, nitrocelulosa, o Teflón™, etc. Las placas de microtitulación y matrices son especialmente convenientes porque pueden llevarse a cabo un gran número de ensayos simultáneamente, usando cantidades pequeñas de reactivos y muestras. El modo particular de unión de la composición con el soporte no es crucial siempre que sea compatible con los reactivos y métodos generales desvelados en el presente documento, mantenga la actividad de la composición y no sea difundible. Los métodos preferidos de unión incluyen el uso de anticuerpos que no bloquean de forma estérica el

sitio de unión a ligando o la secuencia de activación cuando unen la proteína al soporte, unión directa con soportes "adhesivos" o iónicos, reticulación química, la síntesis de la proteína o agente en la superficie, etc. Después de la unión de la proteína o agente de ligando/unión al soporte, el material no unido en exceso se retira por lavado. La muestra que recibe áreas puede después bloquearse mediante incubación con albúmina de suero bovino (BSA), caseína u otra proteína inocua u otro resto.

Una vez que se ha unido una proteína de cáncer al soporte se añade un compuesto de prueba al ensayo. Como alternativa, el agente de unión candidato se une con el soporte y la proteína de cáncer de la invención se añade después. Los agentes de unión incluyen anticuerpos específicos, agentes de unión no naturales identificados en exploraciones de bibliotecas químicas, análogos peptídicos, etc.

Son de particular interés ensayos para identificar agentes que tengan una baja toxicidad para células humanas. Puede usarse una amplia diversidad de ensayos para este fin, incluyendo ensayos de proliferación, ensayos de AMPc, ensayos de unión proteína-proteína *in vitro* marcada, ensayos de desplazamiento de movilidad electroforética, inmunoensayos para unión a proteínas, ensayos funcionales (ensayos de fosforilación, etc.) y similares.

Puede realizarse una determinación de la unión del compuesto de ensayo (ligando, agente de unión, modulador, etc.) a una proteína de cáncer de la invención de varias maneras. El compuesto de ensayo puede marcarse y la unión determinarse directamente, por ejemplo, uniendo toda o una parte de la proteína de cáncer de la invención, con un soporte sólido, añadiendo un compuesto candidato marcado (por ejemplo, un marcador fluorescente), retirando por lavado el reactivo en exceso y determinando si el marcador está presente en el soporte sólido. Pueden utilizarse diversas etapas de bloqueo y lavado según sea apropiado.

En ciertas realizaciones, se marca solamente uno de los compuestos, por ejemplo, una proteína de la invención o ligandos marcados. Como alternativa, se marca más de un componente con diferentes marcadores, por ejemplo, I^{125} , para las proteínas y un fluoróforo para el compuesto. También son útiles reactivos de proximidad, por ejemplo, reactivos interruptores o de transferencia de energía.

Unión competitiva para identificar y caracterizar moduladores

En una realización, la unión del "compuesto de ensayo" se determina por ensayos de unión competitiva con un "competidor". El competidor es un resto de unión que se une con la molécula diana (por ejemplo, una proteína de cáncer de la invención). Los competidores incluyen compuestos tales como anticuerpos, péptidos, compañeros de unión, ligandos, etc. En ciertas circunstancias, la unión competitiva entre el compuesto de ensayo y el competidor desplaza el compuesto de ensayo. En una realización, el compuesto de ensayo se marca. El compuesto de ensayo, el competidor, o ambos, se añaden a la proteína durante un tiempo suficiente para permitirle la unión. Se realizan incubaciones a una temperatura que facilita la actividad óptima, normalmente entre cuatro y 40 °C. Los periodos de incubación normalmente se optimizan, por ejemplo, para facilitar la exploración de alto rendimiento rápida; normalmente entre cero y una hora será suficiente. En general el reactivo en exceso se retira o se lava. Después se añade el segundo componente, y se sigue la presencia o ausencia del componente marcado, para indicar la unión.

En un método, se añade primero el competidor seguido del compuesto de ensayo. El desplazamiento del competidor es una indicación de que el compuesto de ensayo se une a la proteína de cáncer y por lo tanto es capaz de unirse con, y potencialmente modular, la actividad de la proteína de cáncer. En esta realización, puede marcarse uno de los componentes. Por lo tanto, por ejemplo, si se marca el competidor, la presencia de marcador en la solución de lavado de compuesto postensayo indica desplazamiento por el compuesto de ensayo. Como alternativa, si se marca el compuesto de ensayo, la presencia del marcador en el soporte indica desplazamiento.

En un método alternativo, el compuesto de ensayo se añade en primer lugar, con incubación y lavado, seguido del competidor. La ausencia de unión por el competidor indica que el compuesto de ensayo se une con la proteína de cáncer con mayor afinidad que el competidor. Por lo tanto, si se marca el compuesto de ensayo, la presencia del marcador en el soporte, acoplado con una falta de unión de competidor, indica que el compuesto de ensayo se une con y modula potencialmente la proteína de cáncer de la invención.

En consecuencia, los métodos de unión competitiva comprenden exploración diferencial para identificar agentes que son capaces de modular la actividad de las proteínas de cáncer de la invención. Los métodos pueden comprender combinar una proteína de cáncer y un competidor en una primera muestra. Una segunda muestra comprende un compuesto de ensayo, la proteína de cáncer y un competidor. La unión del competidor se determina para ambas muestras, y un cambio, o diferencia en la unión entre las muestras indica la presencia de un agente capaz de unirse con la proteína de cáncer y potencialmente modular su actividad. Es decir, si la unión del competidor es diferente en la segunda muestra en relación con la primera muestra, el agente es capaz de unirse con la proteína de cáncer.

Como alternativa, se usa exploración diferencial para identificar candidatos farmacológicos que se unen con la proteína de cáncer nativa, pero no se pueden unir con proteínas de cáncer modificadas. Por ejemplo la estructura de la proteína de cáncer se modela y usa en diseño de fármacos racional para sintetizar agentes que interactúan con

ese sitio, agentes que generalmente no se unen con proteínas modificadas en sitio. Además, dichos candidatos farmacológicos que afectan a la actividad de una proteína de cáncer nativa también se identifican explorando fármacos con respecto a la capacidad para potenciar o reducir la actividad de dichas proteínas.

5 Pueden usarse controles positivos y controles negativos en los ensayos. Se realizan preferentemente muestras de control y de ensayo al menos por triplicado para obtener resultados estadísticamente significativos. La incubación de todas las muestras se produce durante un tiempo suficiente para permitir la unión del agente con la proteína. Después de incubación, se retira por lavado material unido de forma no específica de las muestras y se determina la cantidad de agente unido, generalmente marcado. Por ejemplo, cuando se emplea un radiomarcador, las muestras
10 pueden contarse en un contador de centelleo para determinar la cantidad de compuesto unido.

Puede incluirse otros diversos reactivos en los ensayos de exploración. Estos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, por ejemplo albúmina, detergentes, etc. Que se usan para facilitar la unión proteína-proteína óptima y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. También pueden usarse reactivos que de otro modo mejoran la eficacia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes antimicrobianos, etc., La mezcla de componentes se añade en un orden que posibilita la unión requerida.
15

Uso de polinucleótidos para regular negativamente o inhibir una proteína como se desvela en el presente documento

20 Pueden introducirse moduladores polinucleotídicos de cáncer en una célula que contiene la secuencia de nucleótidos diana mediante formación de un conjugado con una molécula de unión a ligando, como se describe en el documento WO 91/04753. Las moléculas de unión a ligando adecuadas incluyen, pero sin limitación, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas u otros ligandos que se unen con receptores de superficie celular. Preferentemente, la conjugación de la molécula de unión a ligando no interfiere sustancialmente con la
25 capacidad de la molécula de unión a ligando para unirse con su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido con sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula. Como alternativa, puede introducirse un modulador polinucleotídico de cáncer en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico diana, por ejemplo, mediante formación de un complejo de polinucleótido-lípido, como se describe en el documento WO 90/10448. Se entiende que el uso de moléculas antisentido o modelos knock out y knock in también pueden
30 usarse en ensayos de exploración como se ha analizado anteriormente, además de métodos de tratamiento.

Nucleótidos inhibidores y antisentido

35 La actividad de una proteína asociada a cáncer puede regularse negativamente, o inhibirse completamente, mediante el uso de polinucleótido antisentido o ARN nuclear pequeño inhibidor (ARNnp), es decir, un ácido nucleico complementario de, y que puede hibridar preferentemente de forma específica con una secuencia de ácido nucleico de ARNm codificante, por ejemplo, una proteína de cáncer como se desvela en el presente documento, ARNm o una subsecuencia de los mismos. La unión del polinucleótido antisentido con el ARNm reduce la traducción y/o estabilidad del ARNm.

40 En el contexto de la presente divulgación, los polinucleótidos antisentido pueden comprender nucleótidos de origen natural o especies sintéticas formada a partir de subunidades de origen natural o sus homólogos cercanos. Los polinucleótidos antisentido también pueden tener restos de azúcares alterados o enlaces entre azúcares. Son ejemplos entre estos el fosforotioato y otras especies que contienen azufre que se conocen para su uso en la
45 técnica. La presente invención comprende análogos siempre que actúen eficazmente para hibridar con nucleótidos como se desvela en el presente documento. Véase, por ejemplo, Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA; Sequitor, Inc., Natick, MA.

50 Dichos polinucleótidos antisentido puede sintetizarse fácilmente usando medios recombinantes, o pueden sintetizarse *in vitro*. El equipamiento para dicha síntesis se vende por varios proveedores, incluyendo Applied Biosystems. La preparación de otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados también se conoce bien por los expertos en la materia.

55 Las moléculas antisentido como se usa en el presente documento incluyen oligonucleótidos antisentido o con sentido. Los oligonucleótidos con sentido pueden emplearse, por ejemplo, para bloquear la transcripción mediante unión con la cadena antisentido. El oligonucleótido antisentido y con sentido comprende una secuencia de ácido nucleico monocatenaria (ARN o ADN) capaz de unirse con secuencias de ARNm (con sentido) o ADN (antisentido) diana para moléculas de cáncer. Los oligonucleótidos antisentido o con sentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento generalmente de al menos aproximadamente 12 nucleótidos, preferentemente
60 de aproximadamente 12 a 30 nucleótidos. La capacidad para derivar un oligonucleótido antisentido o con sentido, basándose en una secuencia de ADNc que codifica una proteína dada se describe, por ejemplo, en Stein y Cohen (Cancer Res. 48: 2659 (1988) y van der Krol *et al.* (BioTechniques 6: 958 (1988)).

Ribozimas

65 Además de polinucleótidos antisentido, pueden usarse ribozimas para dirigir e inhibir la transcripción de secuencias

de nucleótidos asociadas a cáncer. Una ribozima es una molécula de ARN que escinde catalíticamente otras moléculas de ARN. Se han descrito diferentes tipos de ribozimas, incluyendo ribozimas de grupo I, ribozimas de cabeza de martillo, ribozimas en horquilla, RNasa P, y ribozimas de cabeza de hacha (véase, por ejemplo, Castanotto *et al.*, Adv. in Pharmacology 25: 289-317 (1994) para una revisión general de las propiedades de diferentes ribozimas).

Las características generales de ribozimas en horquilla se describen, por ejemplo, en Hampel *et al.*, Nucl. Acids Res. 18: 299-304 (1990); Publicación de Patente Europea N° 0360257; Patente de Estados Unidos N° 5.254.678. También se conocen por los expertos en la materia métodos de preparación (véase, por ejemplo, documento WO 94/26877; Ojwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6340-6344 (1993); Yamada *et al.*, Human Gene Therapy 1: 39-45 (1994); Leavitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 699- 703 (1995); Leavitt *et al.*, Human Gene Therapy 5: 1151-120 (1994); y Yamada *et al.*, Virology 205: 121-126 (1994)).

Uso de moduladores en exploración fenotípica

Un compuesto de ensayo puede administrarse a una población de células cancerosas, que tienen un perfil de expresión de cáncer asociado. Por "administración" o "puesta en contacto" en el presente documento se entiende que el modulador se añade a las células de tal manera que permita que el modulador actúe sobre la célula, bien por captación y acción intracelular o bien por acción en la superficie celular. Un ácido nucleico que codifica un agente proteico (es decir, un péptido) puede ponerse en una construcción viral tal como una construcción adenoviral o retroviral, y añadirse a la célula, de modo que se consiga la expresión del agente peptídico, por ejemplo, documento PCT US97/01019. También pueden usarse sistemas de terapia génica regulables. Una vez que se ha administrado el modulador a las células, las células se lavan si se desea y se permite que se incuben en condiciones preferentemente fisiológicas durante algún tiempo. Después se recogen las células y se genera un nuevo perfil de expresión génica. Por lo tanto, por ejemplo, el tejido de cáncer se explora con respecto a agentes que modulan, por ejemplo, inducen o suprimen, el fenotipo de cáncer. Un cambio en al menos un gen, preferentemente muchos, del perfil de expresión indica que el agente tiene un efecto en la actividad del cáncer. De forma similar, la alteración de una función biológica o una ruta de señalización es indicativa de actividad moduladora. Definiendo dicha identificación para el fenotipo de cáncer, se idean exploraciones para nuevos fármacos que alteren el fenotipo. Con este enfoque, no es necesario que se conozca la diana farmacológica y no es necesario que se represente en la plataforma de exploración de expresión de proteínas/genes original, ni es necesario que cambie el nivel de transcrito para la proteína diana. La función inhibidora de modulador actuará como un marcador sustituto.

Como se ha perfilado anteriormente, se realizan exploraciones para evaluar genes o productos génicos. Es decir, habiendo identificado que un gen expresado diferencialmente particular es importante en un estado particular, se realiza exploración de moduladores de la expresión del gen o el producto génico en sí mismo.

Uso de moduladores para afectar a péptidos

Se realizan mediciones de actividad de polipéptido de cáncer, o del fenotipo de cáncer usando diversos ensayos. Por ejemplo, los efectos de moduladores sobre la función de un polipéptido o polipéptidos de cáncer se miden examinando parámetros descritos anteriormente. Se usa un cambio fisiológico que afecta a la actividad para evaluar la influencia de un compuesto de ensayo en los polipéptidos como se desvela en el presente documento. Cuando se determinan los resultados funcionales usando células intactas o animales, puede evaluarse diversos efectos tales como, en el caso de un cáncer asociado con tumores sólidos, crecimiento tumoral, metástasis tumoral, neovascularización, liberación de hormonas, cambios transcripcionales a marcadores genéticos tanto conocidos como no caracterizados (por ejemplo, por transferencias de Northern), cambios en el metabolismo celular tales como cambios en el crecimiento celular o del pH, y cambios en segundos mensajeros intracelulares tales como cGNIP.

Métodos para identificar secuencias asociadas a cáncer de caracterización

La expresión de diversas secuencias génicas se correlaciona con cáncer. En consecuencia, se determinan trastornos basados en genes de cáncer mutantes o variantes. En un ejemplo, existen métodos para identificar células que contienen genes de cáncer variantes, por ejemplo, determinar la presencia de, completa o en parte, la secuencia de al menos un gen de cáncer endógeno en una célula. Esto se consigue usando cualquier variedad de técnicas de secuenciación. Se desvelan en el presente documento métodos para identificar el genotipo de cáncer de un individuo, por ejemplo, determinar toda o parte de la secuencia de al menos un gen de la invención en el individuo. Esto se realiza generalmente en al menos un tejido del individuo, por ejemplo, un tejido expuesto en la Tabla I, y puede incluir la evaluación de varios tejidos o muestras diferentes del mismo tejido. El método puede incluir comparar la secuencia del gen secuenciado con un gen de cáncer conocido, es decir, un gen de tipo silvestre para determinar la presencia de miembros de la familia, homologías, mutaciones o variantes. La secuencia de todo o parte del gen puede compararse después con la secuencia de un gen de cáncer conocido para determinar si existe alguna diferencia. Esto se realiza usando cualquier variedad de programas de homología conocida, tales como BLAST, Bestfit, etc. La presencia de una diferencia en la secuencia entre el gen de cáncer del paciente y el gen de cáncer conocido se correlaciona con una patología o una propensión a una patología, como se perfila en el presente documento.

Los genes de cáncer pueden usarse como sondas para determinar el número de copias del gen de cáncer en el genoma. Los genes de cáncer se usan como sondas para determinar la localización cromosómica de los genes de cáncer. La información tal como la localización cromosómica encuentra uso al proporcionar un diagnóstico o pronóstico en particular cuando se identifican anomalías cromosómicas tales como translocaciones, y similares en el locus de gen de cáncer.

XIV.) ARNi y uso terapéutico de ARN de interferencia pequeño (ARNip)

También se desvelan en el presente documento oligonucleótidos de ARNip, particularmente ARN bicatenarios que abarcan al menos un fragmento de la región codificante de PSCA o regiones 5'UTR, o complemento, o cualquier oligonucleótido antisentido específico para la secuencia de PSCA. Dichos oligonucleótidos pueden usarse para dilucidar una función de PSCA, o pueden usarse para explorar con respecto a o evaluar los moduladores de la función o expresión de PSCA. En otro método, la expresión génica de PSCA se reduce usando transfección de ARNip y da como resultado una capacidad proliferativa significativamente reducida de células de cáncer transformadas que expresan de forma endógena el antígeno; las células tratadas con ARNip de PSCA específicos muestran supervivencia reducida como se mide, por ejemplo, por una lectura metabólica de la viabilidad celular, que se correlaciona con la capacidad proliferativa reducida. Por lo tanto, las composiciones de ARNip de PSCA comprenden ARNip (ARN bicatenario) que corresponden a la secuencia de ORF de ácido nucleico de la proteína PSCA o subsecuencias de la misma; estas subsecuencias son generalmente de 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 o más de 35 nucleótidos de ARN contiguos de longitud y contienen secuencias que son complementarias y no complementarias de al menos una parte de la secuencia codificante de ARNm. Las subsecuencias pueden ser de 19-25 nucleótidos de longitud, más preferentemente 21-23 nucleótidos de longitud.

La interferencia de ARN es un enfoque nuevo para silenciar genes *in vitro* e *in vivo*, por lo tanto ARN bicatenarios pequeños (ARNip) son agentes terapéuticos valiosos. La capacidad de los ARNip para silenciar actividades génicas específicas se ha llevado ahora a modelos animales de enfermedad y se usa también en seres humanos. Por ejemplo, se ha demostrado que la infusión hidrodinámica de una solución de ARNip en un ratón con un ARNip contra una diana particular es terapéuticamente eficaz.

El trabajo pionero de Song *et al.* indica que un tipo de ácido nucleico completamente natural, ARN de interferencia pequeños (ARNip), actuó como agentes terapéuticos incluso sin modificación química adicional (Song, E., *et al.* "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis" Nat. Med. 9(3): 347-51(2003)). Este trabajo proporcionó las primeras pruebas *in vivo* de que la infusión de ARNip en un animal podría aliviar la enfermedad. En ese caso, los autores proporcionaron inyecciones de ARNip a ratones diseñadas para silenciar la proteína FAS (un receptor de muerte celular que cuando se sobreactiva durante la respuesta inflamatoria induce que mueran hepatocitos y otras células). Al día siguiente, se proporciona a los animales un anticuerpo específico para Fas. Los ratones de control murieron de insuficiencia hepática aguda en unos días, mientras que más del 80 % de los ratones tratados con ARNip permanecieron sin enfermedad grave y sobrevivieron. De aproximadamente el 80 % al 90 % de sus células de hígado incorporaron los oligonucleótidos de ARNip desnudos. Además, las moléculas de ARN actuaron durante 10 días antes de perder el efecto después de 3 semanas.

Para su uso en terapia humana, se suministra ARNip por sistemas eficaces que inducen actividad de ARNi de larga duración. Una salvedad importante para el uso clínico es el suministro de ARNip a las células apropiadas. Los hepatocitos parecen ser particularmente receptivos a ARN exógeno. En la actualidad, las dianas localizadas en el hígado son atractivas porque el hígado es un órgano al que pueden dirigirse fácilmente moléculas de ácido nucleico y vectores virales. Sin embargo, se prefieren también otras dianas tisulares y orgánicas.

Se usan formulaciones de ARNip con compuestos que promueven el tránsito a través de membranas celulares para mejorar la administración de ARNip en terapia. También se desvelan en el presente documento ARNip sintéticos modificados químicamente, que son resistentes a nucleasas y tienen estabilidad en suero y duración potenciada simultánea de los efectos de ARNi.

Por lo tanto, la tecnología de ARNip es un producto terapéutico para tumor maligno humano por suministro de moléculas de ARNip dirigido a PSCA para individuos con los cánceres, tales como los enumerados en la Tabla 1. Dicha administración de ARNip conduce a crecimiento reducido de células cancerosas que expresan PSCA, y proporciona una terapia antitumoral, que reduce la morbilidad y/o mortalidad asociada con el tumor maligno.

La eficacia de esta modalidad de supresión del producto génico es significativa cuando se mide *in vitro* o *in vivo*. La eficacia *in vitro* se puede demostrar fácilmente mediante la aplicación de ARNip a células en cultivo (como se ha descrito anteriormente) o a alícuotas de biopsias de paciente de cáncer cuando se usan métodos *in vitro* para detectar la expresión reducida de proteína PSCA.

XV.) Kits/Artículos de Fabricación

Para su uso en aplicaciones de laboratorio, pronóstico, profilácticas, de diagnóstico y terapéuticas descritas en el presente documento, hay kits dentro del alcance de las divulgaciones. Dichos kits pueden comprender un vehículo, envase o recipiente que esté compartimentalizado para recibir uno o más recipientes tales como viales, tubos y similares, comprendiendo cada uno de los recipientes uno de los elementos separados para su uso en el método, junto con una etiqueta o prospecto que comprende instrucciones para su uso, tal como un uso descrito en el presente documento. Por ejemplo, el recipiente o los recipientes pueden comprender una sonda que está o puede estar marcada de forma detectable. Dicha sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína o un gen o mensaje de la invención, respectivamente. Cuando el método utiliza hibridación de ácido nucleico para detectar el ácido nucleico diana, el kit también puede tener recipientes que contienen un 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 estreptavidina, unida a una molécula indicadora, tal como un marcador enzimático, fluorescente o radioisotópico; puede usarse dicho indicador con, por ejemplo, un ácido nucleico o anticuerpo. El kit puede incluir todas o parte de las secuencias de aminoácidos en la Figura 1, Figura 2 o Figura 3 o análogos de las mismas, o una molécula de ácido nucleico que codifica dichas secuencias de aminoácidos.

El kit puede comprender el recipiente descrito anteriormente y uno o más recipientes adicionales asociados con el mismo que comprenden materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; etiquetas de vehículo, envase, recipiente, vial y/o tubo que enumera los contenidos y/o las instrucciones para su uso, y prospectos con instrucciones para su uso.

Una etiqueta puede estar presente en o con el recipiente para indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no terapéutica, tal como aplicación de pronóstico, profiláctica, de diagnóstico o de laboratorio, y también puede indicar instrucciones para uso *in vivo* o *in vitro*, tales como los descritos en el presente documento. También pueden incluirse instrucciones y/u otra información en un prospecto o prospectos o etiqueta o etiquetas que se incluyen con o en el kit. La etiqueta puede estar en o asociada con el recipiente. Una etiqueta puede estar en un recipiente cuando se moldean o graban letras, números u otros caracteres que forman la etiqueta en el recipiente en sí mismo; una etiqueta puede estar asociada con un recipiente cuando está presente dentro de un receptáculo o vehículo que también porta el recipiente, por ejemplo, como un prospecto. La etiqueta puede indicar que la composición se usa para diagnóstico, tratamiento, profilaxis o pronóstico de una afección, tal como una neoplasia de un tejido expuesto en la Tabla I.

Las expresiones “kit” y “artículo de fabricación” pueden usarse como sinónimos.

En otro ejemplo desvelado en el presente documento, se proporcionan un artículo o artículos de fabricación que contienen composiciones, tales como secuencia o secuencias de aminoácidos, molécula o moléculas pequeñas, secuencia o secuencias de ácido nucleico y/o anticuerpo o anticuerpos, por ejemplo, materiales útiles para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis y/o tratamiento de neoplasias de tejidos tales como los expuestos en la Tabla I. El artículo de fabricación comprende normalmente al menos un recipiente y al menos una etiqueta. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales, jeringas y tubos de ensayo. Los recipientes pueden formarse de diversos materiales tales como vidrio, metal o plástico. El recipiente puede contener una secuencia o secuencias de aminoácidos, molécula o moléculas pequeñas, secuencia o secuencias de ácido nucleico, población o poblaciones de células y/o anticuerpo o anticuerpos. En una realización, el recipiente contiene un polinucleótido para su uso en el examen del perfil de expresión de ARNm de una célula, junto con reactivos usados para este fin. Un recipiente puede comprender un anticuerpo, fragmento de unión del mismo o proteína de unión específica para su uso en la evaluación de la expresión proteica de PSCA en células y tejidos, o para fines de laboratorio, pronóstico, diagnóstico, profilácticos y terapéuticos relevantes; pueden incluirse indicaciones y/o instrucciones para dichos usos en o con dicho recipiente, así como reactivos y otras composiciones o herramientas usadas para estos fines. Un recipiente puede comprender materiales para inducir una respuesta inmunitaria celular o humoral, junto con indicaciones y/o instrucciones asociadas. Un recipiente puede comprender materiales para inmunoterapia adoptiva, tales como linfocitos T citotóxicos (CTL) o linfocitos T auxiliares (HTL), junto con indicaciones y/o instrucciones asociadas; también pueden incluirse reactivos y otras composiciones o herramientas usadas para dicho fin.

El recipiente puede contener como alternativa una composición que es eficaz para tratar, diagnosticar, pronosticar o prevenir una afección y puede tener un orificio de acceso estéril (por ejemplo el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden ser un anticuerpo capaz de unirse específicamente con PSCA y modular la función de PSCA.

El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y/o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringas, y/o prospectos con indicaciones y/o instrucciones para su uso.

Ejemplos:

Se describen adicionalmente diversos aspectos de la invención y se ilustran por medio de los varios ejemplos a continuación, ninguno de los cuales se pretende que limite el alcance de la invención.

Ejemplo 1Análisis de expresión de variantes de PSCA en tejidos normales y muestras de ensayo de pacientes

Previamente, PSCA, indicado en el presente documento como PSCA v.1, se ha identificado como un antígeno expresado en cáncer de próstata. Su expresión se detectó en más del 80 % de cánceres de próstata primarios y en 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 inmunohistoquímico, se ha mostrado que PSCA se sobreexpresa en la superficie celular de la mayoría de carcinomas de transición uroteliales, y en el 60 % de adenocarcinomas pancreáticos primarios. Se han presentado datos de expresión de PSCA en publicaciones de patente (documentos PCT/US98/04664, PCT/US/28883, PCT/US00/19967) y en artículos con revisión por pares (Saffran *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 27 feb 2001; 98(5): 2658-2663; Amara *et al.*, Cancer Res. 15 jun 2001; 61(12): 4660-65; Reiter *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 17 feb 1998; 95(4): 1735-40; Argani *et al.*, Cancer Res. 1 jun 2001; 61(11): 4320-24).

La expresión específica de diferentes variantes de PSCA se estudia en muestras de ensayo de paciente normales y con cáncer. Los cebadores se diseñaron 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 1I(a)).

Se preparaba ADNc de primera cadena a partir de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normales, 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 1I(b)). 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.5 principalmente en cáncer de mama, metástasis de cáncer y cáncer del páncreas y a menor nivel 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 tejidos normales, se detectó producto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 solamente en próstata, estómago y a menor nivel 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.

Las cebadores se diseñaron para diferenciar entre PSCA v.4 y PSCA v.5 (Figura 1J(a)). 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 a partir de vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon, estómago normales, grupos de cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo de multixenoinjerto (xenoinjertos de cáncer de próstata, cáncer de riñón y cáncer de vejiga) (Figura 1J(b)). 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 la expresión de PSCA v.4 en cáncer de próstata, cáncer de vejiga y grupo de multixenoinjerto, 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 paciente con cáncer indican que las variantes de PSCA son dianas terapéuticas, de pronóstico, de laboratorio, profilácticas y de diagnóstico para cánceres humanos.

Ejemplo 2Variantes de corte y empalme de PSCA

Como se usa en el presente documento, el término variante incluye variantes de transcrito y polimorfismos de un único nucleótido (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 diferentes puntos. 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 tiene solamente 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 múltiples 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 proteínas iguales, similares o diferentes, teniendo dichas proteínas la misma función o una similar o una función diferente. Las proteínas variantes pueden expresarse en el mismo tejido al mismo tiempo, en un tejido diferente al mismo tiempo, o en el mismo tejido en diferentes momentos, 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, secretadas frente a intracelulares).

Se identifican variantes de transcrito por diversos métodos aceptados en la técnica. Por ejemplo, se identifican transcritos alternativos y variantes de corte y empalme clonando en su 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 del gen original se compara con la secuencia o las 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 aún no es 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 este campo.

Además, están disponibles en la técnica programas informáticos que identifican variantes de transcrito basándose en secuencias genómicas. Los programas de identificación de variantes de transcrito basados en el genoma incluyen FgenesH (A. Salamov y V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA", *Genome Research*. Abril 2000; 10(4): 516-22); Grail (URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm) y GenScan (URL 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., *et al.*, 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 este campo diversas técnicas, tales como clonación de longitud completa, validación proteómica, validación basada en PCR y validación de 5' RACE, etc. (véase por ejemplo, Proteomic Validation: Brennan, S. O., *et al.*, 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, *et al.*, Differential splicing of premessenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, *Eur J Biochem.* 1 oct 1997; 249(1): 1-7. For PCR-based Validation: Wellmann S, *et al.*, 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., *et al.*, 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 5' RACE: Brigle, K. E., *et al.*, Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, *Biochem Biophys Acta.* 7 ago 1997; 1353(2): 191-8).

Se conoce en la técnica que algunas 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 variantes de corte y empalme del gen también están modulados. Se desvela en el presente documento que PSCA tiene un perfil de expresión particular relacionado con cáncer (véase, por ejemplo, Tabla I). Los transcritos alternativos y variantes de corte y empalme de PSCA también están implicados 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 a tumores.

Usando el gen de PSCA de longitud completa junto con secuencias de EST, se han identificado cuatro variantes de transcritos 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 han mostrado en la Tabla VI. Las secuencias para PSCA y las variantes de PSCA se exponen en la Figura 1.

Ejemplo 3

Polimorfismos de un único nucleótido de PSCA

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

Un SNP que aparece en un ADNc se denomina un cSNP. Este cSNP puede cambiar aminoácidos de la proteína codificados por el gen y de este modo cambiar la función de la proteína. Algunos SNP provocan enfermedades hereditarias; otros contribuyen a variaciones cuantitativas en el 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 entre 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).

Se identifican SNP por diversos métodos 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, se identifican SNP secuenciando fragmentos de ADN que muestran polimorfismo por métodos basados en gel tales como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE). También se han descubierto por secuenciación directa de muestras de ADN agrupadas de diferentes individuos o comparando secuencias de diferentes muestras de ADN. Con la acumulación rápida de datos de secuencia en bases de datos públicas y privadas, también se descubren 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 diversos métodos 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 métodos descritos anteriormente, se han identificado 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 variante PSCA v.6 a v.18, como se muestra en la Figura 1B y Figura 1G.

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

Doce de estos 13 SNP también estaban presentes en la variante 4. Los 12 SNP variantes en relación con PSCA v. 4 se designan PSCA v. 19 a v.30. Las variantes 19 a 27 codifican aminoácidos alternativos como se muestra en la Figura 1H.

Ejemplo de referencia 4

Producción de PSCA recombinante en sistemas procariotas

Para expresar PSCA recombinante y variantes de PSCA en células procariotas, se clonan las secuencias de PSCA de longitud completa o parcial y secuencias de ADNc variantes de PSCA en uno cualquiera de diversos vectores de expresión conocidos en la técnica. Se expresan una o más de las siguientes regiones de variantes de PSCA: la secuencia de longitud completa presentada en la Figura 1, u 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 cualesquiera de PSCA, variantes o análogos del mismo.

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

pCRII: para generar sondas de ARN con sentido y antisentido de PSCA para investigaciones *in situ* de ARN, se generan construcciones de pCRII (Invitrogen, Carlsbad CA) que codifican todo el o fragmentos del ADNc de PSCA. El vector pCRII tiene promotores Sp6 y T7 que flanquean el inserto para conducir 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 al nivel de ARN. Se usa ARN de PSCA transcrito que representa la región codificante de aminoácidos de ADNc del gen de PSCA en sistemas de traducción *in vitro* tales como el Sistema de Reticulolisado 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 Glutatión S-Transferasa (GST), se clonan toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA en la familia pGEX de vectores de fusión de GST (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Estas construcciones permiten la expresión controlada de secuencias de proteína PSCA recombinante con GST fusionado

en el extremo amino terminal y un epítipo de seis histidinas (His 6X) en el extremo carboxilo terminal. Los marcadores de GST e His 6X permiten la purificación de la proteína de fusión recombinante a partir 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 de 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 proteolítica, tal como el sitio de reconocimiento PreScission™ en pGEX-6P-1, de modo que permita la escisión del marcador de GST a partir de la proteína relacionada con PSCA. El gen de resistencia a ampicilina y origen de pBR322 permite la selección y el mantenimiento de los plásmidos pGEX en *E. coli*.

Construcciones de pMAL: para generar, en bacterias, proteínas PSCA recombinantes que se fusionan con proteína de unión a maltosa (MBP), se fusionan toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA 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 de proteína PSCA recombinante con MBP fusionada en el extremo amino terminal y un marcador epítipo His 6X en el extremo carboxilo terminal. Los marcadores de MBP e His 6X permiten la purificación de la proteína recombinante a partir 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 epítipo de 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 de pMAL a partir 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 las proteínas con enlaces disulfuro.

Construcciones de pET: para expresar a PSCA en células bacterianas, se clonan toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA en la familia pET de vectores (Novagen, Madison, WI). Estos vectores permiten la 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 epítipos, tales como His 6X y S-Tag™ que ayudan a la purificación y detección de la proteína recombinante. Por ejemplo, se realizan construcciones usando el sistema de fusión NusA pET 43.1 de modo que se expresen regiones de la proteína PSCA como fusiones amino terminales con NusA.

C. Construcciones de levadura:

Construcciones de pESC: para expresar PSCA en la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para la generación de proteína recombinante y estudios funcionales, se clonan toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA en la familia pESC de vectores cada uno de los cuales contiene 1 de 4 marcadores seleccionables, HIS3, TRP1, LEU2 y URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). Estos vectores también controlan la expresión del mismo plásmido de hasta 2 genes diferentes o secuencias clonadas que contienen marcadores epítipos Flag™ o Myc en la misma célula de levadura. Este sistema es útil para confirmar las interacciones proteína-proteína de PSCA. Además, la expresión en levadura produce modificaciones posttraduccionales 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*, se clonan toda o partes de la secuencia codificante de proteína de ADNc de PSCA en la familia pESP de vectores. Estos vectores permiten alto nivel de expresión controlada de una secuencia de proteína PSCA que se fusiona en el extremo amino terminal o en el extremo carboxilo terminal con GST lo que ayuda a la purificación de la proteína recombinante. Un marcador epítipo Flag™ permite la detección de la proteína recombinante con anticuerpo anti Flag™.

Ejemplo de referencia 5

Producción de PSCA recombinante en sistemas eucariotas superiores

A. Construcciones de mamífero:

Para expresar PSCA recombinante en células eucariotas, pueden clonarse las secuencias de ADNc de PSCA de longitud completa o parcial, o variantes de las mismas, en uno cualquiera de diversos vectores de expresión conocidos en la técnica. Se expresan una o más de las siguientes regiones de PSCA en estas construcciones, aminoácidos 1 a 123, u 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 cualesquiera de PSCA v.1, variantes de PSCA o análogos de los mismos.

Las construcciones pueden transfectarse en una cualquiera de una amplia diversidad de células de mamífero tales como células 293T. Pueden explorarse lisados de células 293T transfectadas con el suero policlonal anti PSCA, descrito en el presente documento.

Construcciones de pcDNA4/HisMax: para expresar PSCA en células de mamífero, se clonan una ORF de PSCA, o partes de la misma, de PSCA en pcDNA4/HisMax Versión A (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de proteínas se conduce desde el promotor de citomegalovirus (CMV) y el potenciador de la traducción SP16. La proteína recombinante tiene epítipos Xpress™ y seis histidinas (His 6X) fusionados con el extremo amino terminal. El vector

pcDNA4/HisMax también contiene la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH) y la secuencia de terminación de la transcripción para potenciar la estabilidad de ARNm junto con el origen de SV40 para replicación episómica y rescate de vector sencillo en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a Zeocina permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína y el gen de resistencia a ampicilina y el origen de ColE1 permite la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Construcciones de pcDNA3.1/MycHis: para expresar PSCA en células de mamífero, se clonó una ORF de PSCA, o partes de la misma, de PSCA con un sitio de inicio de la traducción de Kozak consenso en pcDNA3.1/MycHis Versión A (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de proteínas se conduce desde el promotor de citomegalovirus (CMV). Las proteínas recombinantes tienen el epítipo de myc y el epítipo de His 6X fusionados con el extremo carboxilo terminal. El vector de pcDNA3.1/MycHis también contiene la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH) y secuencia de terminación de la transcripción para potenciar la estabilidad de ARNm, junto con el origen de SV40 para replicación episómica y rescate de vector sencillo en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. Puede usarse el gen de resistencia a Neomicina, que permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína y el gen de resistencia a ampicilina y el origen de ColE1 permite la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Construcción de pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO: para expresar PSCA en células de mamífero y para permitir la detección de las proteínas recombinantes usando fluorescencia, se clonan una ORF de PSCA o partes de la misma, con un sitio de inicio de la traducción de Kozak consenso en pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). La expresión de proteína se conduce desde el promotor de citomegalovirus (CMV). Las proteínas recombinantes tienen la Proteína Verde Fluorescente (GFP) fusionada con el extremo carboxilo terminal que facilita la detección no invasiva, *in vivo* y estudios de biología celular. El vector pcDNA3.1CT-GFP-TOPO también contiene la señal de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina (BGH) y secuencia de terminación de la transcripción para potenciar la estabilidad de ARNm junto con el origen de SV40 para replicación episómica y rescate de vector sencillo en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a Neomicina permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína, y el gen de resistencia a ampicilina y el origen de ColE1 permite la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Se realizan construcciones adicionales con una fusión de GFP amino terminal en pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO que abarca la longitud completa de una proteína PSCA.

PAPtag: se clona una ORF de PSCA, o partes de la misma, en pAPtag-5 (GenHunter Corp. Nashville, TN). Esta construcción genera una fusión de fosfatasa alcalina en el extremo carboxilo terminal de una proteína PSCA fusionando al mismo tiempo la secuencia señal de IgGκ con el extremo amino terminal. También se generan construcciones en las que se fusiona fosfatasa alcalina con una secuencia señal de IgGκ amino terminal con el extremo amino terminal de una proteína PSCA. Las proteínas PSCA recombinantes resultantes se optimizan para secreción en el medio de células de mamífero transfectadas y pueden usarse para identificar proteínas tales como ligandos o receptores que interaccionan con proteínas PSCA. La expresión de proteínas se conduce desde el promotor de CMV y las proteínas recombinantes también contienen epítopos myc e His 6X fusionados en el extremo carboxilo terminal lo que facilita la detección y purificación. El gen de resistencia a Zeocina presente en el vector permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína recombinante y el gen de resistencia a ampicilina permite la selección del plásmido en *E. coli*.

ptag5: se clonó una ORF de PSCA o partes de la misma, en pTag-5. Este vector es similar a pAPtag pero sin la fusión de fosfatasa alcalina. Esta construcción genera una proteína PSCA con una secuencia señal IgGκ amino terminal y marcadores epítipicos myc e His 6X en el extremo carboxilo terminal que facilitan la detección y purificación de afinidad. La proteína PSCA recombinante resultante se optimiza para secreción al medio de células de mamífero transfectadas, y se usa como inmunógeno o ligando para identificar proteínas tales como ligandos o receptores que interaccionan con las proteínas PSCA. La expresión de proteínas se conduce desde el promotor de CMV. El gen de resistencia a Zeocina presente en el vector permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína y el gen de resistencia a ampicilina permite la selección del plásmido en *E. coli*.

PsecFc: una ORF de PSCA o partes de la misma, se clonó en psecFc. El vector psecFc se ensambló clonando la inmunoglobulina G1 humana (IgG) Fc (regiones bisagra, CH2, CH3) en pSecTag2 (Invitrogen, California). Esta construcción genera una fusión de IgG1 Fc en el extremo carboxilo terminal de las proteínas PSCA, fusionando al mismo tiempo la secuencia señal IgGκ con el extremo N terminal. También se usan fusiones de PSCA que utilizan la región Fc IgG1 murina. Las proteínas PSCA recombinantes resultantes se optimizan para secreción al medio de células de mamífero transfectadas, y pueden usarse como inmunógenos o para identificar proteínas tales como ligandos o receptores que interaccionan con la proteína PSCA. La expresión de proteína se conduce desde el promotor CMV. El gen de resistencia a higromicina presente en el vector permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína recombinante, y el gen de resistencia a ampicilina permite la selección del plásmido en *E. coli*.

La figura 8 muestra la expresión y purificación de proteína PSCA.psecFc de células 293T.

Construcciones de pSR α : para generar líneas celulares de mamífero que expresan PSCA de forma constitutiva, se clonaron ORF de PSCA, o partes de la misma, de PSCA en construcciones de pSR α . Se generaron retrovirus anfotrópicos y ecotrópicos por transfección de construcciones de pSR α en la línea de empaquetamiento 293T-10A1 o cotransfección de pSR α y un plásmido auxiliar (que contiene secuencias de empaquetamiento suprimidas) en las células 293, respectivamente. El retrovirus se usa para infectar diversas líneas celulares de mamífero, dando como resultado la integración del gen clonado, PSCA, en las líneas celulares hospedadoras. La expresión de proteína se conduce desde una repetición terminal larga (LTR). El gen de resistencia a Neomicina presente en el vector permite la selección de células de mamífero que expresan la proteína, y el gen de resistencia a ampicilina y origen de ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Los vectores retrovirales pueden usarse a continuación para infección y generación de diversas líneas celulares usando, por ejemplo, células PC3, NIH 3T3, TsuPr1, 293 o rat-1.

La Figura 6 muestra la expresión de PSCA en líneas celulares murinas, de rata y humanas recombinantes usando la construcción PSCA.pSR α . Las líneas celulares murinas, de rata y humanas indicadas se infectaron con retrovirus que portaba el ADNc de PSCA humano y un gen de resistencia a neomicina o solamente con el gen de resistencia a neomicina. Se crearon líneas celulares recombinantes estables por selección de fármaco G418. Se determinó la expresión de PSCA por tinción con FACS con el MAb anti PSCA 1G8 (5 μ g/ml). Se muestra el perfil de FACS de cada línea celular que muestra un desplazamiento fluorescente solamente en la línea infectada con PSCA lo que indica expresión de PSCA en superficie celular. Estas líneas son útiles en el desarrollo de MAb como inmunógenos, reactivos de exploración de MAb y en ensayos funcionales.

Se realizan construcciones de pSR α adicionales que fusionan un marcador epitópico tal como el marcador FLAGTM con el extremo carboxilo terminal de secuencias de PSCA para permitir la detección usando anticuerpos anti FLAG. Por ejemplo, la secuencia de FLAGTM 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEC ID N^o: 76) se añade al cebador de clonación en el extremo 3' de la ORF. Se realizan construcciones de pSR α adicionales para producir proteínas de fusión de GFP y myc/His 6X tanto amino terminales como carboxilo terminales de las proteínas PSCA de longitud completa.

Vectores virales adicionales: se realizan construcciones adicionales para suministro mediado por virus y expresión de PSCA. Se consigue un alto título viral que conduce a alto nivel de expresión de PSCA en sistemas de suministro viral tales como vectores adenovirales y vectores de amplicón de herpes. Se amplifican secuencias codificantes de PSCA o fragmentos de las mismas por PCR y se subclonan en el vector lanzadera AdEasy (Stratagene). Se realiza recombinación y empaquetamiento de virus de acuerdo con las instrucciones del fabricante para generar vectores adenovirales. Como alternativa, se clonan secuencias codificantes de PSCA o fragmentos de las mismas en el vector HSV-1 (Imgenex) para generar vectores virales de herpes. Los vectores virales se usan a continuación para infección de diversas líneas celulares tales como células PC3, NIH 3T3, 293 o rat-1.

Sistemas de expresión regulada: para controlar expresión de PSCA en células de mamífero, se clonan codificantes de PSCA, o partes de las mismas, en sistemas de expresión de mamífero regulados tales como el Sistema T-Rex (Invitrogen), el Sistema GeneSwitch (Invitrogen) y el Sistema de Ecdisona estrechamente regulado (Stratagene). Estos sistemas permiten el estudio de los efectos dependientes de concentración y temporales de PSCA recombinante. Estos vectores se usan a continuación para controlar la expresión de PSCA en diversas líneas celulares tales como células PC3, NIH 3T3, 293 o rat-1.

B. Sistemas de expresión de baculovirus

Para generar proteínas PSCA recombinantes en un sistema de expresión de baculovirus, se clonan ORF de PSCA, o partes de la misma, en el vector de transferencia de baculovirus pBlueBac 4.5 (Invitrogen), que proporciona un marcador His en el extremo N terminal. Específicamente, se cotransfecta pBlueBac-PSCA con el plásmido auxiliar pBac-N-Blue (Invitrogen) en células de insecto SF9 (*Spodoptera frugiperda*) para generar baculovirus recombinante (véase manual de instrucciones de Invitrogen para detalles). Después se recoge el baculovirus del sobrenadante celular y se purifica por ensayo de placas.

Después se genera proteína PSCA recombinante por infección de células de insecto HighFive (Invitrogen) con baculovirus purificado. La proteína PSCA recombinante puede detectarse usando anticuerpo anti PSCA o anti marcador de His. La proteína PSCA puede purificarse y usarse en diversos ensayos basados en células o como inmunógeno para generar anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para PSCA.

C. Vectores de expresión para ortólogos de PSCA

Se clonaron ortólogos de PSCA de ratón y de mono en pcDNA3.1/MycHis Versión A (Invitrogen, Carlsbad, CA). La expresión de proteína se conduce desde el promotor de citomegalovirus (CMV). Las proteínas recombinantes tienen el epítipo de myc y el epítipo de His 6X fusionados con el extremo carboxilo terminal. Estos vectores permiten la expresión de ortólogos de PSCA para ensayar la reactividad cruzada de anticuerpos anti PSCA humano monoclonales.

También se clonaron ortólogos de PSCA de ratón y de mono en construcciones de pSR α . Las construcciones de pSR α permiten la generación de líneas celulares de mamífero que expresan ortólogos de PSCA de forma constitutiva. La expresión de proteínas se conduce desde el promotor de citomegalovirus (CMV). Las proteínas recombinantes tienen el epítipo de myc y el epítipo de His 6X fusionados con el extremo carboxilo terminal. Estos vectores permiten la expresión de ortólogos de PSCA para ensayar la reactividad cruzada de anticuerpos monoclonales anti PSCA humano y para estudiar la actividad funcional de ortólogos de PSCA. Se generaron los retrovirus Anfotrópicos y ecotrópicos mediante transfección de construcciones de pSR α en la línea de empaquetamiento 293T-10A1 o cotransfección de pSR α y un plásmido auxiliar (que contienen secuencias de empaquetamiento suprimidas) en las células 293, respectivamente. El retrovirus se usa para infectar diversas líneas celulares de mamífero, dando como resultado la integración del gen clonado, ortólogo de PSCA, en las líneas celulares hospedadoras.

La Figura 7 muestra la expresión de PSCA.pcDNA3.1/MycHis de ratón y de simio después de transfección en células 293T. Se transfectaron células 293T con PSCA. pcDNA3.1/MycHis de ratón o PSCA.pcDNA3.1/MycHis de simio o control de vector pcDNA3.1/MycHis. Cuarenta horas después, se recogieron las células y se analizaron por citometría de flujo usando anticuerpos monoclonales anti PSCA.

Ejemplo 6

Perfiles de antigenicidad y estructura secundaria

Se descubrieron perfiles de aminoácidos de variantes de PSCA 1, 3 y 4 accediendo al sitio Web ProtScale en la web en (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) en el servidor de biología molecular ExPasy.

Estos perfiles: hidrofilia (Hopp T. P., Woods K. R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828); Hidropaticidad (Kyte J., Doolittle R. F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132); Porcentaje de Restos Accesibles (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); Flexibilidad Promedio (Bhaskaran R., y Ponnuswamy P. K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); 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 de ProtScale, se usaron para 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 su análisis: 1) un tamaño de ventana de 9; 2) 100 % en peso de los bordes de la ventana en comparación con el centro de la ventana; y 3) valores de perfil de aminoácidos normalizados para que queden entre 0 y 1.

Se usaron los perfiles de Hidrofilia, Hidropaticidad y Porcentaje de Restos Accesibles para determinar los tramos de aminoácidos hidrófilos (es decir, valores mayores de 0,5 en el perfil de Hidrofilia y Porcentaje de Restos Accesibles, y valores menores de 0,5 en el perfil de Hidropaticidad). Dichas regiones probablemente estén expuestas al ambiente acuoso, estén presentes en la superficie de la proteína, y por lo tanto estén disponibles para reconocimiento inmunitario, tal como por anticuerpos.

Los perfiles de Flexibilidad Promedio y Giro Beta determinan tramos de aminoácidos (es decir, valores mayores de 0,5 en el perfil de giro Beta y en el perfil de Flexibilidad Promedio) que no están restringidos en estructuras secundarias tales como láminas beta y hélices alfa. También es más probable que dichas regiones estén expuestas en la proteína y por lo tanto sean accesibles al reconocimiento inmunitario, tal como por anticuerpos.

Se usan secuencias antigénicas de las proteínas variantes de PSCA indicadas, por ejemplo, por los perfiles descritos anteriormente para preparar inmunógenos, bien péptidos o bien ácidos nucleicos que los codifican, para generar anticuerpos de diagnóstico y terapéuticos anti PSCA. 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 Figura 1 de las que pueden inferirse los perfiles de aminoácidos porque la variante contiene la secuencia que es igual que una variante representada. En particular, los inmunógenos peptídicos de la invención pueden comprender una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de la Figura 1 en cualquier aumento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en el perfil de Hidrofilia; una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de la Figura 1 en cualquier aumento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor menor de 0,5 en el perfil de Hidropaticidad; una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de la Figura 1 en cualquier aumento 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; una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de la Figura 1 en cualquier aumento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en los Perfiles de Flexibilidad Promedio; y una región peptídica de al menos 5 aminoácidos de la Figura 1 en cualquier aumento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0,5 en el perfil de Giro Beta. Los inmunógenos peptídicos de la invención también pueden comprender ácidos nucleicos que codifiquen cualquiera de los anteriores.

Todos los inmunógenos de la invención, péptidos o ácidos nucleicos, pueden realizarse en forma de dosis unitaria humana, o están comprendidos por 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 hélices alfa, cadenas extendidas y bucles aleatorios, se predice a partir de la secuencia de aminoácidos primaria usando el método de HNN, Red Neural Jerárquica (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 localizado en la web en (.expasy.ch/tools/). El análisis indica que la variante 1 de PSCA está compuesta de 30,89 % de hélice de alfa, 21,95 % de cadena extendida y 47,15 % de bucle aleatorio. La variante 3 de proteína PSCA está compuesta de 14,89 % de hélice de alfa, 8,51 % de cadena extendida y 76,60 % de bucle aleatorio. La variante 4 de proteína PSCA está compuesta de 9,52 % de hélice de alfa, 8,99 % de cadena extendida, 81,48 % de bucle aleatorio. La variante 6 de proteína PSCA está compuesta de 24,56 % de hélice de alfa, 21,93 % de cadena extendida y 53,51 % de bucle aleatorio.
- Se llevó a cabo análisis con respecto a la presencia potencial de dominios transmembrana en las proteínas variantes de PSCA usando diversos algoritmos de predicción transmembrana a los que se accede desde el servidor de biología molecular Expasy localizado en la web en (.expasy.ch/tools/).

Ejemplo 7

Generación de anticuerpos policlonales de PSCA

- Pueden inducirse anticuerpos policlonales en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizador y, si se desea, un adyuvante. Normalmente, se inyectará un agente inmunizador y/o adyuvante en el mamífero mediante 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 contiene características de ser antigénicos y estar disponibles para el reconocimiento por el sistema inmunitario del hospedador inmunizado (véase el ejemplo titulado "Perfiles de Antigenicidad y Estructura Secundaria"). Se predecirá que dichas regiones son hidrófilas, flexibles, en conformaciones de giro beta y están expuestas en la superficie de la proteína.

- Por ejemplo, se usan proteínas o péptidos de fusión bacterianos recombinantes que contienen regiones hidrófilas, flexibles, de giro beta de variantes de proteína PSCA como antígenos para generar anticuerpos policlonales en conejos Blancos de Nueva Zelanda o anticuerpos monoclonales como se describen en el ejemplo titulado "Generación de Anticuerpos Monoclonales (MAB) de PSCA". Por ejemplo, en la variante 1 de PSCA, dichas regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 28-56 y aminoácidos 66-94. Para la variante 3, dichas regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 7-39 y aminoácidos 70-94. Para la variante 4 dichas regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 6-18, aminoácidos 27-39, aminoácidos 103-133 y 177-189. Para la variante 6, dichas regiones incluyen, pero sin limitación, los aminoácidos 19-35 y aminoácidos 57-85. Es útil conjugar al agente inmunizador con una proteína que se sabe que es inmunogénica en el mamífero que se inmuniza. Los ejemplos de dichas 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 4 de PSCA 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 diversos compañeros de proteínas 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, la secuencia de variante 1 de PSCA, los aminoácidos 18-98 se fusionaron con GST usando técnicas recombinantes en el vector de expresión pGEX, se expresaron, purificaron y se usaron para inmunizar tanto conejos como ratones para generar anticuerpos policlonales y monoclonales respectivamente. Dichas proteínas de fusión se purifican a partir de bacterias inducidas usando la matriz de afinidad apropiada.

- Otras proteínas de fusión bacterianas 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 *et al.* eds., 1995; Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N., y Ledbetter, L. (1991) J. Exp. Med. 174, 561-566).

- Además de proteínas de fusión derivadas de bacterias, también se usan antígenos de proteínas expresadas por mamíferos. Estos antígenos se expresan a partir de vectores de expresión de mamíferos tales como los vectores de fusión de Tag5 y Fc (véase la sección titulada "Producción de PSCA Recombinante en Sistemas Eucariotas") y conservan modificaciones postraduccionales tales como glucosilaciones halladas en proteína nativa. En una realización, el ADNc de la variante 1 de PSCA, menos el péptido líder N terminal y anclaje de 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 expresan de forma estable el vector recombinante. Después se usó la proteína PSCA Tag5 purificada como

inmunógeno.

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

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

Para ensayar la reactividad y especificidad de suero inmunitario, tal como suero de conejo derivado de inmunización con una fusión con GST de la proteína variante 3 o 4 de PSCA, el ADNc variante de PSCA de longitud completa respectivo se clona en el 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 sensibilidad específica a proteína variante desnaturalizada usando la técnica de transferencia de Western. Además, el suero inmunitario se ensaya por microscopía de fluorescencia, citometría de flujo e inmunoprecipitación contra células 293T y otras que expresan variante de PSCA recombinantes 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 suero de conejos inmunizados con proteínas de fusión variantes de PSCA, tales como proteínas de fusión de GST y MBP, mediante agotamiento de anticuerpos sensibles a la secuencia del compañero de fusión por pase sobre una columna de afinidad que contiene el compañero fusión solo o en el contexto de una proteína de fusión irrelevante. Por ejemplo, el suero derivado de una proteína de fusión GST-PSCA variante 1 se purifica en primer lugar por pase sobre una columna de proteína GST acoplada covalentemente a matriz AffiGel (BioRad, Hercules, Calif.). El suero se purifica después por afinidad mediante pases sobre una columna compuesta de una proteína de fusión MBP-PSCA acoplada covalentemente a matriz Affigel. El suero se purifica después adicionalmente por cromatografía de afinidad de proteína G para aislar la fracción IgG. Se purifican por afinidad sueros de otros antígenos marcados con His y conejos inmunizados con péptido así como sueros agotados de compañero de fusión mediante pase sobre una matriz de columna compuesta del inmunógeno de la proteína original o péptido libre.

Ejemplo 8

Generación de anticuerpos monoclonales (MAb) de PSCA

En una realización, los Anticuerpos Monoclonales terapéuticos ("MAb") para PSCA y variantes de PSCA comprenden los que reaccionan con epítomos específicos para cada proteína o específicos para secuencias en común entre las variantes que se unirían, se internalizarían, alterarían o modularían la función biológica de PSCA o variantes de PSCA, por ejemplo, las que alterarían la interacción con ligandos y compañeros de unión. Los inmunógenos para generación de dichos MAb incluyen los diseñados para codificar o contener el dominio extracelular o la secuencia de proteína PSCA completa, regiones que se ha predicho que contienen motivos funcionales, y regiones de las variantes de proteína PSCA que se ha predicho que son antigénicas a partir de análisis informático de la secuencia de aminoácidos. Los inmunógenos incluyen péptidos, proteínas bacterianas recombinantes tales como proteínas de fusión GST-PSCA (Figura 8) y proteína de vector pET PSCA marcada con His (Figura 6) y proteínas marcadas con His purificadas expresadas en mamífero (Figura 7) y proteínas de fusión de Fc IgG humanas y murinas. Además, se usan células modificadas técnicamente mediante transducción retroviral para expresar altos niveles de PSCA variante 1, tales como RAT1-PSCA, 293T-PSCA, 3T3-PSCA o 300.19-PSCA para inmunizar ratones (Figura 5).

Para generar Anticuerpos Monoclonales para PSCA, se inmunizaron en primer lugar ratones en la almohadilla plantar (FP) con, normalmente, 5-50 µg de inmunógeno proteico o entre 10^6 y 10^7 células que expresan PSCA mezcladas en un adyuvante adecuado. Los ejemplos de adyuvantes adecuados para inmunizaciones de FP son TiterMax (Sigma) para la inyección de FP inicial seguido de gel de alumbre con Immuneasy (Qiagen). Después de la inyección inicial los ratones se inmunizaron posteriormente dos veces a la semana hasta el momento en que se sacrificaron y se usaron linfocitos B obtenidos del ganglio linfático para fusión.

Durante el protocolo de inmunización, se tomaron muestras sanguíneas de ensayo para controlar el título y la especificidad de la respuesta inmunitaria. En la mayoría de los casos, una vez que se obtuvo la reactividad y especificidad apropiadas como se determinó por análisis de ELISA, transferencia de Western, inmunoprecipitación, microscopía de fluorescencia o citometría de flujo, se llevó a cabo después generación de fusión e hibridoma usando

fusión electrocelular (BTX, ECM2000).

En una realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales designados Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.121 y Ha1-4.37. Los anticuerpos se identificaron y se ha mostrado que reaccionan y se unen con superficie celular o PSCA inmovilizado.

Se generaron MAb para PSCA usando tecnología Xenomouse® en la que los loci de cadena ligera kappa y pesada murina se han inactivado y una mayoría de los loci de inmunoglobulina de cadena ligera kappa y pesada humana se han insertado: se generó Ha1-1.16 después de inmunizar Xenomice que producían gamma 1 humana (13 veces con PSCA-GST); se generó Ha1-5.99 después de inmunizar Xenomice que producían gamma 2 humana 6 veces con células Rat1-PSCA seguido de dos inyecciones con PSCA-tag5; se generaron Ha1-4.117, Ha1-4.37, Ha1-4.120, y Ha1-4.121 después de inmunizar Xenomice que producían gamma 1 humana 6 veces con células Rat1-PSCA seguido de 4 inyecciones con PSCA-tag5. Los MAb anti PSCA, Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120 y Ha1-4.121 se unen con PSCA de superficie celular endógeno expresado en células de xenoinjerto de cáncer de próstata.

Los anticuerpos designados Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.37, Ha1-1.16 y Ha1-4.121 se enviaron (a través de Federal Express) a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 el 4 de mayo de 2004 y se les asignaron los números de Referencia PTA-6703, PTA-6699, PTA-6700, PTA-6702, PTA-6698 y PTA-6701 respectivamente.

Se determinaron las secuencias codificantes de ADN para MAb anti PSCA Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.121 y Ha1-4.37, después de aislar ARNm de las células de hibridoma respectivas con reactivo de Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). Se purificó y cuantificó el ARN total. Se generaron ADNc de primera cadena de ARN total con sensibilización con oligo (dT) 12 18 usando el sistema de Preamplificación Superscript Gibco BRL. Se amplificó ADNc de primera cadena usando cebadores de cadena pesada variable de inmunoglobulina humana, y cebadores de cadena ligera variable de inmunoglobulina humana. Se clonaron productos de PCR en el vector pCRScript (Stratagene, La Jolla). Se secuenciaron varios clones y se determinaron las regiones de cadena pesada y ligera variable. Las secuencias de aminoácidos y ácido nucleico de las regiones de cadena pesada y ligera variables se enumeran en la Figura 2 y la Figura 3. Se muestra alineamiento de anticuerpos de PSCA para secuencias V-D-J de línea germinal en la Figura 4A - Figura 4M.

Ejemplo 9

Exploración e identificación de anticuerpos de PSCA

Se exploraron anticuerpos generados usando los procedimientos expuestos en el ejemplo titulado "Generación de Anticuerpos Monoclonales (MAb) de PSCA" y se identificaron usando una combinación de ensayos incluyendo ELISA, FACS, agrupamiento de epítopos y afinidad por PSCA expresado en la superficie celular.

A. Exploración de MAb humano de PSCA por FACS.

Se realizó exploración de hibridoma primario para MAb para PSCA por FACS. El protocolo fue el siguiente: se añadieron 50 μ l/pocillo de sobrenadante de hibridoma (puro) o anticuerpos purificados (en diluciones en serie) a placas de FACS de 96 pocillos y se mezclaron con células que expresaban PSCA (endógenas o recombinantes, 50.000 células/pocillo). La mezcla se incubó a 4 °C durante dos horas. Al final de la incubación, las células se lavaron con tampón FACS y se incubaron con 100 μ l de anticuerpo de detección (anti hIgG-PE) durante 45 minutos a 4 °C. Al final de la incubación, las células se lavaron con tampón de FACS, se fijaron con Formaldehído y se analizaron usando FACScan. Los datos se analizaron usando software CellQuest Pro. Los histogramas rellenos indican datos de células de control negativo, y los histogramas abiertos representan datos de células positivas para PSCA (Figura 9).

Se transfirieron hibridomas positivos identificados a partir de exploraciones primarias a placas de 24 pocillos y sobrenadantes recogidos para exploraciones de confirmación. Las exploraciones de confirmación incluyeron análisis de FACS en B300.19-PSCA/300.19-neo, Rat1-PSCA/Rat1-neo, PC3-PSCA/neo, SW780 (línea celular de cáncer de vejiga), LAPC9AI (línea celular de cáncer de próstata), HPAC (línea celular de cáncer pancreático) y ensayo de ELISA usando Tag5-PSCA, GST-PSCA, GST-PSCA N-term, Med. C-Term, y pET-PSCA.

B. Análisis de afinidad relativa de MAb humano de PSCA

Los sobrenadantes de hibridoma se ensayaron para determinar su afinidad de unión relativa por PSCA de superficie celular. Los sobrenadantes de hibridoma se diluyeron en serie en tampón de FACS (FB), de μ g/ml a sub ng/ml; y se evaluaron en un ensayo de unión de FACS usando células LAPC9AI. Anticuerpos de alta afinidad proporcionaron valores de IFM altos. Los valores de IFM de cada punto se obtuvieron usando software CellQuest Pro y se usaron para cálculo de afinidad usando software Graphpad Prism (Tabla VII y Tabla VIII): ecuación de Respuesta a Dosis Sigmoidea (pendiente variable). Los resultados del análisis de afinidad relativa se exponen en la Figura 10.

C. Agrupamiento de epítopos

Se agruparon anticuerpos de PSCA de acuerdo con el epítipo evaluando su patrón de unión en células LAPC9AI. Brevemente, se biotiniló una cantidad pequeña de cada uno de los anticuerpos; después se incubó cada uno de los anticuerpos biotinilados con LAPC9AI en presencia de una cantidad en exceso (100 x) de anticuerpos no biotinilados a 4 °C durante 1 hora durante la incubación. En general, una cantidad en exceso de los anticuerpos competirá con anticuerpos biotinilados si se unen con el mismo epítipo. Al final de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con Estreptavidina-PE durante 45 minutos a 4 °C. Después de retirar por lavado la estreptavidina-PE no unida, las células se analizaron usando FACS. Se usaron determinaciones de IFM para análisis de datos (Tabla VII). Como se muestra en la Tabla XI, las células destacadas en amarillo indican autocompetición (100 % de competición), el IFM en estas células es control de fondo para cada anticuerpo biotinilado. Las células sin color indican que los dos anticuerpos compiten entre sí (bajo IFM), alto IFM (destacado en azul) indica que los anticuerpos se unen con dos epítipos distintos. Los anticuerpos que tienen el mismo patrón de unión se unen con el mismo epítipo entre los anticuerpos, Hay 6 grupos de epítipos dentro de los anticuerpos ensayados. La tabla XI muestra que PSCA 4.121 se une con su epítipo único.

Ejemplo 10

Caracterización y expresión de anticuerpos de PSCA

A. Reactividad cruzada con PSCA de mono y PSCA de ratón

Se exploraron MAb y se caracterizaron con respecto a su capacidad para reaccionar con PSCA de origen de ratón y de simio. Esta propiedad es útil para entender las consecuencias de la interacción de MAb de PSCA en células y tejidos cuando se usan modelos animales de ratón y de simio. Se clonaron los genes de PSCA de mono *Cinomolgus* y de ratón, se expresaron en un retrovirus y se infectaron de forma transitoria en células 293-T. Las células 293-T se incubaron con los anticuerpos respectivos usando el siguiente protocolo. Se incubaron anticuerpos de ensayo con células 293-T que expresaban PSCA de mono *Cinomolgus* o murino o células 293T que expresaban en gen de neo solo como un control negativo. Se determinó el reconocimiento específico usando anticuerpo de detección secundario anti hlgG-PE. Se presenta un histograma representativo que describe reactividad cruzada de especies en la Figura 11. El sumario presentado en la Tabla X muestra que todos excepto uno de los anticuerpos anti PSCA humano reaccionan de forma cruzada con PSCA de mono y solamente un anticuerpo anti PSCA humano reacciona de forma cruzada con PSCA de ratón.

B. Determinación de afinidad por FACS

Se ensayó un panel de siete (7) anticuerpos anti PSCA humano con respecto a su afinidad de unión por PSCA en células SW780, una línea celular de cáncer de vejiga humana que expresa alto nivel de PSCA. Se incubaron 23 diluciones en serie 1:2 de anticuerpos purificados con células SW780 (50.000 células por pocillo) durante una noche a 4 °C con concentración final de 167 nM a 0,01 pM. Al final de la incubación, las células se lavaron y se incubaron con anticuerpo de detección anti hlgG-PE durante 45 min a 4 °C. Después de lavar los anticuerpos de detección no unidos, las células se analizaron por FACS; se obtuvieron los valores de IFM de cada punto usando software CellQuest Pro y se usaron para cálculo de afinidad usando software Graphpad Prism: ecuación de Respuesta a Dosis Sigmoidea (pendiente variable) (Tabla VII y Tabla VIII). Se exponen los valores de afinidad de los siete (7) anticuerpos en la Tabla IX.

Ejemplo 11

Internalización de anticuerpos de PSCA

Se estudió la internalización de Ha1-4.121 usando células PC3-PSCA. Brevemente, se incubó Ha1-4.121 con células a 4 °C durante 90 min para permitir la unión de los anticuerpos con la superficie celular. Las células se dividieron después en dos grupos y se continuó la incubación a 37 °C para permitir la internalización de anticuerpos o a 4 °C como controles (sin internalización). Se empleó un lavado ácido después de incubación a 37 °C/4 °C para retirar PSCA 4.121 unido en superficie celular. La permeabilización posterior permitió la detección de anticuerpos unidos a PSCA internalizado. Después de incubación con anticuerpos de detección secundarios, las células se analizaron usando FACS o se observaron con microscopio de fluorescencia. Aproximadamente 30 % de Ha1-4.121 se internalizaron después de incubación a 37 °C durante dos horas (Figura 12).

Ejemplo 12

Destrucción secundaria mediada por anticuerpos

Los anticuerpos para PSCA median en la destrucción dependiente de saporina en células que expresan PSCA. Se sembraron células que expresaban B300.19 - PSCA (750 células/pocillo) en una placa de 96 pocillos el día 1. Al día siguiente se añadió un volumen igual de medio que contenía concentración 2X del anticuerpo primario indicado junto con un exceso doble de anticuerpo policlonal anti humano (Zap Hum) o anticabra (Zap de cabra) conjugado con

toxina saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) a cada pocillo. Se permitió que las células se incubaran durante 5 días a 37 grados C. Al final del periodo de incubación, se añadió MTS (Promega) a cada pocillo y se continuó la incubación durante 4 horas adicionales. Se determinó la DO a 450 nm. Los resultados en la Figura 13(A) muestran que los anticuerpos de PSCA HA1-4.121 y HA1-4.117 mediaban en la citotoxicidad dependiente de saporina en células B300.19-PSCA mientras que un anticuerpo de control, IgG1 humano no específico, no tenía ningún efecto. Los resultados en la Figura 13(B) muestran que la adición de un anticuerpo conjugado con saporina secundaria que no reconocía Fc humano, no conseguía mediar en la citotoxicidad (Figura 13(A) y Figura 13(B)). Estos resultados indican que los fármacos o las proteínas citotóxicas pueden suministrarse de forma selectiva a células que expresan PSCA usando un MAb anti PSCA apropiado.

Ejemplo 13

Citotoxicidad mediada por inmunidad de anticuerpos

Se evaluaron anticuerpos de PSCA para determinar su capacidad para mediar en la citotoxicidad dependiente de inmunidad. Se diluyeron anticuerpos de PSCA (0-50 µg/ml) con tampón de RHB (RPMI 1640, Gibco Life Technologies, HEPES 20 mM). Se lavaron células que expresaban B300.19-PSCA en tampón de RHB y se resuspendieron a una densidad de 10⁶ células/ml. En un ensayo típico, se añadieron 50 µl de anticuerpo de PSCA, 50 µl de suero de complemento de conejo diluido (Cedarlane, Ontario, Can) y 50 µl de una suspensión celular juntos en una placa de 96 pocillos de cultivo tisular de fondo plano. La mezcla se incubó durante 2 h a 37 °C en un incubador de CO₂ al 5 % para facilitar la lisis celular mediada por complemento. A continuación, se añadieron 50 µl de Azul de Alamar (Biosource Intl. Camarillo, CA) a cada pocillo y la incubación continuó durante 4-5 horas adicionales a 37 °C. La fluorescencia en cada pocillo se leyó usando un fluorímetro de 96 pocillos con excitación a 530 nm y emisión a 590 nm. Los resultados muestran que los anticuerpos de PSCA que tenían un isotipo Ig1 (HA1-4.121) o un isotipo IgG2 (HA1-5.99.1) pero no un isotipo IgG4 (HA1-6.46) fueron capaces de mediar en la lisis dependiente de complemento (Figura 14).

La ADCC (Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpo) es un ataque lítico mediado por inmunidad en células unidas con un anticuerpo dirigido a un antígeno en la superficie celular específica. En este caso es PSCA. Las células inmunitarias reconocen la parte Fc del anticuerpo mediante unión con receptores Fcγ en la superficie de leucocitos, monocitos y linfocitos NK que desencadenan un ataque lítico que da como resultado la muerte celular. La capacidad de los anticuerpos de PSCA para mediar en esta reacción puede evaluarse marcando células tumorales *in vitro* con ⁵¹Cr, europio o una molécula fluorescente e incubándolas en presencia de MAb de PSCA humanos junto con células mononucleares de sangre periférica. La lisis específica de las células tumorales puede determinarse midiendo el porcentaje de lisis de las células tumorales diana. Criterios de valoración comunes que se determinan incluyen la liberación de radiactividad, europio o colorante fluorescente de las células muertas usando un método de detección apropiado. Como alternativa, puede medirse la liberación de una enzima intracelular tal como lactato deshidrogenasa (LDH).

Ejemplo 14

Generación de fragmentos F(Ab')₂

La generación de fragmentos F(Ab')₂ de MAb es útil para estudiar los efectos de moléculas de MAb que conservan su sitio de unión a antígeno bivalente pero carecen del dominio Fc efector inmunitario en modelos terapéuticos *in vitro* e *in vivo*. Se incubaron 20 mg de MAb Ha1-4.121 en tampón de acetato sódico 20 mM pH 4,5 con y sin pepsina inmovilizada (Perfore. Rockford IL) durante los tiempos indicados. Se retiraron MAb intacto y fragmentos Fc digeridos por cromatografía de proteína A. Se muestra en la Figura 15 un gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE de MAb no reducido no digerido intacto, alícuotas no reducidas de material digerido tomado en los momentos indicados y una muestra reducida del producto de F(ab')₂ digerido final. Este reactivo puede usarse para tratar animales que portan tumores de expresión de PSCA. La actividad antitumoral observada con este fragmento de anticuerpo puede distinguir la actividad biológica intrínseca de la actividad mediada por mecanismos dependientes de inmunidad.

Ejemplo 15

Expresión de anticuerpos humanos usando métodos de ADN recombinante

Para expresar MAb anti PSCA de forma recombinante en células transfectadas, se clonaron secuencias de cadena pesada y ligera variables anti PSCA cadena arriba de las regiones constantes de cadena pesada humana IgG1 y cadena ligera Igκ respectivamente. Los casetes de cadena pesada y cadena ligera humanas anti PSCA completos se clonaron cadena abajo del promotor/potenciador de CMV en un vector de clonación. Se incluyó un sitio de poliadenilación cadena abajo de la secuencia codificante de MAb. Las construcciones que expresaban MAb anti PSCA recombinantes se transfectaron en células 293T, Cos y CHO. El anticuerpo HA1-4.121 secretado de las células 293-T recombinantes se evaluó con respecto a unión con PSCA de superficie celular en la Figura Pia-3A y

se comparó con el mismo anticuerpo producido a partir del hibridoma original (Figura 16).

Ejemplo de referencia 16

5 Ensayos de unión de HLA de clase I y clase II

Se realizaron ensayos de unión de HLA de clase I y clase II usando moléculas de HLA purificadas de acuerdo con protocolos desvelados (por ejemplo, publicaciones de PCT WO 94/20127 y WO 94/03205; Sidney *et al.*, Current Protocols in Immunology 18.3.1 (1998); Sidney, *et al.*, J. Immunol. 154: 247 (1995); Sette, *et al.*, Mol. Immunol. 31: 813 (1994)). Brevemente, se incuban moléculas del MHC purificadas (de 5 a 500 nM) con diversos inhibidores peptídicos no marcados y péptidos sonda radiomarcados con ¹²⁵I 1-10 nM. Después de la incubación, se separan los complejos de MHC-péptido de péptido libre por filtración en gel y se determina la fracción de péptido unido. Normalmente, en experimentos preliminares, cada preparación de MHC se titula en presencia de cantidades fijas de péptidos radiomarcados para determinar la concentración de moléculas de HLA necesarias para unirse con el 10-20 % de la radiactividad total. Todos los ensayos posteriores de inhibición y unión directa se realizan usando estas concentraciones de HLA.

Ya que en estas condiciones $[marcador] < [HLA]$ y $CI_{50} \geq [HLA]$, los valores de CI_{50} medidos son aproximaciones razonables de los verdaderos valores de KD. Los inhibidores peptídicos se ensayan normalmente a concentraciones que varían de 120 µg/ml a 1,2 ng/ml, y se ensayan en de dos a cuatro experimentos completamente independientes. Para permitir la comparación de los datos obtenidos en diferentes experimentos, se calcula una cifra de unión relativa para cada péptido dividiendo la CI_{50} de un control positivo para inhibición por CI_{50} para cada péptido ensayado (normalmente versiones no marcadas del péptido sonda radiomarcado). Para fines de la base de datos, y comparaciones entre experimentos, se compilan valores de unión relativos. Estos valores pueden posteriormente convertirse de nuevo a valores de CI_{50} nM dividiendo la CI_{50} nM de los controles positivos para inhibición por la unión relativa del péptido de interés. Este método de compilación de datos es preciso y uniforme para comparar péptidos que se han ensayados en diferentes días, o con diferentes lotes de MHC purificado.

Pueden usarse ensayos de unión como se ha perfilado anteriormente para analizar péptidos portadores de supermotivo de HLA y/o motivo de HLA (véase Tabla IV).

Ejemplo de referencia 17

35 Construcción de plásmidos de ADN multiepitópicos de "minigén"

Este ejemplo analiza la construcción de un plásmido de expresión de minigén. Los plásmidos de minigenes pueden, por supuesto, contener diversas configuraciones de epítomos o análogos epitópicos de linfocitos B, CTL y/o HTL como se describe en el presente documento.

40 Un plásmido de expresión de minigén incluye normalmente múltiples epítomos peptídicos de CTL y HTL. En el presente ejemplo, se usan epítomos peptídicos que portan supermotivos de HLA-A2, A3, B7 y epítomos peptídicos que portan motivos de HLA-A1 y A24 junto con epítomos portadores de supermotivo de DR y/o epítomos DR3. Se seleccionan PSCA derivados de epítomos peptídicos portadores de supermotivos o motivos de HLA de clase I de modo que se representen múltiples motivos/supermotivos para asegurar una cobertura de población amplia. De forma similar, se seleccionan epítomos de HLA de clase II de PSCA para proporcionar cobertura de población amplia, es decir tanto epítomos portadores de supermotivo de HLA DR-1-4-7 como epítomos portadores de motivos de HLA DR-3 se seleccionan para inclusión en la construcción de minigén. Los epítomos de CTL y HTL seleccionados se incorporan después en un minigén para expresión en un vector de expresión.

50 Dicha construcción puede incluir adicionalmente secuencias que dirigen los epítomos de HTL al retículo endoplásmico. Por ejemplo, la proteína li puede fusionarse con uno o más epítomos de HTL como se describe en la técnica, en los que la secuencia CLIP de la proteína li se retira y se reemplaza con una secuencia epitópica de HLA de clase II de modo que el epítomo de HLA de clase II se dirija al retículo endoplásmico, en el que el epítomo se une con una molécula de HLA de clase II.

55 Este ejemplo ilustra los métodos para usar para la construcción de un plásmido de expresión portador de minigén. Otros vectores de expresión que pueden usarse para composiciones de minigenes están disponibles y se conocen por los expertos en la materia.

60 El plásmido de ADN de minigén de este ejemplo contiene una secuencia Kozak consenso y una secuencia señal de cadena ligera Ig kappa murina consenso seguida de epítomos de CTL y/o HTL seleccionados de acuerdo con principios desvelados en el presente documento. La secuencia codifica una fase abierta de lectura fusionada con el marcador epitópico de anticuerpo Myc y His codificado por el vector pcDNA 3.1 Myc-His.

65

Se sintetizan oligonucleótidos solapantes que pueden, por ejemplo, promediar aproximadamente 70 nucleótidos de longitud con solapamientos de 15 nucleótidos, y se purifican por HPLC. Los oligonucleótidos codifican los epítomos peptídicos seleccionados así como nucleótidos enlazadores apropiados, secuencia de Kozak y secuencia señal. El minigén multiepitépico final se ensambla extendiendo los oligonucleótidos solapantes en tres conjuntos de reacciones usando PCR. Se usa una máquina de PCR Perkin/Elmer 9600 y se realizan un total de 30 ciclos usando las siguientes condiciones: 95 °C durante 15 segundos, temperatura de hibridación (5° por debajo de la T_m calculada inferior de cada par de cebadores) durante 30 segundos y 72 °C durante 1 minuto.

Por ejemplo, se preparó un minigén de la siguiente manera. Para una primera reacción de PCR, se hibridan y extienden 5 µg de cada uno de los dos oligonucleótidos: en un ejemplo que usa ocho oligonucleótidos, es decir, cuatro pares de cebadores, los oligonucleótidos 1+2, 3+4, 5+6 y 7+8 se combinan en reacciones de 100 µl que contienen tampón de polimerasa Pfu (1x= KCL 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, Triscloruro 20 mM, pH 8,75, MgSO₄ 2 mM, Triton X-100 0,1 %, BSA 100 µg/ml), 0,25 mM de cada dNTP y 2,5 U de polimerasa Pfu. Los productos diméricos de longitud completa se purifican en gel, y dos reacciones que contienen el producto de 1+2 y 3+4, y el producto de 5+6 y 7+8 se mezclan, se hibridan y se extienden durante 10 ciclos. Después se mezclan la mitad de las dos reacciones y se llevan a cabo 5 ciclos de hibridación y extensión antes de añadirse cebadores flanqueantes para amplificar el producto de longitud completa. El producto de longitud completa se purifica en gel y se clona en pCR-blunt (Invitrogen) y se exploran clones individuales por secuenciación.

Ejemplo 18

La construcción plasmídica y el grado en que induce inmunogenicidad.

El grado en que una construcción plasmídica, por ejemplo un plásmido construido de acuerdo con el ejemplo anterior, es capaz de inducir la inmunogenicidad se confirma *in vitro* determinando la presentación epitópica por APC después de transducción o transfección de la APC con una construcción de ácido nucleico que expresa epítomos. Dicho estudio determina la "antigenicidad" y permite el uso de APC humana. El ensayo determina la capacidad del epítomo para presentarse por la APC en un contexto que se reconoce por un linfocito T cuantificando la densidad de complejos de HLA de clase I-epítomo en la superficie celular. Puede realizarse cuantificación midiendo directamente la cantidad de péptido eluido de la APC (véase, por ejemplo, Sijts *et al.*, J. Immunol. 156: 683-692, 1996; Demotz *et al.*, Nature 342: 682-684, 1989); o puede estimarse el número de complejos de HLA de clase I-péptido midiendo la cantidad de lisis o liberación de linfocinas inducida por células diana enfermas o transfectadas, y determinando después la concentración de péptido necesario para obtener niveles equivalentes de lisis o liberación de linfocinas (véase, por ejemplo, Kageyama *et al.*, J. Immunol. 154: 567-576, 1995).

Como alternativa, la inmunogenicidad se confirma mediante inyecciones *in vivo* en ratones y posterior evaluación *in vitro* de la actividad de CTL y HTL, que se analizan usando ensayos de citotoxicidad y proliferación, respectivamente, como se detalla, por ejemplo, en Alexander *et al.*, Immunity 1: 751-761, 1994.

Por ejemplo, para confirmar la capacidad de una construcción de minigén de ADN que contiene al menos un péptido de supermotivo HLA-A2 para inducir CTL *in vivo*, se inmunizan ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b, por ejemplo, por vía intramuscular con 100 µg de ADNc desnudo. Como un medio para comparar el nivel de CTL inducidos por inmunización con ADNc, también se inmuniza un grupo de control de animales con una composición peptídica real que comprende múltiples epítomos sintetizados como un único polipéptido como se codificarían por el minigén.

Los esplenocitos de animales inmunizados se estimulan dos veces con cada una de las composiciones respectivas (epítomos peptídicos codificados en el minigén o el péptido poliepitépico), después se ensayan con respecto a actividad citotóxica específica de péptido en un ensayo de liberación de ⁵¹Cr. Los resultados indican la magnitud de la respuesta de CTL dirigida contra el epítomo restringido a A2, lo que indica de este modo la inmunogenicidad *in vivo* de la vacuna de minigén y la vacuna poliepitépica.

Se ha descubierto, por lo tanto, que el minigén induce respuestas inmunitarias dirigidas hacia los epítomos peptídicos de supermotivo HLA-A2 al igual que la vacuna de péptido poliepitépico. También se realiza un análisis similar usando otros modelos de ratón transgénicos de HLA-A3 y HLA-B7 para evaluar la inducción de CTL por epítomos de motivo o supermotivo HLA-A3 y HLA-B7 por lo que también se descubre que el minigén induce respuestas inmunitarias apropiadas dirigidas a los epítomos proporcionados.

Para confirmar la capacidad de un minigén que codifica epítomo de clase II para inducir HTL *in vivo*, se inmunizan ratones transgénicos DR, o para los epítomos que reaccionan de forma cruzada con la molécula del MHC de ratón apropiado, ratones con I-A^b restringido, por ejemplo, por vía intramuscular con 100 µg de ADN plasmídico. Como medio para comparar el nivel de HTL inducidos por inmunización con ADN, también se inmuniza un grupo de animales de control con una composición peptídica real emulsionada en adyuvante completo de Freund. Se purifican linfocitos T CD4+, es decir HTL, de esplenocitos de animales inmunizados y se estimulan con cada una de las composiciones respectivas (péptidos codificados en el minigén). La respuesta de HTL se mide usando un ensayo de proliferación de incorporación de ³H-timidina (véase, por ejemplo, Alexander *et al.* Immunity 1: 751-761, 1994). Los

resultados indican la magnitud de la respuesta de HTL, demostrando de este modo la inmunogenicidad *in vivo* del minigén.

Los minigenes de ADN, construidos como se ha descrito en el ejemplo previo, también pueden confirmarse como una vacuna en combinación con un agente de refuerzo usando un protocolo de sensibilización y refuerzo. El agente de refuerzo puede consistir en proteína recombinante (por ejemplo, Barnett *et al.*, Aids Res. and Human Retroviruses 14, Suplemento 3: S299-S309, 1998) o vaccinia recombinante, por ejemplo, que expresa un minigén o ADN que codifica la proteína completa de interés (véase, por ejemplo, Hanke *et al.*, Vaccine 16: 439-445, 1998; Sedegah *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95: 7648-53, 1998; Hanke y McMichael, Immunol. Letters 66: 177-181, 1999; y Robinson *et al.*, Nature Med. 5: 526-34, 1999).

Por ejemplo, la eficacia del minigén de ADN usado en un protocolo de sensibilización y refuerzo se evalúa inicialmente en ratones transgénicos. En este ejemplo, se inmunizan ratones transgénicos A2.1/K^b IM con 100 µg de un minigén de ADN que codifica los péptidos inmunogénicos incluyendo al menos un péptido portador de supermotivo de HLA-A2. Después de un periodo de incubación (que varía de 3 a 9 semanas), los ratones se refuerzan IP con 10⁷ ufp/ratón de un virus vaccinia recombinante que expresa la misma secuencia codificada por el minigén de ADN. Los ratones de control se inmunizan con 100 µg de ADN o vaccinia recombinante sin la secuencia de minigén, o con ADN que codifica el minigén, pero sin el refuerzo de vaccinia. Después de un periodo de incubación adicional de dos semanas, los esplenocitos de los ratones se ensayan inmediatamente con respecto a actividad específica de péptido en un ensayo ELISPOT. Adicionalmente, los esplenocitos se estimulan *in vitro* con los epítomos peptídicos restringidos a A2 codificados en el minigén y vaccinia recombinante, después se ensayan con respecto a actividad específica de péptido en un ELISA de IFN alfa, beta y/o gamma.

Se ha descubierto que el minigén utilizado en un protocolo de sensibilización-refuerzo induce mayores respuestas inmunitarias hacia los péptidos del supermotivo HLA-A2 que con ADN solamente. Dicho análisis también puede realizarse usando modelos de ratón transgénicos HLA-A11 o HLA-B7 para evaluar la inducción de CTL por epítomos de motivo o supermotivo HLA-A3 o HLA-B7. El uso de protocolos de sensibilización y refuerzo en seres humanos se describe posteriormente en el ejemplo titulado "Inducción de Respuestas de CTL Usando un Protocolo de Sensibilización y Refuerzo".

Ejemplo de referencia 19

Composiciones de vacuna poliepitópicas de múltiples antígenos

Los epítomos peptídicos de PSCA de la presente invención se usan junto con epítomos de otros antígenos asociados a tumor diana, para crear una composición de vacuna que es útil para la prevención o el tratamiento de cáncer que expresa PSCA y otros antígenos tales. Por ejemplo, puede proporcionarse una composición de vacuna como un único polipéptido que incorpora múltiples epítomos de PSCA así como antígenos asociados a tumor que con frecuencia se expresan con un cáncer diana asociado con la expresión de PSCA, o puede administrarse como una composición que comprende un cóctel de uno o más epítomos discretos. Como alternativa, la vacuna puede administrarse como una construcción de minigén o como células dendríticas que se han cargado con los epítomos peptídicos *in vitro*.

Ejemplo de referencia 20

Uso de péptidos para evaluar una respuesta inmunitaria

Pueden usarse péptidos de la invención para analizar una respuesta inmunitaria con respecto a la presencia de anticuerpos, CTL o HTL específicos dirigidos a PSCA. Dicho análisis puede realizarse de una manera descrita en Ogg *et al.*, Science 279: 2103-2106, 1998. En este ejemplo, se usan péptidos de acuerdo con la invención como un reactivo para fines de diagnóstico o pronóstico, no como un inmunógeno.

En este ejemplo se usan complejos tetraméricos de antígenos de leucocitos humanos altamente sensibles ("tetrámeros") para un análisis de sección transversal de, por ejemplo, frecuencias de CTL específicos de PSCA HLA-A*0201 de individuos positivos para HLA A*0201 en estadios diferentes de enfermedad o después de inmunización que comprende un péptido de PSCA que contiene un motivo A*0201. Se sintetizan complejos tetraméricos como se ha descrito (Musey *et al.*, N. Engl. J. Med. 337: 1267, 1997). Brevemente, se sintetizan cadena pesada de HLA purificada (A*0201 en este ejemplo) y microglobulina β2 por medio de un sistema de expresión procarionota. La cadena pesada se modifica por delección de la cola citosólica transmembrana y adición COOH terminal de una secuencia que contiene un sitio de biotinylación enzimática BirA. La cadena pesada, microglobulina β2, y péptido se repliegan por dilución. El producto replegado de 45 kD se aísla por cromatografía líquida de proteínas rápida y después se biotinyla por BirA en presencia de biotina (Sigma, St. Louis, Missouri), adenosin 5' trifosfato y magnesio. Se añade conjugado de estreptavidina-ficoeritrina en una relación molar 1:4, y el producto tetramérico se concentra a 1 mg/ml. El producto resultante se denomina tetrámero-ficoeritrina.

Para el análisis de muestras de sangre de pacientes, se centrifugan aproximadamente un millón de PBMC a 300 g durante 5 minutos y se resuspenden en 50 μ l de solución salina tamponada con fosfato fría. Se realiza análisis tricolor con el tetrámero-ficoeritrina, junto con anti CD8-tricolor, y anti CD38. Las PBMC se incuban con tetrámero y anticuerpos en hielo durante 30 a 60 minutos y después se lavan dos veces antes de la fijación en formaldehído. Se aplican selecciones para contener > 99,98 % de muestras de control. Los controles para los tetrámeros incluyen tanto individuos A*0201 negativos como donantes no enfermos A*0201 positivos. El porcentaje de células teñidas con el tetrámero se determina después por citometría de flujo. Los resultados indican el número de células en la muestra de PBMC que contienen CTL de epítipo restringido, lo que indica de este modo fácilmente el alcance de la respuesta inmunitaria al epítipo de PSCA, y por lo tanto el estado de exposición a PSCA, o exposición a una vacuna que induce una respuesta protectora o terapéutica.

Ejemplo 21

Inducción de respuestas inmunitarias usando un protocolo de sensibilización y refuerzo

También puede usarse un protocolo de sensibilización y refuerzo similar en su principio subyacente al usado para confirmar la eficacia de una vacuna de ADN en ratones transgénicos, tal como se han descrito anteriormente en el ejemplo titulado "La Construcción Plasmídica y el Grado en que Induce Inmunogenicidad", para la administración de la vacuna a seres humanos. Dicho régimen de vacuna puede incluir una administración inicial de, por ejemplo, ADN desnudo seguido de un refuerzo usando virus recombinante que codifica la vacuna, o proteína/polipéptido recombinante o una mezcla peptídica administrada en un adyuvante.

Por ejemplo, la inmunización inicial puede realizarse usando un vector de expresión, tal como el construido en el ejemplo titulado "Construcción de Plásmidos de ADN Multiepitópicos de "Minigén"" en forma de ácido nucleico desnudo administrado IM (o SC o ID) en las cantidades de 0,5-5 mg en múltiples sitios. El ácido nucleico (0,1 a 1000 μ g) también puede administrarse usando una pistola génica. Después de un periodo de incubación de 3-4 semanas, se administra a continuación una dosis de refuerzo. El refuerzo puede ser virus de viruela aviar recombinante administrado a una dosis de $5 \cdot 10^7$ a $5 \cdot 10^9$ ufp. También puede usarse un virus recombinante alternativo, tal como un MVA, viruela de canario, adenovirus o virus adenoasociado, para el refuerzo, o puede administrarse la proteína polipeptídica o una mezcla de los péptidos. Para evaluación de la eficacia de vacuna, se obtienen muestras de sangre del paciente antes de la inmunización así como a intervalos después de la administración de la vacuna inicial y dosis de refuerzo de la vacuna. Se aíslan células mononucleares de sangre periférica de sangre heparinizada nueva por centrifugación de gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, se separan en alícuotas en medio de congelación y se almacenan congeladas. Las muestras se ensayan con respecto a actividad de CTL y HTL.

El análisis de los resultados indica que se genera una magnitud de respuesta suficiente para conseguir una inmunidad terapéutica o protectora contra PSCA.

Ejemplo 22

Polinucleótidos complementarios

Se usan secuencias complementarias de las secuencias codificantes de PSCA (Figura 1 o Figura 3), 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, se usa esencialmente el mismo procedimiento con fragmentos de secuencia mayores o menores. 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 un oligonucleótido complementario de la secuencia 5' más singular y se usa para prevenir la unión del promotor con la secuencia codificante. Para inhibir la traducción, se diseña un oligonucleótido complementario para inhibir la unión ribosómica con un transcrito que codifique PSCA.

Ejemplo 23

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 inmunoafinidad usando anticuerpos específicos para PSCA. Se construye una columna de inmunoafinidad acoplado covalentemente un 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.

Se pasan medios que contienen PSCA sobre la columna de inmunoafinidad, y la columna se lava en condiciones que permitan la absorción preferente de PSCA (por ejemplo, tampones de alta fuerza iónica en presencia de detergente). La columna se eluye en condiciones que alteren la unión de anticuerpo/PSCA (por ejemplo, un tampón de pH 2 a pH 3, o una alta concentración de un caótropro, tal como urea o ión de tiocianato), y se recoge GCR.P.

Ejemplo 24Identificación de moléculas que interaccionan con PSCA

5 PSCA, o fragmentos biológicamente activos del mismo, se marcan con reactivo 121 1 Bolton-Hunter. (Véase, por ejemplo, Bolton *et al.* (1973) *Biochem. J.* 133: 529). Se incuban moléculas candidatas previamente dispuestas en los pocillos de una placa multipocillo con el PSCA marcado, se lavan y se ensaya cualquier pocillo con complejo de PSCA marcado. Se usan los datos obtenidos usando concentraciones diferentes de PSCA para calcular los valores con respecto al número, afinidad y asociación de PSCA con las moléculas candidatas.

10

Ejemplo de referencia 25Ensayo *in vivo* para promoción del crecimiento tumoral de PSCA

15 El efecto de la proteína PSCA en el crecimiento de células tumorales se evalúa *in vivo* evaluando el desarrollo y crecimiento tumoral de células que expresan o carecen de PSCA. Por ejemplo, se inyecta a ratones SCID por vía subcutánea en cada flanco 1×10^6 de las líneas celulares 3T3, o de cáncer de próstata (por ejemplo células PC3) que contienen vector vacío tkNeo o PSCA. Pueden usarse al menos dos estrategias: (1) expresión de PSCA constitutiva bajo la regulación de un promotor tal como un promotor constitutivo obtenido de los genomas de virus tales como virus del poliovirus, virus de la viruela aviar (documento UK 2.211.504 publicado el 5 de julio de 1989), adenovirus, (tal como Adenovirus 2), virus del 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 dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras, y (2) expresión regulada bajo el control de un sistema de vector inducible, tal como ecdisona, tetraciclina, etc., siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras. Después se controla el volumen tumoral por medición por calibrador en el momento de aparición de tumores palpables y se sigue a lo largo del tiempo para determinar si las células que expresan PSCA crecen a una velocidad más rápida y si los tumores producidos por células que expresan PSCA demuestran características de agresividad alterada (por ejemplo metástasis potenciada, vascularización, sensibilidad reducida a fármacos quimioterapéuticos).

30

Además, pueden implantarse a ratones 1×10^5 de las mismas células de forma ortotópica para determinar si PSCA tiene un efecto en el crecimiento local en la próstata, y si PSCA afecta a la capacidad de las células para metastatizar, específicamente a ganglios linfáticos, y hueso (Miki T *et al.*, *Oncol Res.* 2001; 12: 209; Fu X *et al.*, *Int J Cancer.* 1991, 49: 938). El efecto de PSCA en la formación de tumores de hueso y el crecimiento puede evaluarse inyectando células tumorales de próstata por vía intratibial.

35

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

40

Ejemplo 26Inhibición mediada por anticuerpo monoclonal de PSCA de tumores *in vivo*

45 La expresión significativa de PSCA en la superficie celular de tejidos tumorales, junto con su expresión restrictiva en tejidos normales hace a PSCA una buena diana para la terapia de anticuerpos. De forma similar, PSCA es una diana para inmunoterapia basada en linfocitos T. Por lo tanto, la eficacia terapéutica de MAb anti PSCA en modelos de ratón de xenoinjerto de cáncer de próstata humana y modelos de ratón de xenoinjerto de cáncer pancreático humano se evalúa usando líneas celulares recombinantes tales como PC3-PSCA y 3T3-PSCA (véase, por ejemplo, Kaighn, M.E., *et al.*, *Invest Urol.* 1979. 17(1): 16-23), así como modelos de xenoinjerto de próstata humana tales como LAPC 9AD (Saffran *et al* PNAS 1999, 10: 1073-1078).

50

Se estudia la eficacia de anticuerpo en el crecimiento tumoral y la formación de metástasis, por ejemplo, en un modelo de xenoinjerto de cáncer pancreático o de próstata ortotópico de ratón. Los anticuerpos pueden no estar conjugados, como se analiza en el este ejemplo, o pueden conjugarse con una modalidad terapéutica, como se aprecia en la técnica. Los MAb anti PSCA inhiben la formación de xenoinjertos tanto pancreáticos como de próstata. Los MAb anti PSCA también retardan el crecimiento de tumores ortotópicos establecidos y supervivencia prolongada de ratones portadores de tumores. Estos resultados indican la utilidad de MAb anti PSCA en el tratamiento de cáncer de próstata de estadios locales y avanzados, cáncer pancreático y los cánceres expuestos en la Tabla I (véase, por ejemplo, Saffran, D., *et al.*, PNAS 10: 1073-1078 o la URL web pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698).

60

La administración de los MAb anti PSCA condujo al retardo del crecimiento de tumores ortotópicos establecidos y la inhibición de la metástasis a sitios distantes, dando como resultado una prolongación significativa de la supervivencia de ratones portadores de tumores. Estos estudios indican que PSCA es una diana atractiva para inmunoterapia y demuestran el potencial terapéutico de MAb anti PSCA para el tratamiento de cáncer de próstata y

65

pancreático local y metastásico. Este ejemplo demuestra que los anticuerpos monoclonales de PSCA no conjugados son eficaces para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumor de próstata humano que han crecido en ratones SCID; en consecuencia también es eficaz una combinación de dichos anticuerpos monoclonales eficaces.

5 Inhibición de tumor usando múltiples MAb de PSCA

Materiales y métodos

Anticuerpos monoclonales de PSCA:

10 Se han inducido anticuerpos monoclonales contra PSCA como se describe en el ejemplo titulación "Generación de Anticuerpos Monoclonales de PSCA (MAb)". Los anticuerpos se caracterizan por ELISA, transferencia de Western, FACS e inmunoprecipitación con respecto a su capacidad para unirse con PSCA. Los datos de mapeo de epítomos para los MAb anti PSCA, como se determina por ELISA y análisis de Western, reconocen epítomos en la proteína PSCA. Se realiza análisis inmunohistoquímico de tejidos y células de cáncer de próstata con estos anticuerpos.

15 Los anticuerpos monoclonales se purifican a partir de líquido ascítico o sobrenadantes de cultivo tisular de hibridoma mediante cromatografía de Sepharose de Proteína G o Proteína A, se dializan frente a PBS, se esterilizan por filtración y se almacenan a -20 °C. Se realizan determinaciones de proteínas 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 xenoinjertos de tumor LAPC9 AD y HPAC.

Líneas celulares y xenoinjertos

25 Se mantienen líneas celulares de cáncer de próstata, línea celular PC3 y LNCaP así como la línea de fibroblastos NIH 3T3 (Colección Americana de Cultivos Tipo) en RPMI y DMEM respectivamente, complementado con L-glutamina y FBS al 10 %.

30 Se generan poblaciones celulares de PC3-PSCA y 3T3-PSCA por transferencia génica retroviral como se describe en Hubert, R. S., *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 1999. 96(25): 14523.

35 El xenoinjerto de 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 de ICR (SCID) macho de 6 a 8 semanas de edad (Taconic Farms) mediante implante trocar s.c. (Craft, N., *et al.*, Nat Med. 1999, 5: 280). Se preparan suspensiones de células individuales de células tumorales LAPC-9 como se describe en Craft, *et al.*

Modelos de xenoinjerto de ratón.

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

50 Se realizan inyecciones ortotópicas con anestesia usando ketamina/xilacina. Para estudios ortotópicos de próstata, se realiza una incisión a través del abdomen para exponer la próstata y se inyectan células tumorales en LAPC o PC3 (2×10^6) mezcladas con Matrigel en la cápsula de la próstata en un volumen de 10 μ l. Para controlar el crecimiento tumoral, los ratones se palpan y se recoge sangre semanalmente para medir los niveles de PSA. Los ratones se segregan en grupos para los tratamientos apropiados, con anti PSCA o MAb de control que se inyectan i.p.

Los MAb anti PSCA inhiben el crecimiento de tumores de cáncer de xenoinjerto que expresan PSCA

60 El efecto de MAb anti PSCA en la formación de tumores se ensaya usando modelos ortotópicos de HPAC y LAPC9. En comparación con el modelo de tumor s.c., el modelo ortotópico, que requiere la inyección de células tumorales directamente en el páncreas o la próstata de ratón, respectivamente, da como resultado un crecimiento tumoral local, desarrollo de metástasis en sitios distantes, deterioro de la salud de ratón y posterior muerte (Saffran, D., *et al.*, PNAS mencionado anteriormente). Estas características hacen al modelo ortotópico más representativo de la progresión de enfermedad humana y permitieron a los inventores seguir el efecto terapéutico de MAb en criterios de valoración clínicamente relevantes.

65 En consecuencia, se inyectan células tumorales en la próstata de ratón, y dos días después los ratones se segregan

en dos grupos y se tratan con: a) 250-1000 µg de Ab anti PSCA, o b) anticuerpo de control tres veces por semana durante de dos a cinco semanas.

Una ventaja principal de los modelos de cáncer ortotópicos es la capacidad de estudiar el desarrollo de metástasis. La formación de metástasis en ratones que portan tumores ortotópicos establecidos se estudia 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 *et al.*, Cancer Detect Prev. (2001) 25: 202).

Otra ventaja de los modelos de cáncer de xenoinjerto es la capacidad para estudiar la neovascularización y la angiogénesis. El crecimiento tumoral depende en parte del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Aunque el sistema capilar y la red sanguínea en desarrollo tiene su origen en el hospedador, el inicio y la arquitectura de la neovasculatura se regula por el tumor de xenoinjerto (Davidoff *et al.*, Clin Cancer Res. (2001) 7: 2870; Solesvik *et al.*, Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20: 1295). El efecto de anticuerpos y moléculas pequeñas en la neovascularización se estudia de acuerdo con procedimientos conocidos en este campo, tales como por análisis de IHC de tejidos tumorales y su microambiente circundante.

Se administran a ratones que portan tumores ortotópicos establecidos inyecciones de MAb anti PSCA o anticuerpos de Control 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 se analizan sus vejigas, hígados, hueso y pulmones con respecto a la presencia de células tumorales por análisis de IHC. Estos estudios demuestran una eficacia antitumoral amplia de anticuerpos anti PSCA en el inicio y progresión de cáncer de próstata en modelos de ratón de xenoinjerto. Los anticuerpos anti PSCA inhiben la formación tumoral de tumores así como retardan el crecimiento de tumores ya establecidos y prolongan la supervivencia de ratones tratados. Además, los MAb anti PSCA demuestran un efecto inhibitorio drástico sobre la propagación de tumor de próstata local a sitios distantes, incluso en presencia de una carga tumoral grande. Por lo tanto, los MAb anti PSCA son eficaces en los criterios de valoración clínicamente relevantes principales (crecimiento tumoral), prolongación de la supervivencia y salud.

Efecto de MAb de PSCA en el crecimiento de cáncer de próstata humano en ratones

Usando la metodología anterior, se inyectaron células tumorales LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) por vía subcutánea en ratones SCID macho. Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 en cada grupo) y se inició el tratamiento por vía intraperitoneal (i.p.) el Día 0 con HA1-4.120 o MAb de control de isotipo según se indica. Los animales se trataron dos veces por semana para un total de 7 dosis hasta el día de estudio 28. El crecimiento tumoral se controló usando mediciones por calibrador cada 3 a 4 días según se indica. Los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal anti PSCA humano Ha1-4.120 inhibió significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata humano implantados por vía subcutánea en ratones SCID ($p < 0,05$) (Figura 18).

En otro experimento, se inyectaron células tumorales LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) por vía subcutánea en ratones SCID macho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 50 mm^3 , los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 en cada grupo) y el tratamiento se inició por vía intraperitoneal (i.p.) con HA1-5.99.1 o MAb de control de isotipo según se indica. Los animales se trataron dos veces por semana para un total de 5 dosis hasta el día del estudio 14. El crecimiento tumoral se controló usando mediciones por calibrador cada 3 a 4 días como se indica. Los resultados muestran que el anticuerpo monoclonal completamente humano anti PSCA Ha1-5.99 inhibía significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata humano independientes de andrógenos implantados por vía subcutánea en ratones SCID ($p < 0,05$) (Figura 19).

En otro experimento, se inyectaron células tumorales LAPC-9AD ($2,5 \times 10^6$ células) por vía subcutánea en ratones SCID macho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 40 mm^3 , los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 en cada grupo) y el tratamiento se inició por vía intraperitoneal (i.p.) con concentraciones crecientes de HA1-4.121 o MAb de control de isotipo según se indica. Los animales se trataron dos veces por semana para un total de 7 dosis hasta el día del estudio 21. El crecimiento tumoral se controló usando mediciones por calibrador cada 3 a 4 días como se indica. Los resultados de este estudio demostraron que HA1-4.121 inhibía el crecimiento de xenoinjertos de próstata dependientes de andrógenos humanos subcutáneos establecidos en SCID. Los resultados fueron estadísticamente significativos para el grupo de dosis de 300 µg los días 14, 17 y 21 ($p < 0,05$, ensayo de Kruskal-Wallis, de doble cara con $\alpha=0,05$) y para el grupo de dosis de 700 µg los días 10, 14, 17 y 21 ($p < 0,05$, ensayo de Kruskal-Wallis, de doble cara con $\alpha=0,05$) (Figura 20).

En otro experimento, se inyectaron células tumorales LAPC-9AD, dependientes de andrógeno, derivadas de pacientes ($2,0 \times 10^6$ células) en los lóbulos dorsales de las próstatas de ratones SCID macho. Se permitió que los tumores crecieran durante aproximadamente 10 días momento en el cual los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos. El tratamiento con 500 mg de MAb HA1-4.117, HA1-4.121 o de control de isotipo humanos se inició 10 días después del implante de tumor. Los anticuerpos se suministraron por vía intraperitoneal dos veces a la semana para un total de 7 dosis. Cuatro días después de la última dosis, los animales se sacrificaron y los tumores primarios se escindieron y se pesaron. Los resultados muestran que los anticuerpos monoclonales humanos anti PSCA Ha1-4.121 ($p < 0,01$) y Ha1-4.117 ($p < 0,05$) inhibía significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata

LAPC-9AD implantados de forma ortotópica en ratones SCID (Figura 21).

En otro experimento, se inyectaron células tumorales LAPC-9AD, dependientes de andrógeno, derivadas de pacientes ($2,0 \times 10^6$ células) en los lóbulos dorsales de las próstatas de ratones SCID macho. Se permitió que los tumores crecieran durante aproximadamente 9 días momento en el cual los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos. Los animales clasificados aleatoriamente en los grupos de supervivencia incluyen 11 ratones en el grupo tratado con MAb de control de isotipo y 12 ratones en el grupo tratado con A1-4.121. Los animales se trataron i.p. con 1000 μg de HA1-4.121 o 1000 μg de MAb de control de isotipo dos veces por semana para un total de 9 dosis. Los resultados demostraron que HA1-4.121 prolongaba significativamente (ensayo de rangos logarítmicos: $p < 0,01$) la supervivencia de ratones SCID con tumores de próstata dependientes de andrógeno humanos. Dos ratones en el grupo tratado con HA1-4.121 permanecieron sin tumores palpables el día 110, el último día del experimento (Figura 22).

Efecto de MAb de PSCA en combinación con taxotere en ratones

En otro experimento, se inyectaron células tumorales LAPC-9AI (2×10^6 células por animal) por vía subcutánea en ratones SCID macho. Cuando el volumen tumoral alcanzó 65 mm^3 , los animales se clasificaron aleatoriamente y se les asignó a cuatro grupos diferentes ($n=10$ en cada grupo) según se indica. Comenzando el día 0, se administraron HA1-4.121 o MAb de control de isotipo i.p. dos veces por semana a una dosis de 500 μg para un total de 6 dosis. La última dosis se proporcionó el día 17. Se proporcionó taxotere por vía intravenosa a una dosis de 5 mg/kg los días 0, 3 y 7. El crecimiento tumoral se controló cada 3-4 días usando mediciones por calibrador. Los resultados de este estudio demuestran que HA1-4.121 como un único agente inhibió el crecimiento de xenoinjertos de próstata independientes de andrógenos en ratones SCID en un 45 % en comparación con el tratamiento con anticuerpo de control solamente el día 28 (ensayo de ANOVA/Tukey: $p < 0,05$). La administración del MAb de control de isotipo más taxotere inhibió el crecimiento tumoral en 28 % en comparación con el tratamiento de anticuerpo de control solamente, lo que no era estadísticamente significativo. La administración de HA1-4.121 en combinación con taxotere potenció el efecto y dio como resultado una inhibición del 69 % del crecimiento tumoral en comparación con el anticuerpo de control solamente (ensayo de ANOVA/Tukey: $p < 0,01$). También se demostró una diferencia estadísticamente significativa cuando el grupo de combinación de HA1-4.121 más taxotere se comparó con los grupos de HA1-4.121 o MAb de control de isotipo más taxotere (ensayo de ANOVA/Tukey: $p < 0,05$) (Figura 23).

Efecto de MAb de PSCA en el crecimiento de cáncer pancreático humano en ratones

En otro experimento, se inyectaron células de cáncer pancreático HPAC (2×10^6 /ratón) por vía subcutánea en ratones ICR SCID inmunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos ($n=10$ en cada grupo) y se inició el tratamiento con el anticuerpo monoclonal de PSCA humano indicado el mismo día. Se suministraron anticuerpos (500 mg/ratón) por vía intraperitoneal dos veces a la semana para un total de 8 dosis. Los resultados demostraron que los anticuerpos monoclonales humanos anti PSCA HA1-4.121, HA1-4.117 y HA1-1.16 inhibieron significativamente el crecimiento de xenoinjertos de cáncer pancreático humano por vía subcutánea implantados en ratones SCID. Se realizaron análisis estadísticos usando un ensayo de t (doble cara, $\alpha=0,05$) (Figura 24).

En otro experimento, se implantaron células HPAC ($3,0 \times 10^6$ células) por vía ortotópica en los páncreas de ratones SCID. Los ratones se asignaron aleatoriamente a tres grupos ($n=9$ en cada grupo) como se indica. El tratamiento con HA1-4.121 (250 μg o 1000 μg) o MAb de control de isotipo (1000 μg) se inició el día de la implantación. Los anticuerpos se administraron i.p. dos veces por semana para un total de 10 dosis. Trece días después de la última dosis, los animales se sacrificaron y los tumores primarios se escindieron y se pesaron. Los resultados de este estudio han demostrado que HA1-4.121 inhibía significativamente el crecimiento ortotópico de xenoinjertos de cáncer pancreático humano en ratones SCID a ambos niveles de dosis examinados. El tratamiento con 250 μg y 1000 μg de AGS-PSCA inhibió el crecimiento tumoral en 66 % y 70 %, respectivamente (ensayo de Kruskal-Wallis/Tukey: $p < 0,01$ y $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 25).

En la autopsia, se observaron metástasis visibles a ganglios linfáticos y órganos distantes en el grupo tratado con anticuerpo de control. No se observaron metástasis visibles en ninguno de los grupos tratados con HA1-4.121. Se retiraron los ganglios linfáticos, pulmones e hígados de todos los animales y se examinaron de forma histológica con respecto a la presencia de tumor metastásico. Se tiñeron secciones de los pulmones y ganglios linfáticos retirados de cada animal con respecto a citoqueratina humana y se determinó microscópicamente el número de metástasis. Los resultados del análisis histológico demostraron una reducción significativa en las metástasis de ganglios linfáticos (LN) en animales tratados con HA1-4.121 ($p = 0,0152$ como se detecta por ensayo exacto de Fisher). La incidencia de metástasis e invasión también se redujo significativamente en animales tratados con ambas concentraciones de HA1-4.121 ($p = 0,0152$ como se detectó por ensayo exacto de Fisher). El número de metástasis de pulmón se redujo significativamente en ratones tratados con la dosis de 1,0 mg de HA1-4.121 solamente ($p = 0,0498$ como se detectó por ensayo exacto de Fisher) (Figura 26).

Efecto de los MAb de PSCA en el crecimiento de cáncer de vejiga humano en ratones

En otro experimento, se inyectaron células de cáncer de vejiga SW780 humano (2×10^6 /ratón) por vía subcutánea en ratones ICR SCID inmunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Los ratones se clasificaron aleatoriamente en grupos (n=10 animales/grupo) y se inició el tratamiento con el MAb de PSCA humano indicado el mismo día. Los anticuerpos (250 mg/ratón) se suministraron por vía intraperitoneal dos veces por semana para un total de 7 dosis. Los resultados demostraron que HA1-4.117 (p= 0,014), HA1-4.37 (p= 0,0056), HA1-1.78 (p= 0,001), Ha1-5.99 (p=0,0002) y HA1-4.5 (p= 0,0008) inhibieron significativamente el crecimiento de tumores de vejiga SW780 implantados por vía subcutánea en ratones SCID. Se realizaron análisis estadísticos usando un ensayo de t (doble cara, $\alpha=0,05$) (Figura 27).

Los resultados de estos experimentos muestran que pueden usarse MAb de PSCA para fines terapéuticos y de diagnóstico para tratar y controlar cánceres expuestos en la Tabla I.

Ejemplo 27Uso terapéutico y de diagnóstico de anticuerpos anti PSCA en seres humanos

Se usan con seguridad y eficacia anticuerpos monoclonales anti PSCA para fines de diagnóstico, profiláctico, pronóstico y/o terapéutico en seres humanos. El análisis de transferencia de Western e inmunohistoquímico de tejidos de cáncer y xenoinjertos de cáncer con MAb anti PSCA muestran tinción extensiva fuerte en carcinoma pero niveles significativamente menores 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 sospechados.

Como se determina por citometría de flujo, el MAb anti PSCA se une específicamente con células de carcinoma. Por lo tanto, se usan anticuerpos anti PSCA en aplicaciones de captura de imágenes de cuerpo completo de diagnóstico, tales como radioinmunoescintigrafía y radioimmunoterapia (véase, por ejemplo, Potamianos S., *et al.* Anticancer Res 20(2A): 925-948 (2000)) para la detección de cánceres localizados y metastásicos que muestran expresión de PSCA. El desprendimiento o la liberación de un dominio extracelular de PSCA al medio extracelular, tal como el visto para fosfodiesterasa alcalina B10 (Meerson, N. R., Hepatology 27: 563-568 (1998)), permite la detección de diagnóstico de PSCA por anticuerpos anti PSCA en suero y/o muestras de orina de pacientes sospechados.

Se usan anticuerpos anti PSCA que se unen específicamente con PSCA en aplicaciones terapéuticas para 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 captura de imágenes bien conocidos en este campo, tales como profármacos, enzimas o radioisótopos. En estudios preclínicos, se ensayan anticuerpos anti PSCA no conjugados y conjugados con respecto a eficacia de prevención tumoral e inhibición del crecimiento en los modelos de xenoinjerto 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 *In Vivo*"). Se usan anticuerpos anti PSCA bien conjugados o bien no conjugados como una modalidad terapéutica en ensayos clínicos humanos bien solos o en combinación con otros tratamientos como se describe en los siguientes ejemplos.

Ejemplo 28Ensayos clínicos humanos para el tratamiento y diagnóstico de carcinomas humanos mediante el uso de anticuerpos anti PSCA humanos *in vivo*

Se usan anticuerpos de acuerdo con la presente invención que reconocen un epítipo en PSCA, y se usan en el tratamiento de ciertos tumores tales como los enumerados en la Tabla I. Basándose en varios factores, incluyendo los niveles de expresión de PSCA, los tumores tales como los enumerados en la Tabla I son indicaciones preferidas en la actualidad. En relación con cada una de estas indicaciones, se persiguen con éxito tres enfoques clínicos.

I.) Terapia complementaria: en terapia complementaria, los pacientes se tratan con anticuerpos anti PSCA en combinación con un agente quimioterapéutico o antineoplásico y/o radioterapia. Las dianas de cáncer primario, tales como las enumeradas en la Tabla I, se tratan con protocolos convencionales mediante la adición de anticuerpos anti PSCA a terapia de primera y segunda línea convencional. Los diseños de protocolo abordan la eficacia como se evalúa por la reducción de la masa tumoral así como la capacidad para reducir dosis habituales de quimioterapia convencional. Estas reducciones de dosificación permiten una terapia adicional y/o prolongada reduciendo la toxicidad relacionada con la dosis del agente quimioterapéutico. Se utilizan anticuerpos anti PSCA en varios ensayos clínicos complementarios en combinación con los agentes quimioterapéuticos o antineoplásicos adriamicina (carcinoma de próstata avanzado), cisplatino (carcinomas de cabeza y cuello y pulmón avanzados), taxol (cáncer de mama) y doxorubicina (preclínico).

5 II.) Monoterapia: en relación con el uso de anticuerpos anti PSCA en monoterapia de tumores, los anticuerpos se administran a pacientes sin un agente quimioterapéutico o antineoplásico. En una realización, se realiza monoterapia clínicamente en pacientes con cáncer de estadio final con enfermedad metastásica extensiva. Los pacientes muestran algo de estabilización de enfermedad. Los ensayos demuestran un efecto en pacientes refractarios con tumores cancerosos.

10 III.) Agente de captura de imágenes: mediante la unión de un radionúclido (por ejemplo, yodo o itrio (^{131}I , ^{90}Y) con anticuerpos anti PSCA, los anticuerpos radiomarcados se utilizan como un agente de diagnóstico y/o de captura de imágenes. En dicho papel, los anticuerpos marcados se localizan en ambos tumores sólidos, así como lesiones metastásicas de células que expresan PSCA. En relación con el uso de anticuerpos anti PSCA como agentes de
15 captura de imágenes, los anticuerpos se usan como un complemento para el tratamiento quirúrgico de tumores sólidos, tanto como una exploración prequirúrgica como un seguimiento postoperatorio para determinar qué tumor permanece y/o vuelve. En una realización, se usa un anticuerpo de PSCA-(^{111}In) como un agente de captura de imágenes en un ensayo clínico humano de Fase I en pacientes que tengan un carcinoma que exprese PSCA (por analogía véase, por ejemplo, Divgi *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 83: 97-104 (1991)). Los pacientes se siguen con cámara convencional anterior y posterior gamma. Los resultados indican que se identifican lesiones primarias y lesiones metastásicas.

20 Dosis y vía de administración

25 Como se apreciará por los expertos habituales en la materia, las consideraciones de dosificación pueden determinarse mediante comparación con los productos análogos que están en la clínica. Por lo tanto, pueden administrarse anticuerpos anti PSCA con dosis en el intervalo de 5 a 400 mg/m², con las dosis menores usadas, por ejemplo, en relación con estudios de seguridad. La afinidad de anticuerpos anti PSCA en relación con la afinidad de un anticuerpo conocido por su diana es un parámetro usado por los expertos en la materia para determinar regímenes de dosis análogos. Además, los anticuerpos anti PSCA que son anticuerpos completamente humanos, en comparación con el anticuerpo quimérico, tienen eliminación más lenta; en consecuencia, la dosificación en pacientes con dichos anticuerpos anti PSCA completamente humanos puede ser menor, quizás en el intervalo de 50 a 300 mg/m², y aún ser eficaces. La dosificación en mg/m², a diferencia de la medición convencional de dosis en mg/kg, es una medición basada en el área de superficie y es una medida de dosificación conveniente que se diseña para incluir pacientes de todos los tamaños de niños a adultos.

35 Tres enfoques de suministro distintos son útiles para suministro de anticuerpos anti PSCA. El suministro intravenoso convencional es una técnica de suministro convencional para muchos tumores. Sin embargo, en relación con tumores en la cavidad peritoneal, tales como tumores de los ovarios, conducto biliar, otros conductos y similares, la administración intraperitoneal puede demostrar ser favorable para obtener alta dosis de anticuerpo en el tumor y también para minimizar la eliminación de anticuerpos. De manera similar, ciertos tumores sólidos poseen vasculatura que es apropiada para perfusión regional. La perfusión regional permite una alta dosis de anticuerpo en el sitio de un tumor y minimiza la eliminación a corto plazo del anticuerpo.

40 Plan de desarrollo clínico (CDP)

45 Visión de conjunto: el CDP sigue y desarrolla tratamientos de anticuerpos anti PSCA en relación con terapia complementaria, monoterapia y como un agente de captura de imágenes. Los ensayos demuestran inicialmente seguridad y a continuación confirman la eficacia en dosis repetidas. Los ensayos son abiertos y comparan la quimioterapia convencional con terapia convencional más anticuerpos anti PSCA. Como se apreciará, un criterio que puede utilizarse en relación con la admisión de pacientes es los niveles de expresión de PSCA en sus tumores como se determina por biopsia.

50 Como con cualquier proteína o producto terapéutico basado en infusión de anticuerpo, las preocupaciones de seguridad están relacionadas principalmente con (i) síndrome de liberación de citocinas, es decir, hipotensión, fiebre, temblor, escalofríos; (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica al material (es decir, el desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente para el producto terapéutico de anticuerpo o respuesta de HAHA); y (iii) toxicidad a células normales que expresan PSCA. Se utilizan ensayos convencionales y seguimiento para controlar cada una de estas preocupaciones de seguridad. Se ha descubierto que los anticuerpos anti PSCA son seguros tras su administración a seres humanos.

55 Ejemplo 29

60 Ensayo clínico humano: monoterapia con anticuerpo anti PSCA humano

65 Los anticuerpos anti PSCA son seguros en relación con el ensayo complementario anteriormente analizado, un ensayo clínico humano de Fase II confirma la eficacia y dosificación óptima para monoterapia. Dicho ensayo se consigue e implica los mismos análisis de seguridad y resultado, que el ensayo complementario anteriormente descrito con la excepción de que los pacientes no reciben quimioterapia simultáneamente con la recepción de dosis de anticuerpos anti PSCA.

Ejemplo 30Ensayo clínico humano: captura de imágenes de diagnóstico con anticuerpo anti PSCA

5 De nuevo, como la terapia complementaria analizada anteriormente es segura dentro de los criterios de seguridad analizados anteriormente, se realiza un ensayo clínico humano con respecto al uso de anticuerpos anti PSCA como un agente de captura de imágenes de diagnóstico. El protocolo se diseña de una manera sustancialmente similar a las descritas en la técnica, tal como en Divgi *et al.* 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.

10

Ejemplo 31Terapia complementaria de ensayo clínico humano con anticuerpo anti PSCA humano y terapia quimioterapéutica, radioterapia y/o terapia de ablación hormonal

15

Se inicia un ensayo clínico humano de fase I para evaluar la seguridad de seis dosis intravenosas de un anticuerpo anti PSCA humano en relación con el tratamiento de un tumor sólido, por ejemplo, un cáncer de un tejido enumerado en la Tabla I. En el estudio, se evalúa la seguridad de dosis individuales de anticuerpos anti PSCA cuando se utilizan como una terapia complementaria a un producto antineoplásico o quimioterapéutico o agente de ablación hormonal como se define en el presente documento, tal como, sin limitación: cisplatino, topotecán, doxorubicina, adriamicina, taxol, Lupron, Zoladex, Eulexina, Casodex, Anandrón o similares. El diseño de ensayo incluye suministro de aproximadamente seis dosis individuales de un anticuerpo anti PSCA con dosificación de anticuerpo que aumenta de aproximadamente 25 mg/m² a aproximadamente 275 mg/m² durante el transcurso del tratamiento de acuerdo con el siguiente programa o uno similar:

20

	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
Dosis de MAb	25 mg/m ²	75 mg/m ²	125 mg/m ²	175 mg/m ²	225 mg/m ²	275 mg/m ²
Quimioterapia (dosis convencional)	+	+	+	+	+	+

Los pacientes se siguen estrechamente durante una semana después de cada administración de anticuerpo y quimioterapia. En particular, los pacientes se evalúan con respecto a las preocupaciones de seguridad mencionadas anteriormente: (i) síndrome de liberación de citocinas, es decir, hipotensión, fiebre, temblor, escalofríos; (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica al material (es decir, el desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente al producto terapéutico de anticuerpo humano, o respuesta de HAHA); y (iii) toxicidad a células normales que expresan PSCA. Se utilizan ensayos convencionales y seguimiento para controlar cada una de estas preocupaciones de seguridad. Los pacientes también se evalúan con respecto al resultado clínico, y particularmente la reducción de la masa tumoral como se demuestra por IRM u otro método de captura de imágenes.

30

Se ha demostrado que los anticuerpos anti PSCA son seguros y eficaces. Los ensayos de fase II confirman la eficacia y refinan la dosificación óptima.

35

Ejemplo de referencia 32

40

Interferencia de ARN (ARNi)

Se implementa la tecnología de interferencia de ARN (ARNi) a diversos ensayos celulares relevantes para la oncología. ARNi es un mecanismo de silenciamiento génico posttranscripcional activado por ARN bicatenario (ARNbc). ARNi induce degradación de ARNm específica que conduce a cambios en la expresión de proteínas y posteriormente en la función génica. En células de mamífero, estos ARNbc denominados ARN de interferencia cortos (ARNip) tienen la composición correcta para activar la ruta de ARNi que se dirige a degradación, específicamente algunos ARNm. Véase, Elbashir S. M., *et al.*, Duplexes of 21-nucleotide RNAs Mediate RNA interference in Cultured Mammalian Cells, Nature 411(6836): 494-8 (2001). Por lo tanto, se usa tecnología de ARNi con éxito en células de mamífero para silenciar genes diana.

45

La pérdida de control de la proliferación celular es un distintivo de las células cancerosas; por lo tanto, la evaluación del papel de PSCA en los ensayos de supervivencia/proliferación celular es relevante. En consecuencia, se usa ARNi para investigar la función del antígeno PSCA. Para generar ARNip para PSCA, se usaron algoritmos que predecían oligonucleótidos que mostraban los parámetros moleculares críticos (contenido de G:C, temperatura de fusión, etc.) y tiene la capacidad de reducir significativamente los niveles de expresión de la proteína PSCA cuando se introducen en células. De acuerdo con este ejemplo, se usan composiciones de ARNip de PSCA que comprenden ARNip (ARN de interferencia corto, bicatenario) que corresponde a la secuencia de ORF de ácido nucleico de la proteína PSCA o subsecuencias de la misma. Por lo tanto, se usan subsecuencias de ARNip de esta manera que son generalmente de 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 o más de 35 nucleótidos de ARN de longitud. Estas secuencias de ARNip son complementarias y no complementarias de al menos una parte de la secuencia codificante de ARNm. En una realización preferida, las subsecuencias son de 19-25 nucleótidos de longitud, más preferentemente 21-23

55

60

nucleótidos de longitud. En realizaciones preferidas, estos ARNip consiguen la supresión de antígeno PSCA en células que expresan la proteína y tienen efectos funcionales como se describe posteriormente.

El ARNip seleccionado (oligo PSCA.b) se ensayó en numerosas líneas celulares en el ensayo de MTS de supervivencia/proliferación (que mide la actividad metabólica celular). Los ensayos colorimétricos basados en tetrazolio (es decir, MTS) detectan células viables exclusivamente, ya que las células vivas son metabólicamente activas y por lo tanto pueden reducir las sales de tetrazolio a compuestos de formazán coloreados; las células muertas, sin embargo, no. Además, este oligo PSCA.b consiguió supresión del antígeno PSCA en células que expresaban la proteína y tenían efectos funcionales como se describe posteriormente usando los siguientes protocolos.

Transfecciones de ARNip de mamífero: el día antes de la transfección de ARNip, las diferentes líneas celulares se sembraron en placas en medios (RPMI 1640 con FBS 10 % sin antibióticos) a 2×10^3 células/pocillo en 80 μ l (formato de placa de 96 pocillos) para el ensayo de supervivencia/MTS. En paralelo con el oligo de ARNip específico de PSCA, se incluyeron las siguientes secuencias en cada experimento como controles: a) células transfectadas con simulación con Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y tampón de hibridación (sin ARNip); b) ARNip específico de Luciferasa 4 (secuencia diana: 5'-AAGGGACGAAGACGAACACUUCTT-3') (SEC ID N°: 77); y c) ARNip específico de Eg5 (secuencia diana: 5'-AACTGAAGACCTGAAGACAATAA-3') (SEC ID N°: 78). Se usaron ARNip a 10 nM y Lipofectamine 2000 1 μ g/ml de concentración final.

El procedimiento fue el siguiente: los ARNip se diluyeron en primer lugar en OPTIMEM (medio de transfección sin suero, Invitrogen) a 0,1 μ M (concentrado 10 veces) y se incubó a TA 5-10 minutos. Se diluyó Lipofectamine 2000 a 10 μ g/ml (concentrado 10 veces) para el número total de transfecciones y se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente (TA). Se mezclaron cantidades apropiadas de Lipofectamine 2000 concentrado 10 veces 1:1 con ARNip concentrados 10 veces diluido y se incubó a TA durante 20-30 segundos (solución de transfección concentrada 5 veces). Se añadieron 20 μ l de las soluciones de transfección concentradas 5 veces a las muestras respectivas y se incubó a 37 °C durante 96 horas antes de su análisis.

Ensayos de MTS: el ensayo de MTS es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad o quimiosensibilidad basándose en un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal interna; MTS(b)] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenacina; PES). Se realizaron ensayos añadiendo una cantidad pequeña del reactivo de solución directamente a pocillos de cultivo, incubando durante 1-4 horas y después registrando la absorbancia a 490 nm con un lector de placas de 96 pocillos. La cantidad de producto de formazán coloreado como se mide por la cantidad de absorbancia a 490 nm es directamente proporcional a la actividad mitocondrial y/o el número de células vivas en cultivo.

Para abordar la función de PSCA en células, se silencia PSCA transfectando las líneas celulares de PSCA que expresan de forma endógena.

Otra realización de la invención es un método para analizar la proliferación celular relacionada con PSCA, que es la medición de la síntesis de ADN como un marcador para proliferación. Se usan precursores de ADN marcados (es decir 3H-Timidina) y se cuantifica su incorporación a ADN. La incorporación del precursor marcado a ADN es directamente proporcional a la cantidad de división celular que se produce en el cultivo. Otro método usado para medir la proliferación celular es realizar ensayos clonogénicos. En estos ensayos, se siembran en placas un número definido de células en la matriz apropiada y se cuenta el número de colonias formadas después de un periodo de crecimiento después del tratamiento con ARNip.

En la validación de diana de cáncer de PSCA, se consideran la complementación del análisis de supervivencia/proliferación celular con apoptosis y estudios de realización de perfiles de ciclo celular. El distintivo bioquímico del proceso apoptótico es la fragmentación de ADN genómico, un acontecimiento irreversible que compromete a la célula a morir. Un método para observar ADN fragmentado en células es la detección inmunológica de fragmentos de ADN en complejo con histona mediante un inmunoensayo (es decir ELISA de detección de muerte celular) que mide el enriquecimiento de fragmentos de ADN en complejo con histona (mono y oligonucleosomas) en el citoplasma de células apoptóticas. Este ensayo no requiere el premarcaje de las células y puede detectar la degradación de ADN en células que no proliferan *in vitro* (es decir células tumorales recién aisladas).

Las moléculas efectoras más importantes para desencadenar la muerte celular apoptótica son caspasas. Las caspasas son proteasas que cuando se activan escinden numerosos sustratos en el sitio carboxilo terminal de un resto de aspartato que media en los estadios muy tempranos de la apoptosis tras su activación. Todas las caspasas se sintetizan como proenzimas y su activación implica escisión en restos de aspartato. En particular, la caspasa 3 parece desempeñar un papel central en el inicio de acontecimientos celulares de la apoptosis. Los ensayos para determinación de la activación de caspasa 3 detectan acontecimientos tempranos de la apoptosis. Después de los tratamientos con ARNi, la detección con transferencia de Western de presencia de caspasa 3 activa o escisión proteolítica de productos (es decir PARP) hallados en células apoptóticas apoya adicionalmente una inducción activa

de la apoptosis. Debido a que los mecanismos celulares que dan como resultado la apoptosis son complejos, cada uno tiene sus ventajas y limitaciones. La consideración de otros criterios/puntos finales tales como morfología celular, condensación de cromatina, formación de ampollas de la membrana, cuerpos apoptóticos ayudan a apoyar adicionalmente que la muerte celular es apoptótica. Ya que no todas las dianas génicas que regulan el crecimiento celular son antiapoptóticas, el contenido de ADN de células permeabilizadas se mide para obtener el perfil de contenido de ADN o perfil de ciclo celular. Los núcleos de células apoptóticas contienen menos ADN debido a la fuga fuera del citoplasma (población sub G1). Además, el uso de tinciones de ADN (es decir, yoduro de propidio) también diferencia entre las diferentes fases del ciclo celular en la población celular debido a la presencia de diferentes cantidades de ADN en G0/G1, S y G2/M. En estos estudios pueden cuantificarse las subpoblaciones.

Para el gen de PSCA, los estudios de ARNi facilitan el entendimiento de la contribución del producto génico en rutas de cáncer. Dichas moléculas de ARNi activas tienen uso en la identificación de ensayos para explorar con respecto a MAb que son productos terapéuticos antitumorales activos. Además, se administran ARNi como productos terapéuticos a pacientes de cáncer para reducir el crecimiento maligno de varios tipos de cáncer, incluyendo los enumerados en la Tabla 1. Cuando el PSCA desempeña un papel en la supervivencia celular, proliferación celular, tumorigénesis o apoptosis, se usa como una diana para fines de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo de referencia 33

Detección de proteína PSCA en muestras de ensayos de paciente con cáncer por IHC

Se detectó expresión de la proteína PSCA en muestras de ensayo tumorales de pacientes con cáncer usando el anticuerpos HA1-4.117. Se cortaron tejidos incluidos en parafina, fijados en formalina, en secciones de 4 micrómetros y se montaron en portaobjetos de vidrio. Las secciones se desecaron, se rehidrataron y se trataron con solución de recuperación de antígenos (Solución Citra de Recuperación de Antígenos; BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA, 94583) a alta temperatura. Las secciones se incubaron después en anticuerpo anti PSCA monoclonal humano conjugado con fluoresceína, Ha1-4.117, durante 16 horas a 4 °C. Los portaobjetos se lavaron tres veces en tampón y se incubaron adicionalmente con antifluoresceína de Conejo durante una 1 hora y, después de lavar en tampón, se sumergieron en anticuerpo secundario de cabra antiinmunoglobulina de conejo conjugado con peroxidasa DAKO EnVision+™ (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) durante 30 minutos. Las secciones se lavaron después en tampón, se revelaron usando el kit DAB (SIGMA Chemicals), se contratiñeron usando hematoxilina, y se analizaron por microscopía de campo claro. Los resultados muestran la expresión de PSCA en las células tumorales de adenocarcinoma de próstata (A, B), carcinoma transicional de vejiga (C) y adenocarcinoma ductal pancreático (D). Estos resultados indican que PSCA se expresa en cánceres humanos y que los anticuerpos dirigidos a este antígeno son útiles como reactivos de diagnóstico (Figura 17).

Estos resultados indican que PSCA es una diana para aplicaciones de diagnóstico, pronóstico y terapéuticas en cáncer.

A lo largo de la presente solicitud, se hace referencia a diversos contenidos de datos de sitios web, publicaciones, solicitudes de patente y patentes. (Los sitios web se indican por su Localizador Uniforme de Recursos, o URL, direcciones en la Web).

Tablas

Tabla I: tejidos que expresan PSCA cuando son malignos.

- Próstata
- Páncreas
- Vejiga
- Riñón
- Colon
- Pulmón
- Ovario
- Mama

TABLA II: abreviaturas de aminoácidos

UNA LETRA	TRES LETRAS	NOMBRE COMPLETO
F	Phe	fenilalanina
L	Leu	leucina
S	Ser	serina

ES 2 549 405 T3

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: Matriz de sustitución de aminoácidos

Adaptado a partir de la matriz de sustitución de aminoácidos BLOSUM62 del Software GCG 9.0 (matriz de sustitución de bloques). Cuanto mayor sea el valor, más probable es que se encuentre una sustitución en proteínas naturales, relacionadas (véase URL web.ikp.unibe.ch/manual/blosum62.html)

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

TABLA IV:

Motivos/Supermotivos de HLA de Clase I/II

5

TABLA IV (A): supermotivos/motivos de HLA de Clase I

SUPERMOTIVO	POSICIÓN	POSICIÓN	POSICIÓN
	2 (Anclaje Primario)	3 (Anclaje Primario)	C Terminal (Anclaje Primario)
A1	<i>TILVMS</i>		FWY
A2	LIVMATQ		<i>IVMATL</i>
A3	VSMATLI		RK
A24	<i>YFWIVLMT</i>		<i>FIYWLM</i>
B7	P		VILFMWYA
B27	RHK		FYLWMIVA
B44	ED		FWYLIMVA
B58	ATS		FWYLIVMA
B62	<i>QLIVMP</i>		FWYMIVLA
MOTIVOS			
A1	TSM		Y
A1		DEAS	Y
A2.1	<i>LMVQIAT</i>		<i>VLIMAT</i>
A3	<i>LMVISATFCGD</i>		KYRHFA
A11	<i>VTMLISAGNCDF</i>		KRYH
A24	<i>YFWM</i>		<i>FLIW</i>
A*3101	MVTALIS		RK
A*3301	MVALFIST		RK
A*6801	AVTMSLI		RK
B*0702	P		LMFWYAIV
B*3501	P		LMFWYIVA
B51	P		LIVFWYAM
B*5301	P		IMFWYALV
B*5401	P		ATIVLMFWY

Se prefieren los restos en **negrita**, se prefieren menos los restos en *cursiva*. Un péptido se considera portador de motivo si tiene anclajes primarios en cada posición de anclaje primaria para un motivo o supermotivo como se especifica en la tabla anterior.

TABLA IV (B): supermotivo de HLA de Clase II

1	6	9
W, F, Y, V, I, L	A, V, I, L, P, C, S, T	A, V, I, L, C, S, T, M, Y

10

Tabla IV(c): motivos de HLA de Clase II

MOTIVOS	Anclaje primario 1	2	3	4	5	Anclaje primario 7	8	9
DR4	preferido deletéreo	FMYLIVW	M T	W	I	VSTCPALIM	MH R	MH WDE
DR1	preferido deletéreo	MFLIVMY	C CH	FD	CWD	VMATSPLIC	M	AVM
DR7	preferido deletéreo	MFLIVWY	MC W	AG		IVMSACTPL	MGRD N	IV G
DR3	MOTIVOS	Anclaje primario 1	2	3	Anclaje primario 4	5	Anclaje primario 6	
Motivo a preferido	LIVMFY		D					
Motivo b preferido	LIVMFAY		DNQEST				KRH	
Supermotivo DR	MFLIVWY						VMSTACPLI	

Los restos en cursiva indican restos menos preferidos o "tolerados"

TABLA IV (D): supermotivos de HLA de clase I

POSICIÓN:		1	2	3	4	5	6	7	8	extremo terminal	C
<u>SUPERMOTIVOS</u>											
A1			<u>Anclaje primario</u> TILVMS							<u>Anclaje primario</u> FWY	
A2			<u>Anclaje primario</u> LIVMATQ							<u>Anclaje primario</u> LIVMAT	
A3	Preferido		<u>Anclaje primario</u> VSMATLI	YFW (4/5) DE (4/5)			YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	<u>Anclaje primario</u> RK	
	deletéreo	DE (3/5); P (5/5)									
A24			<u>Anclaje primario</u> YFWIVLMT							<u>Anclaje primario</u> FIYWLM	
B7	Preferido	FWY (5/5)	<u>Anclaje primario</u> P	FWY (4/5)					FWY (3/5)	<u>Anclaje primario</u> VILFMWYA	
	deletéreo	LIVM (3/5); DE (3/5); P(5/5); G(4/5); A(3/5); QN(3/5)				DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	DE (4/5)		
B27			<u>Anclaje primario</u> RHK							<u>Anclaje primario</u> FYLWMIVA	
B44			<u>Anclaje primario</u> ED							<u>Anclaje primario</u> FWYLIMVA	
B58			<u>Anclaje primario</u> ATS							<u>Anclaje primario</u> FWYLIVMA	
B62			<u>Anclaje primario</u> QLIVMP							<u>Anclaje primario</u> FWYMIVLA	

Los restos en cursiva indican restos menos preferidos o "tolerados"

Tabla IV (E): motivos de HLA de clase I

POSICIÓN	1	2	3	4	5	6	7	8	9	extremo C terminal
A1 9 unidades	preferido	GFYW	Anclaje primario STM DEA	YFW		P	DEQN	YFW		Anclaje primario Y
	deletéreo	DE	RHKLVMP	A	G	A				o extremo terminal
A1 9 unidades	preferido	GRHK	ASTCLIVM	Anclaje primario GSTC DEAS		ASTC	LIVM	DE		Anclaje primario Y
	deletéreoA		RHKDEPYFW	DE	PQN	RHK	PG	GP		
A1 unidades	10 preferido	YFW	Anclaje primario STM DEAQN	A	YFWQN	PASTC	GDE	P		Anclaje primario Y
	deletéreo	GP	RHKGLIVM	DE	RHK	QNA	RHKYFV	GRHK	A	
A1 unidades	10 preferido	YFW	STCLIVM	Anclaje primario A DEAS	YFW	PG	G	YFW		Anclaje primario Y
	deletéreo	RHK	RHKDEPYFW		P	G	PRHK	QN		
A2.1 unidades	9 preferido	YFW	Anclaje primario LMIVQAT	YFW	STC	YFW	A	P		Anclaje primario VLIMAT
	deletéreo	DEP	DERKH			RKH	DERKH			
A2.1 unidades	10 preferido	AYFW	Anclaje primario LMIVQAT	LVIM	G			FYWL VIM		Anclaje primario VLIMAT
	deletéreo	DEP	DE	RKHA	P	RKH	DERK H	RKH		
A3	preferido	RHK	Anclaje primario YFW LMVISATFCGD	PRHKYF W	A	YFW	P			Anclaje primario KYRHFA
	deletéreo	DEP	DE							
A11	preferido	A	Anclaje primario YFW VTLMISAGNCD F	YFW	A	YFW	YFW	P		Anclaje primario KRYH

deletéreo DEP								A	G	
A24 9 unidades	YFWRHK	Anclaje primario YFWM	STC	YFW	YFW	Anclaje primario FLIW				
deletéreo	DEG		DE G QNP	DERH K	G	AQN				
A24 unidades	10 Preferido	Anclaje primario YFWM	P	YFWP	P		Anclaje FLIW	primario		
Deletéreo			GDE QN RHK	DE	A	QN DEA				
A3101	Preferido	RHK	Anclaje primario MVTALIS YFW P	YFW	YFW	AP	Anclaje primario RK			
Deletéreo	DEP		DE	ADE	DE	DE				
A3301	Preferido		Anclaje primario YFW	AYFW			Anclaje primario RK			
Deletéreo	GP		DE							
A6801	Preferido	YFWSTC	Anclaje primario AVTMSLI	YFWLIV M	YFW	P	Anclaje primario RK			
deletéreo	GP		DEG	RHK		A				
B0702	Preferido	RHKFWY	Anclaje primario P	RHK	RHK	PA	Anclaje primario LMFYAI			
deletéreo	DEQNP		DEP DE DE	GDE	QN	DE				
										o C terminal
B3501	Preferido	FWYLIVM	Anclaje primario P	FWY	FWY		Anclaje primario LMFYIV			
deletéreo	AGP			G	G					A
B51	Preferido	LIVMFY	Anclaje primario P	FWY	STC	FWY	Anclaje primario LIVFWYAM			
deletéreo	AGPDERHKSTC			DE	G	DEQN	GDE			

B5301	preferido	<u>UVMFWY</u>	<u>Anclaje primario P</u>	FWY	STC	FWY	LIVMFW	Y	FWY	<u>Anclaje primario</u>	<u>IMFWYAL</u>	V
	deletéreo	AGPQN					G	RHKQN	DE			
B5401	preferido	<u>FWY</u>	<u>Anclaje primario P</u>	FWYLIVM	LIVM		ALIVM	FWYA	P	<u>Anclaje primario</u>	<u>AITVLMF</u>	WY
	deletéreo	GPQNDE		GDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE			

TABLA IV (F):

Sumario de supertipos de HLA

Frecuencias fenotípicas globales de supertipos de HLA en diferentes poblaciones étnicas

Supertipo	Especificidad Posición 2	Frecuencia fenotípica						
		Extremo C Terminal	Caucásico	Negro N.A.	Japonés	Chino	Hispano	Promedio
B7	P	AILMVFWY	43,2	55,1	57,1	43,0	49,3	49,5
A3	AILMVST	RK	37,5	42,1	45,8	52,7	43,1	44,2
A2	AILMVT	AILMVT	45,8	39,0	42,4	45,9	43,0	42,2
A24	YF (WIVLMT)	FI (YWLM)	23,9	38,9	58,6	40,1	38,3	40,0
B44	E (D)	FWYLIMVA	43,0	21,2	42,9	39,1	39,0	37,0
A1	TI (LVMS)	FWY	47,1	16,1	21,8	14,7	26,3	25,2
B27	RHK	FYL (WMI)	28,4	26,1	13,3	13,9	35,3	23,4
B62	QL (IVMP)	FWY (MIV)	12,6	4,8	36,5	25,4	11,1	18,1
B58	ATS	FWY (LIV)	10,0	25,1	1,6	9,0	5,9	10,3

TABLA IV (G):

Cobertura de población calculada proporcionada por diferentes combinaciones de supertipo de HLA

Supertipos de HLA	Frecuencia fenotípica					
	Caucásicos	Negros N.A	Japoneses	Chinos	Hispanos	Promedio
	83,0	86,1	87,5	88,4	86,3	86,2
A2, A3 y B7	99,5	98,1	100,0	99,5	99,4	99,3
A2, A3, B7, A24, 844 y A1	99,9	99,6	100,0	99,8	99,9	99,8
A2, A3, B7, A24, B44, A1, 827, B62, y B 58						

Los motivos indican los restos que definen especificidades de supertipo. Los motivos incorporan restos que se han determinado basándose en datos publicados que se reconocen por múltiples alelos dentro del supertipo. Los restos entre paréntesis son restos adicionales que también se ha predicho que se toleran por múltiples alelos dentro del supertipo.

5

Tabla V: motivos de aparición frecuente

Nombre	% de identidad promedio	Descripción	Función Potencial
zf-C2H2	34 %	Dedo de cinc, tipo C2H2	La proteína de unión a ácido nucleico actúa como factor de transcripción, probable localización nuclear
citocromo_b_N	68 %	Citocromo terminal)/b6/petB	oxidasa unida a membrana, genera superóxido
Ig	19 %	dominio de inmunoglobulina	los dominios son de cien aminoácidos de longitud e incluyen un enlace disulfuro intradominio conservado.
WD40	18 %	dominio WD, repetición G-beta	repeticiones en tándem de aproximadamente 40 restos, conteniendo cada una un motivo Trp-Asp. Actúan en la transducción de señales e interacción de proteínas
PDZ	23 %	dominio PDZ	puede actuar en la dirección de moléculas de señalización a sitios submembrana
LRR	28 %	Repetición Rica en Leucina	motivos de secuencia corta implicados en interacciones proteína-proteína
Pquinasa	23 %	Dominio proteína quinasa	núcleo catalítico conservado común para tanto serina/treonina como para proteínas tirosina quinasas que contienen un sitio de unión a ATP y un sitio catalítico

PH	16 %	Dominio PH	homología de plectrina implicada en señalización intracelular o como constituyentes del citoesqueleto
EGF	34 %	Dominio de tipo EGF	30-40 aminoácidos de longitud hallado en el dominio extracelular de proteínas unidas a membrana o en proteínas secretadas
Rvt	49 %	Transcriptasa inversa (ARN polimerasa dependiente de ARN)	
Ank	25 %	repetición de Ank	Proteína citoplasmática, asocia proteínas integrales de membrana con el citoesqueleto
Oxidored_q1	32 %	NADH-Ubiquinona/plastoquinona (complejo I), diversas cadenas	asociado a membrana. Implicado en la traslocación de protones a través de la membrana
mano Ef	24 %	mano EF	dominio de unión a calcio, consiste en un bucle de 12 restos flanqueado en ambos lados por un dominio alfa helicoidal de 12 restos
Rvp	79 %	Aspartil proteasa retroviral	Aspartil proteasas o proteasas ácidas, centradas en un resto de aspartilo catalítico
Colágeno	42 %	Repetición de triple hélice de colágeno (20 copias)	proteínas estructurales extracelulares implicadas en la formación de tejido conectivo. La secuencia consiste en la G-X-Y y las cadenas polipeptídicas forman una triple hélice.
Fn3	20 %	Dominio de fibronectina de tipo III	Localizado en la región de unión a ligando extracelular de receptores y es de aproximadamente 200 restos de aminoácidos de longitud con dos pares de cisteínas implicados en enlaces disulfuro
7tm_1	19 %	7 dominios transmembrana (familia de rodopsina)	siete regiones transmembrana hidrófobas, con el receptor localizado en el extremo N terminal de forma extracelular mientras que el extremo C terminal es citoplasmático. Señaliza a través de proteínas G.

Tabla VI: límites exónicos del transcrito PSCA v.1

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

Tabla VII: valores de IFM de cada punto de datos usado para cálculo de afinidad.

Valores de IFM				
nM	PSCA	PSCA	PDP3 T=8+4	PDP3 T=8+4
40	869,3	777,06	795,24	661,66
20	875,19	835,94	816,34	824,07
10	856,28	847,83	777,85	842,72
5	866,94	817,45	758,15	818,83
2,5	835,47	769,79	742,45	783,5
1,25	813,12	782,84	806,2	792,44
0,625	766,52	689,3	683,64	666,28

0,3125	588,3	541,25	549,03	499,22
0,15625	389,95	354,24	366,82	355,83
0,07813	234,85	230,37	225,82	211,77
0,03906	138,05	132,14	134,25	134,07
0,01953	84,35	78,49	77,62	80,14
0,00977	48,13	48,38	50,93	46,87
0,00488	33,49	30,58	30,71	30,04
0,00244	21,77	20,33	18,14	20,44
0,00122	14,45	13,59	13,82	13,11
0,00061	11,07	10,14	9,52	10,35
0,00031	8,61	8,3	8,57	9,09
0,00015	7,45	7,17	7,28	7,85
0,00008	6,91	6,73	7,32	7,86
0,00004	6,94	6,41	6,81	6,51

Tabla VIII: Afinidad calculada usando software Graphpad Prism: ecuación de respuesta a dosis sigmoidea (pendiente variable).

Valores de Kd

Ecuación 1	PSCA	PSCA	PDP3 T= 8+4	PDP3 T= 8+4
Valores de mejor ajuste				
BMÁX	896,6	843,9	816,4	820,3
KD	0,1784	0,1849	0,1678	0,1839
Error típico				
BMÁX	10,83	10,92	12,63	20,12
KD	0,01152	0,01275	0,01397	0,02405
Intervalos de confianza al 95 %				
BMÁX	873,9 a 919,3	821,0 a 866,7	790,0 a 842,9	778,2 a 862,4
KD	0,1543 a 0,2025	0,1583 a 0,2116	0,1386 a 0,1971	0,1336 a 0,2343

5

Tabla IX: afinidad basada en FACS en MAb de PSCA completamente humanos

Afinidad Basada en FACS	
ID de la Muestra	Kd (nM)
Ha1-4.37	0,23
Ha1-4.121	0,26
Ha1-5.99.1	0,28
Ha1-4.117	0,32
Ha1-4.120	0,41
Ha1-4.5	1,00
Ha1-1.16.1	6,91

Tabla X: anticuerpos que reaccionan de forma cruzada con PSCA de mono y/o PSCA de ratón.

ID de Hibridoma	Reacciona de forma Cruzada con PSCA de Mono	Reacciona de forma Cruzada con PSCA de Ratón
H1-1.10		-
Ha1-1.16	+	-
Ha1-1.78	+	-
Ha1-1.41	+	-
Ha1-4.5	+	-
Ha1-4.37	+	-
Ha1-4.117	+	+
Ha1-4.120	+	-
Ha1-4.121	+	-
Ha1-5.99	+	-

Tabla XI: PSCA: agrupamiento de epítomos por análisis de FACS.

MFI	Grupos de Epítomos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
4,37	4,120	4,5	5,99	4,121	1,41	1,16	1G8	
4,37	5,73	6,45	7,35	7,28	11,63	28,86	28,86	23,92
4,120	5,31	6,24	6,73	7,32	7,3	23,81	20,91	15,41
4,5	5,36	5,75	5,86	6,82	7,47	16,48	22,91	13,45
5,99	23,77	22,83	30,02	7,30	45,45	60,06	63,63	29,51
4,121	5,4	5,63	10,51	15,15	6,16	34,63	37,64	26,38
1,41	10,21	6,37	6,03	9,45	9,54	8,75	9,8	5,77
1,16	7,51	8	8,01	6,7	22,88	14,34	10,7	6,89
1G8	11,65	12,45	13,77	8,21	28,69	16,43	14,26	6,48

Leyenda:

	autocompetición (100%), control de fondo para cada anticuerpo biotinilado
	sin color 100% de competición
	competición fuerte
	competición de nula a débil

5

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Agensys, Inc. Gudas, Jean Jakobovits, Aya Xiao-Chi, Jia Morrison, Robert Kendall Morrison, Karen Jane Meyrick Shao, Hui Challita-Eid, Pia M. Raitano, Arthur B.
- <120> ANTICUERPOS Y MOLÉCULAS RELACIONADAS QUE SE UNEN CON PROTEÍNAS PSCA
- <130> 51158-20088.41
- <140> Aún no asignada
- <141> Presentada junto con la presente
- <150> 60/616.381
- <151> 05-10-2004
- <150> 60/617.881
- <151> 12-10-2004
- <150> 60/621.310
- <151> 21-10-2004
- <150> 60/633.077
- <151> 02-12-2004

ES 2 549 405 T3

<150> 10/857.484
<151> 28-05-2004

5 <150> 60/475.064
<151> 30-05-2003

<160> 78

10 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
<211> 990
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<221> CDS
<222> (18)..(389)
<221> misc_feature

20 <222> 543
<223> n = a, t, c o g

25 <400> 1

agggagagggc agtgacc atg aag gct gtg ctg ctt gcc ctg ttg atg gca 50
Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala
1 5 10

ES 2 549 405 T3

```

ggc ttg gcc ctg cag cca ggc act gcc ctg ctg tgc tac tcc tgc aaa 98
Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys
      15                20                25

gcc cag gtg agc aac gag gac tgc ctg cag gtg gag aac tgc acc cag 146
Ala Gln Val Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln
      30                35                40

ctg ggg gag cag tgc tgg acc gcg cgc atc cgc gca gtt ggc ctc ctg 194
Leu Gly Glu Gln Cys Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu
      45                50                55

acc gtc atc agc aaa ggc tgc agc ttg aac tgc gtg gat gac tca cag 242
Thr Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln
      60                65                70                75

gac tac tac gtg ggc aag aag aac atc acg tgc tgt gac acc gac ttg 290
Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu
      80                85                90

tgc aac gcc agc ggg gcc cat gcc ctg cag ccg gct gcc gcc atc ctt 338
Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu
      95                100                105

gcg ctg ctc cct gca ctc ggc ctg ctg ctc tgg gga ccc ggc cag cta 386
Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
      110                115                120

tag gctctggggg gccccgtgc agcccacact ggggtgtggtg ccccaggcct 439
*
```

```

ttgtgccact cctcacagaa cctggcccag tgggagcctg tcttggttcc tgaggcacat 499
cctaacgcaa gtttgaccat gtatgtttgc accccttttc ccnaaccct gaccttccca 559
tgggcctttt ccaggattcc caccggcag atcagtttta gtgacacaga tccgcctgca 619
gatggccctt ccaacccttt ctgttgctgt ttccatggcc cagcattttc caccctaac 679
cctgtgttca ggcacttctt cccccaggaa gccttcctg cccaccccat ttatgaattg 739
agccaggttt ggtccgtggt gtcccccgca cccagcaggg gacaggcaat caggagggcc 799
cagtaaaggc tgagatgaag tggactgagt agaactggag gacaagagtt gacgtgagtt 859
cctgggagtt tccagagatg gggcctggag gcctggagga aggggcccagg cctcacattt 919
gtggggctcc cgaatggcag cctgagcaca gcgtaggccc ttaataaaca cctgttggtt 979
aagccaaaaa a 990
```

5 <210> 2
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 549 405 T3

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

- <210> 3
- <211> 1020
- <212> ADN
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> CDS
- <222> (56)..(427)
- <400> 3

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgacc atg 58
                                         Met
                                         1

aag gct gtg ctg ctt gcc ctg ttg atg gca ggc ttg gcc ctg cag cca 106
Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro
                    5                      10                      15

ggc act gcc ctg ctg tgc tac tcc tgc aaa gcc cag gtg agc aac gag 154
Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn Glu
                    20                      25                      30

gac tgc ctg cag gtg gag aac tgc acc cag ctg ggg gag cag tgc tgg 202
Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys Trp
                    35                      40                      45

acc gcg cgc atc cgc gca gtt ggc ctc ctg acc gtc atc agc aaa ggc 250
Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys Gly
                    50                      55                      60                      65

tgc agc ttg aac tgc gtg gat gac tca cag gac tac tac gtg ggc aag 298
Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly Lys
                    70                      75                      80

aag aac atc acg tgc tgt gac acc gac ttg tgc aac gcc agc ggg gcc 346
Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala
                    85                      90                      95

cat gcc ctg cag ccg gct gcc gcc atc ctt gcg ctg ctc cct gca ctc 394
His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu
                    100                      105                      110

ggc ctg ctg ctc tgg gga ccc ggc cag cta tag gctctggggg gccccgctgc 447
Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu *
                    115                      120

agcccacact ggggtgtggtg ccccaggcct ctgtgccact cctcacacac cgggcccagt 507
gggagcctgt cctggttcct gaggcacatc ctaacgcaag tctgaccatg tatgtctgcg 567
ccoctgtccc ccaccctgac cctcccattg cctctccag gactcccacc cggcagatcg 627
gctctattga cacagatccg cctgcagatg gccctccaa cctctctgc tctgtttcc 687
atggcccagc attctccacc cttaacctg tgcctaggca cctcttccc caggaagcct 747
tccctgocca ccccatctat gacttgagcc aggtctggtc cgtggtgtcc cccgcacca 807
gcaggggaca ggactcagg agggcccgtt aaaggctgag atgaagtgga ctgagtagaa 867
ctggaggaca ggagtgcagc tgagttcctg ggagtctcca gagatggggc ctggaggcct 927
ggaggaaggg gccaggcctc acattcgtg ggctcctga atggcagcct cagcacagcg 987

taggcctta ataacacct gttggataag cca 1020

```

<210> 4
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 4

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           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

```

<210> 5
 <211> 888
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <221> CDS
 <222> (423)..(707)

10

<400> 5

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggcgcagtt ggccctcctga ccgtcatcag caaaggctgc 180
agcttgaact gcgtggatga ctcacaggac tactacgtgg gcaagaagaa catcacgtgc 240
tgtgacaccg acttgtgcac tcggcctgct gctctgggga cccggccagc tataggctct 300
ggggggcccc gctgcagccc aactgggtg tggtgcccc ggccctctgtg ccaactcctca 360
cacacccggc ccagtgaggag cctgtcctgg ttcttgaggg acatcctaac gcaagtctga 420
cc atg tat gtc tgc gcc cct gtc ccc cac cct gac cct ccc atg gcc 467
  Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala
    1           5           10           15

ctc tcc agg act ccc acc cgg cag atc ggc tct att gac aca gat ccg 515
Leu Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro
          20           25           30

cct gca gat ggc ccc tcc aac cct ctc tgc tgc tgt ttc cat ggc cca 563
Pro Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro
          35           40           45

gca ttc tcc acc ctt aac cct gtg ctc agg cac ctc ttc ccc cag gaa 611
Ala Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu
          50           55           60

gcc ttc cct gcc cac ccc atc tat gac ttg agc cag gtc tgg tcc gtg 659
Ala Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val

```

ES 2 549 405 T3

```

        65              70              75
gtg tcc ccc gca ccc agc agg gga cag gca ctc agg agg gcc cgg taa 707
Val Ser Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg *
 80              85              90

aggctgagat gaagtggact gagtagaact ggaggacagg agtcgacgtg agttcctggg 767
agtctccaga gatggggcct ggaggcctgg aggaaggggc caggcctcac attcgtgggg 827
ctcctgaat ggcagcctca gcacagcgtg gcccttaat aaacacctgt tggataagcc 887
a
    
```

5 <210> 6
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

```

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
    
```

10 <210> 7
 <211> 1174
 <212> ADN
 15 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> CDS
 20 <222> (424)..(993)
 <400> 7

ES 2 549 405 T3

gacagtgaac cctgcgctga aggcggttggg gctcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
cccagggttt cgtgccgata agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
agggcagtgc tgccttccgg tcaccaggac cagtgcctcag cccgcctgct tgacccctt 180
acttagctgg ggtccaatcc atacccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaact 240
tttgaactgg gtgcgactta agcaactgcc tgctgtgcta ctctgcaaa gcccaggtga 300
gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcacccagct gggggagcag tgctggaccg 360
cgcgcatccg cgcagttggc ctctgaccg tcatcagcaa aggctgcagc ttgaactgcg 420
tgg atg act cac agg act act acg tgg gca aga aga aca tca cgt gct 468
Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala
1 5 10 15
gtg aca ccg act tgt gca acg cca gcg ggg ccc atg ccc tgc agc cgg 516
Val Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg
20 25 30
ctg ccg cca tcc ttg cgc tgc tcc ctg cac tcc gcc tgc tgc tct ggg 564
Leu Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly
35 40 45
gac ccg gcc agc tat agg ctc tgg ggg gcc ccg ctg cag ccc aca ctg 612
Asp Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu
50 55 60
ggt gtg gtg ccc cag gcc tct gtg cca ctc ctc aca cac ccg gcc cag 660
Gly Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln
65 70 75
tgg gag cct gtc ctg gtt cct gag gca cat cct aac gca agt ctg acc 708
Trp Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr
80 85 90 95
atg tat gtc tgc gcc cct gtc ccc cac cct gac cct ccc atg gcc ctc 756
Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu
100 105 110
tcc agg act ccc acc cgg cag atc ggc tct att gac aca gat ccg cct 804
Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro
115 120 125
gca gat ggc ccc tcc aac cct ctc tgc tgc tgt ttc cat ggc cca gca 852
Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala
130 135 140
ttc tcc acc ctt aac cct gtg ctc agg cac ctc ttc ccc cag gaa gcc 900
Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala
145 150 155
ttc cct gcc cac ccc atc tat gac ttg agc cag gtc tgg tcc gtg gtg 948
Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val
160 165 170 175
tcc ccc gca ccc agc agg gga cag gca ctc agg agg gcc cgg taa 993
Ser Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Arg Ala Arg *
180 185
aggctgagat gaagtggact gactagaact ggaggacagg agtcgacgtg agttcctggg 1053
agtctccaga gatggggcct ggaggcctgg aggaaggggc caggcctcac attcgtgggg 1113
ctccctgaat ggcagcctca gcacagcgta ggccttaat aaacacctgt tggataagcc 1173
a 1174

ES 2 549 405 T3

<210> 8
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 8

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10
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> 9
 <211> 1660
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <221> CDS
 <222> (910)..(1479)

20 <400> 9

```

gacagtgaac cctgcgctga aggcggtggg gctcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
cccagggttt cgtgccgafc agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
agggcagtgc tgccttccgg tcaccaggac cagtgtctag cccgcctgct tgacccctt 180
acttagctgg ggtccaatcc ataccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaact 240
tttgaactgg gtgcgactta agcaactgcc tgctgtgcta ctctgcaaa gccagggtga 300
gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcacccagct gggggagcag tgctggaccg 360
cgcgcacccg tgagtggggg gacgacagcc gccaggccta ggtctctgcc actgaactat 420
taatctttct ggccatctgt ccgcacatctgt gtgctgtttt ccttccacct gtccccgacc 480
cgteccgcac ctgcaccccc aacaatcacc cagcatctgt cctccagcc atcctcctcc 540
atctgccact cctccactca tctgtccctc cccatcctcc atcttccact cctccacca 600
tctgtccctc cccatccctg agctcaacta ctcaactcacc ccatttctga cgctcagcgg 660
gtggctccatc tgctcggac atctggatag ggctgagacc agggccgaga ccaggccctc 720
gcactgcttg caatcctgag gccagcccag ggggactcta gagcattagg cagggtggga 780
caggaggagg cctggggcag gtcaggcagg tgagcacaca gggcagcccc atccccgat 840
cccgtgctc cccaggcgca gttggcctcc tgaccgtcat cagcaaaggc tgcagcttga 900
actgcgtgg atg act cac agg act act acg tgg gca aga aga aca tca cgt 951
      Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg
          1             5                 10

gct gtg aca ccg act tgt gca acg cca gcg ggg ccc atg ccc tgc agc 999
Ala Val Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser
  15             20             25             30

cgg ctg ccg cca tcc ttg cgc tgc tcc ctg cac tcg gcc tgc tgc tct 1047
Arg Leu Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser
          35             40             45

ggg gac ccg gcc agc tat agg ctc tgg ggg gcc ccg ctg cag ccc aca 1095
Gly Asp Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr
          50             55             60

ctg ggt gtg gtg ccc cag gcc tct gtg cca ctc ctc aca cac ccg gcc 1143
Leu Gly Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala
          65             70             75

cag tgg gag cct gtc ctg gtt cct gag gca cat cct aac gca agt ctg 1191
Gln Trp Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu
          80             85             90

acc atg tat gtc tgc gcc cct gtc ccc cac cct gac cct ccc atg gcc 1239

```

Thr Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala
 95 100 105 110

ctc tcc agg act ccc acc cgg cag atc ggc tct att gac aca gat cgg 1287
 Leu Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro
 115 120 125

cct gca gat ggc ccc tcc aac cct ctc tgc tgc tgt ttc cat ggc cca 1335
 Pro Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro
 130 135 140

gca ttc tcc acc ctt aac cct gtg ctc agg cac ctc ttc ccc cag gaa 1383
 Ala Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu
 145 150 155

gcc ttc cct gcc cac ccc atc tat gac ttg agc cag gtc tgg tcc gtg 1431
 Ala Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val
 160 165 170

gtg tcc ccc gca ccc agc agg gga cag gca ctc agg agg gcc cgg taa 1479
 Val Ser Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg *
 175 180 185

aggetgagat gaagtggact gactagaact ggaggacagg agtcgacgtg agttcctggg 1539
 agtctccaga gatggggcct ggaggcctgg aggaaggggc caggcctcac attcgtgggg 1599
 ctccctgaat ggcagcctca gcacagcgtg ggcccttaat aaacacctgt tggataagcc 1659
 a 1660

<210> 10
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 10

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

ES 2 549 405 T3

5 <210> 11
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> CDS
 <222> (83)..(427)
 <400> 11

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tg atg gca ggc ttg gcc ctg cag cca ggc act 112
                Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr
                1                5                10

gcc ctg ctg tgc tac tcc tgc aaa gcc cag gtg agc aac gag gac tgc 160
Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn Glu Asp Cys
                15                20                25

ctg cag gtg gag aac tgc acc cag ctg ggg gag cag tgc tgg acc gcg 208
Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys Trp Thr Ala
                30                35                40

cgc atc cgc gca gtt ggc ctc ctg acc gtc atc agc aaa ggc tgc agc 256
Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser
                45                50                55

ttg aac tgc gtg gat gac tca cag gac tac tac gtg ggc aag aag aac 304
Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn
                60                65                70

atc acg tgc tgt gac acc gac ttg tgc aac gcc agc ggc gcc cat gcc 352
Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala
                75                80                85                90

ctg cag cag gct gcc gcc atc ctt gcg ctg ctc cct gca ctc ggc ctg 400
Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu
                95                100                105

ctg ctc tgg gga ccc ggc cag cta tag gctctggggg gccccgctgc 447
Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu *
                110

agcccacact ggggtgtggtg ccccaggcct ctgtgccact cctcacacac cgggccagct 507
gggagcctgt cctggttcct gaggcacatc ctaacgcaag tctgaccatg tatgtctgcg 567
ccccgtgcc ccaccctgac cctccatgg cctctccag gactcccacc cggcagatcg 627
gctctattga cacagatccg cctgcagatg gccctccaa cctctctgc tgcgtttcc 687
atggcccagc attctccacc cttaaccctg tgctcaggca cctcttcccc caggaagcct 747
tcctgcccc cccatctat gacttgagcc aggtctggtc cgtgggtgcc cccgcaccca 807
gcaggggaca ggcactcagg agggcccggg aaaggctgag atgaagtga ctgagtagaa 867
ctggaggaca ggagtcgacg tgagttcctg ggagttcca gagatggggc ctggaggcct 927
ggaggaaggg gccaggcctc acattcgtg ggctccctga atggcagcct cagcacagcg 987
taggcctta ataaacacct gttggataag cca 1020
  
```

15 <210> 12
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 12

Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser

```

      1           5           10           15
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
      85           90           95
Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly
      100          105          110
Gln Leu
    
```

5 <210> 13
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 13

```

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

15 <210> 14
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

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

 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Phe Pro Arg Thr Phe
 85 90 95
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 100 105 110
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 115 120 125
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 130 135 140
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155

5 <210> 15
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

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

10 <210> 16
 <211> 139
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 549 405 T3

```

Ser Pro Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Asn Tyr Leu Asn
 1          5          10          15
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Val
          20          25          30
Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
          35          40          45
Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50          55          60
Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Ile Pro Arg Thr Phe
 65          70          75          80
Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
          85          90          95
Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
          100          105          110
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
          115          120          125

```

```

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
          130          135

```

5
<210> 17
<211> 138
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 17

```

Gln Val His Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
          20          25          30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
          35          40          45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
 50          55          60
Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65          70          75          80
Lys Leu Ser Tyr Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95
Arg Asp Arg Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
          115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
          130          135

```

10
15
<210> 18
<211> 141
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 18

```

Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
 1          5          10          15
Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 20          25          30
Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Glu
 35          40          45
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 50          55          60
Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Cys Gly
 65          70          75          80
Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 85          90          95
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100         105         110
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 115         120         125
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 130         135         140

```

<210> 19
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

```

Gly Leu Gln Cys Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln
 1          5          10          15
Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser
 20          25          30
Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn Tyr Trp Ser
 35          40          45
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile
 50          55          60
Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
 65          70          75          80
Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
 85          90          95
Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly
 100         105         110
Ser Tyr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115         120         125
Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Lys
 130         135

```

10

<210> 20
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 20

ES 2 549 405 T3

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

<210> 21
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

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

<210> 22
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 22

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

10

<210> 23
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 23

```

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

5 <210> 24
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (0)..(0)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

15 <400> 24

```

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

20 <210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 25

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

<210> 26
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 26

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

10

<210> 27
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 27

Glu Met Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

	35		40		45														
Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
	50					55					60								
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro				
65					70					75					80				
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Tyr	Ser	Thr	Pro	Leu				
				85					90					95					
Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala				
			100					105					110						
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly				
		115					120					125							
Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala				
	130					135					140								
Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly							
145					150					155									

<210> 28
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 28

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

<210> 29
 <211> 145
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 29

```

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

                        85                        90                        95
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      100           105           110
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      115           120           125
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
      130           135           140
Gly
145

```

5 <210> 30
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 30

```

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
 1           5           10           15
Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala
      20           25           30
Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
      35           40           45
Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala Val Ser
      50           55           60
Val Lys Ser Arg Met Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
      65           70           75           80
Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      85           90           95
Cys Ala Arg Glu Arg Leu Gly Glu Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
      100           105           110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
      115           120           125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
      130           135

```

10 <210> 31
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Leu Gln Val Gln Pro Glu Cys Leu Tyr Thr Val Ser Asp Lys Asn Asn
 1 5 10 15
 Phe Leu Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 20 25 30
 Met Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 35 40 45
 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 50 55 60
 Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
 65 70 75 80
 Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 85 90 95
 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 100 105 110
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 115 120 125

<210> 32
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

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

<210> 33
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

15

<400> 33

ES 2 549 405 T3

```

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

```

<210> 34
 <211> 445
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 34

```

gtggcagcac ccagatgggt cctgtcccag gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg 60
gtgaagcctt cacagaccct gtcctcacc tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt 120
ggtggttact actggatctg gatccgccag caccagggga agggcctgga gtggattggg 180
tacatctatt acaatgggaa cacctactac aaccctccc tcaagagtcg agttaccatg 240
tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc ctgaagctga gctctgtgac tgccgcggac 300
acggccgtgt attactgtgc gagagatggg attactatga tacgcggcta ctactacggt 360
atggacgtct gggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagcctccac caagggccca 420
tcggtcaagg gcccatcggg cttca                                     445

```

10

<210> 35
 <211> 148
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 35

```

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

```

5 <210> 36
 <211> 466
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(0)
 <223> n = a, t, c o g

<400> 36

```

cagctgacnc agtctccatc ttccgtgtct gcatctgtag gagacagagt caccatcact 60
tgctggggcga gtcggggtat tagcagctgg ttagcctggt atcagcagaa accagggaaa 120
gcccctaagc tctgateta tactgcatcc agtttgcaaa gtggagtccc atcaaggttc 180
agcggcagtg gttctgggac agatttcact ctcaccatca gcagcctgca gcctgaagat 240
tttgcaactt actattgtca acaggcttac agtttccctc ggacgttcgg ccaagggacc 300
aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcattctccc gccatctgat 360
gagcagttga aatctggaac tgctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 420
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggta 466

```

15 <210> 37
 <211> 155
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 37

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

<210> 38
 <211> 409
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 38

cagtgtgtgg cagcaccag atgggtcctg tcccaggtgc agctgcagga gtcgggccc 60
 ggactgtgga agccttcaca gacctgtcc ctcacctgca ctgtctctgg tggctccatc 120
 agcagtggg gttactactg gagctggatc cgccagcacc caggggaagg cctggagtgg 180
 attgggtaca tatattacag tgggagcacc tactacaacc cgtccctcaa gagtcgagtt 240
 accatatcag tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgactgcc 300
 gcggacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga gatcgaatta ctatggttcg gggaggtatt 360
 cccagtggta tggacgtctg gggccaaggg accacgggtca ccgtctcct 409

10

<210> 39
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 39

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

<210> 43
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 43

```

Gln Val His Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1          5          10          15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
      20          25          30
Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
      35          40          45
Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
 50          55          60
Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65          70          75          80
Lys Leu Ser Tyr Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
      85          90          95
Arg Asp Arg Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
      100          105          110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
      115          120          125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
130          135
    
```

10 <210> 44
 <211> 425
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 44

```

tctccagggg aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtattgg cagcacctac 60
ttagcctggt accagcagaa acctggccag gctcccaggc tectcatcta tggatcatcc 120
agcagggcca ctggcatccc agaaagggtc agtggcagtg ggtctgggac agacttcaact 180
ctcaccatca ggggactgga gcoctgaagat tttgcagtggt tttactgtca acagtgtggt 240
agctcacctc cgacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca 300
ccatctgtct tcattctccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctggt 360
gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 420
gcctt                                     425
    
```

20 <210> 45
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 45

ES 2 549 405 T3

Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile
1				5					10					15	
Gly	Ser	Thr	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
			20					25					30		
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Glu	
		35					40					45			
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
	50					55					60				
Gly	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Phe	Tyr	Cys	Gln	Gln	Cys	Gly
65					70					75					80
Ser	Ser	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
				85					90					95	
Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln
			100					105					110		
Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr
		115					120						125		

Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala
	130					135					140	

5 <210> 46
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 46

10 ggtctgcagt gtgtggcagc acccagatgg gtcctgtccc aggtgcagct acagcagtg 60
 ggcgaggac tgttgaagcc ttcggagacc ctgtccctca cctgcgctgt ctatgggtgg 120
 tccttcagtg gtaactactg gagctggatc cgccagcccc caggggaagg gctggagtgg 180
 attggggaaa tcaatcatag tggaagcacc aactacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc 240
 accatatcag tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgaccgcc 300
 gcggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga ggggggagct acaactactt tgactactgg 360
 ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca gcctccacca agggcccatc ggtcaag 417

15 <210> 47
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 47

ES 2 549 405 T3

Gly	Leu	Gln	Cys	Val	Ala	Ala	Pro	Arg	Trp	Val	Leu	Ser	Gln	Val	Gln
1				5				10						15	
Leu	Gln	Gln	Trp	Gly	Ala	Gly	Leu	Leu	Lys	Pro	Ser	Glu	Thr	Leu	Ser
			20					25						30	
Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Tyr	Gly	Gly	Ser	Phe	Ser	Gly	Asn	Tyr	Trp	Ser
		35					40					45			
Trp	Ile	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ile
	50					55					60				
Asn	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Val
65					70					75					80
Thr	Ile	Ser	Val	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser
				85					90						95
Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Gly
			100					105						110	
Ser	Tyr	Asn	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
		115					120					125			
Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Lys					
		130				135									

<210> 48
 <211> 933
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 48

```

aaaaaagtca gtoccaacca ggacacagca tggacatgag ggtccctgct cagctcctgg 60
ggctcctgct gctctggctc tcaggtgcca gatgtgacat ccagatgact cagtctccat 120
cctccctgct tgcattctgta ggagacagag tcaccatcac ttgccaggcg agtcaggaca 180
ttagcaacta tttgaattgg tatcagcaga gtcccgggaa agcccctaag ttcctgatct 240
ccgatgcac ccaatttaaaa acaggggtcc catcaaggtt cagtggaagt ggatctggga 300
cagatttttc tttcaccatc agcagcctac agcctgaaga tattgcgacc tattgctgtc 360
aacagtatga tagtctccca ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgaa 420
ctgtggctgc accatctgct ttcattctcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 480
ctgctctgt tgtgtgctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga 540
agtgagataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca 600
aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac 660
    
```

```

acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgct acaaagagct 720
tcaacagggg agagtgttag agggagaagt gcccccacct gctcctcagt tccagcctga 780
ccccctccca tcctttggcc tctgaccctt tttccacagg ggacctacce ctattgctgt 840
cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaaatt atgctaattg 900
tgagaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttg 933
    
```

10

<210> 49
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 49

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

<210> 50
 <211> 968
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 50

```

aaagatcagg actcctcagt tcacottctc acaatgaggc tccctgctca gctcctgggg 60
ctgctaatgc tctgggtctc tggatccagt ggggatattg tgatgactca gtctccactc 120
tccctgcccc tcacccctgg agagccggcc tccatctcct gcaggtctag tcagagcctc 180
ctacatagta atggatacaa ctatttggtt tggtacctgc agaagccagg acagtctcca 240
cagctcctga tctatattgg ttctattcgg gcctccgggg tccctgacag gttcagtggc 300
agtggatcag gcacagattt tacactgaaa atcagcagag tggaggctga ggatgttggg 360
gtttattact gcatgcaacc tctacaaaact ccgatcacct tgggccaagg gacacgactg 420
gagattaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 480
ttgaaatctg gaactgcctc tgtttgtgtc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc 540
aaagtacagt ggaaggtgga taacgcctc caatcgggta actcccagga gagtgacaca 600
gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctacagcagc cctgacgct gagcaaagca 660

gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc 720
gtcacaaga gcttcaacag gggagagtgt tagagggaga agtgcccca cctgctcctc 780
agttccagcc tgacccctc ccactcttg gcctctgacc cttttccac aggggacctc 840
ccctattgc ggtcctccag ctcatcttc acctcacc cctcctcctc cttggcttta 900
attatgctaa tgttgaggga gaatgaata ataaagtga tctttgcaaa aaaaaaaaaa 960
aaaaaaaaa
    
```

10

<210> 51
 <211> 239
 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 51

```

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

```

5

<210> 52

<211> 425

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 52

```

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtccccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatggttatg cagtatctgt gaaaagtcga atgaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagagaggt taggggagtt atacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
accta                                           425

```

15

<210> 53

<211> 141

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 53

```

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

```

<210> 54
 <211> 484
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 54

```

cagctgacgc agtctccaga ctccttggct gtgtctctgg gcgagagggc caccatcaac 60
tgcaagtcca gccagaatat ttatacagg tccagcaaga agaaccactt agtttgggtac 120
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatttact gggcatctac cggggaatcc 180
gggggtccctg cccgattcag tggcagcggg tctgtggacag atttcactct caccatcagc 240
accctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc aatattatag tactcctccc 300
accttcggcc aaggacacg actggagatt aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgocctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggta                                         484

```

10

<210> 55
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 55

```

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

```

```

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
      115                      120                      125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
      130                      135                      140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
      145                      150                      155                      160
Gly
    
```

5
 <210> 56
 <211> 409
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(0)
 <223> n = a, t, c o g

<400> 56

15
 ggcccaggac nggngaagcc ttcacagacc tgtccctcac cggcactgtc tctggtggcc 60
 catcagcagt ggtggttatt actggagctg gatccgccag caccagggga agggcctgga 120
 gtggattggg aacatctatt acagtgggag cacctactac aaccctgcc tcaagagtcg 180
 agttaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc ctgaagctga gcgctgtgac 240
 tgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagagataat attactatgg ttcggggagt 300
 ctactacggt atggacgtct ggggccaaagg gaccacggtc accgtctcct cagcctccac 360
 caagggccca tcggtcttcc ccctggcacc ctccctccaag agcacctat 409

20
 <210> 57
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (0)..(0)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 57

```

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

30

ES 2 549 405 T3

<210> 58
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 58

```
tatgcagcat ccagtttgca aagtggggtc ccatcaaggt tcagcggcag tggatctgga 60
acagacttca ctctcaccat cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttactattgt 120
caacaggctc acagtctccc tcggacggtc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga 180
actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 240
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gaaaggccaa agtacagtgg 300
aaggtggata acaccctcca a 321
```

10 <210> 59
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 59

```
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 1          5          10          15
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 20
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala His Ser Leu Pro Arg
 35          40          45
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 50          55          60
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 65          70          75          80
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Lys Ala
 85          90          95
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Thr Leu Gln
 100          105
```

20 <210> 60
 <211> 433
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 60

```
caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgctccggatt caccttcagt cgccatggcg tgcactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
ctgcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggagtc 300
cttatagcag ttcgctccggg gtactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cct 433
```

30 <210> 61
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 61

ES 2 549 405 T3

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

<210> 62
 <211> 471
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 62

gaaatgcagc	tgacccagtc	tccatcctcc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggcaagtca	gagcattagc	agctatttaa	attggtatca	gcagaaacca	120
gggaaagccc	ctaagctcct	gatctatgct	gcatccagtt	tgcaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagtg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtcaacag	agttacagta	ccccgctcac	tttcggcgga	300
gggaccaagg	tggagatcaa	acgaactgtg	gctgcacat	ctgtcttcat	cttcccccca	360
tctgatgagc	agttgaaatc	tggaaactgcc	tctgtttgtg	gcctgctgaa	taacttctat	420
cccagagagg	ccaaagtaca	gtggaagggtg	gataacgccc	tccaatcggg	t	471

10

<210> 63
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 63

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

5 <210> 64
 <211> 424
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 64

tgtccagg	tg	cactgcagga	gc	gtcgggcccc	gc	ggactgggtga	gc	ggccttcaca	gc	gaccctgtcc	60
ctcacctgca	ct	ctgtctctgg	tg	tggtcccatc	ag	agcagtggtg	gt	gtacttacta	ct	ctggatctgg	120
atccgccagc	ac	accagggaa	gg	ggcctggag	tg	tgattgggt	ac	atcttatta	ca	gctggggagc	180
acctactaca	ac	ccgtccct	ca	agagtcga	gt	taccatat	ca	gtagacac	gt	ctaaagaac	240
cagttctccc	tg	aagctgag	ct	ctgtgact	gc	cgccggaca	cg	gccgtgta	tt	actgtgcg	300
agagatggaa	tt	actatggt	tc	ggggaatt	ag	cggggggca	tg	gacgtctg	gg	gccaaggg	360
accacggtca	cc	gtctctc	ag	ctccacc	aa	gggcccac	cg	gtcaaggg	ccc	atcggtc	420
ttca											424

10 <210> 65
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

Ile Ser Ser His Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
 20 25 30
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
 35 40 45
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser
 50 55 60
 Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr
 65 70 75 80
 Ser Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Thr Arg
 85 90 95
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100 105 110
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 115 120 125
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 130 135 140
 Gly
 145

<210> 68
 <211> 417
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 68

cagctgcagc agtcaggctc aggactgggtg aagccctcgc agaccctctc actcacctgt 60
 gccatctccg gggacagtgt ctctagcaac agtgctgctt ggaactggat caggcagctc 120
 ccatcgagag gccttgagtg gctgggaagg acatactaca ggtccaagtg gtataatgaa 180
 tatgcagtat ctgtgaaaag tcgaatgacc atcaaccacg acacatccaa gaaccagttc 240
 tcctgcagc tgaactctgt gactcccagag gacacggctg tgtattactg tgcaagagag 300
 aggttagggg agttatacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccatggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggcc atcgggtcttc ccctggcac cctcctccaa gagcacc 417

10

<210> 69
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 69

Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala
 20 25 30
 Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala Val Ser
 50 55 60
 Val Lys Ser Arg Met Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Arg Leu Gly Glu Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135

20

ES 2 549 405 T3

<210> 70
 <211> 384
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 70

```

ctgcaagtcc agccagagtg tctttataca gtgtccgaca agaacaactt cttatgttgg 60
taccagcaga aaccaggaca gcctcctaaa ctgctcatgt actgggcatc tatccgggaa 120
tccgggggcc ctgaccgatt cagtggcagc gggctctgga cagatttcac tctcaccatc 180
agcagcctgc aggctgaaga tgtggcagtt tattactgtc agcaatatta tagtactcct 240
cccaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 300
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgacctg 360
ctgaataact tctatcccag agag                                     384
    
```

<210> 71
 <211> 128
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 71

```

Leu Gln Val Gln Pro Glu Cys Leu Tyr Thr Val Ser Asp Lys Asn Asn
 1           5           10           15
Phe Leu Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 20           25           30
Met Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 35           40           45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
 50           55           60
Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
 65           70           75           80
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 85           90           95
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
           100           105           110
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
           115           120           125
    
```

<210> 72
 <211> 425
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 72

```

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctgggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcc aacctcgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtccccat ggagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatgaatatg cagtatctgt gaaaagtcga atgaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagagaggt taggggagtt atacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
accta                                             425
    
```

<210> 73
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

ES 2 549 405 T3

<400> 73

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

5 <210> 74
 <211> 487
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (0)..(0)
 <223> n = a, t, c o g

15 <400> 74

```

atgcagctga cncagttctcc agactccctg gctgtgtctc tgggcgagag ggccaccatc 60
aactgcaagt ccagccagaa tgttttatac aggtccaaca agaagaactt cttagtttgg 120
taccagcaga aaccaggaca gcctoctaag ctgctcattt actgggcatc tatccgggaa 180
tccggggtec ctgaccgatt cagtggcagc gggctctggga cagatttcac tctcaccatc 240
agcagcctgc agactgaaga tgtggcagtt tattactgtc agcaatatta tagtactcct 300
cccaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggta                                     487
  
```

20 <210> 75
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <400> 75

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

5 <210> 76
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Marcador Flag

<400> 76
 gattacaagg atgacgacga taag 24

15 <210> 77
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Secuencia de control

<400> 77
 aagggacgaa gacgaacacu uctt 24

25 <210> 78
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Secuencia de control

<400> 78
 aactgaagac ctgaagacaa taa 23

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo monoclonal o un fragmento de unión a antígeno del mismo que comprende un sitio de unión a antígeno que se une específicamente con una proteína PSCA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, y en donde el anticuerpo monoclonal comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_H de SEC ID N°: 47 y la región V_L de SEC ID N°: 51.
- 10 2. Un anticuerpo o un fragmento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el fragmento es un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o sFv.
3. Un anticuerpo o un fragmento de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el anticuerpo o el fragmento se acoplan con un marcador detectable, una toxina, un agente terapéutico o un agente quimioterapéutico.
- 15 4. Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal de acuerdo con la reivindicación 1.
5. Un hibridoma de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el hibridoma está depositado en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) N° de Referencia PTA-6701.
- 20 6. Un polinucleótido que codifica una secuencia que comprende una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
7. Un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 6, que codifica la cadena ligera y la cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.
- 25 8. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7.
9. Una célula transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 8.
- 30 10. Un método para producir un anticuerpo como se ha definido en la reivindicación 1, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que comprende:
- cultivar una célula, en donde:
- 35 (a) la célula se ha transfectado con un vector que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia que comprende la región variable de cadena ligera de un anticuerpo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 2 y un vector que comprende un polinucleótido que codifica una secuencia que comprende la región variable de cadena pesada de un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2;
- o
- 40 (b) una célula transfectada con un vector de acuerdo con la reivindicación 8;
- por el que se produce el anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo.
- 45 11. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo, o un fragmento Fab, F(ab')₂, Fv o sFv de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
12. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en donde la composición es para el tratamiento de cáncer de cánceres que expresan PSCA.
- 50 13. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el cáncer es cáncer de próstata, páncreas, vejiga, riñón, colon, pulmón, ovario o mama.
14. Un agente antineoplásico para reducir el crecimiento tumoral de células tumorales que expresan PSCA, en donde dicho agente antineoplásico comprende una combinación de un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 y 2, y un agente quimioterapéutico.
- 55 15. Un agente antineoplásico para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el tumor es un tumor de cáncer de próstata, pancreático, de vejiga, de riñón, de colon, de pulmón, de ovario o de mama.
- 60 16. Un agente antineoplásico para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichos anticuerpo o fragmento se acoplan con un marcador detectable que es un radioisótopo, un quelante metálico, una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente o un compuesto quimioluminiscente.
17. Un agente antineoplásico para uso de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el radioisótopo es ²¹²Bi, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ²¹¹At, ¹²⁵I, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹³Bi, ³²P o Lu.
- 65

18. Un agente antineoplásico para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde agente quimioterapéutico es ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorrubicina, un maitansinoide, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, sarcina alfa, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, glucocorticoide, auristatinas, auromicina, itrio, bismuto, combrestatina, duocarmicinas, dolostatina, cc1065 o un cisplatino.
19. Uso de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la preparación de un medicamento para uso en un método para inhibir el crecimiento de una célula cancerosa que expresa una proteína PSCA que comprende la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2 en un sujeto.
20. Uso de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el anticuerpo o el fragmento de unión a antígeno del mismo se acopla con un agente citotóxico o un marcador detectable.
21. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en donde el anticuerpo o el fragmento se acopla con un marcador detectable que es un radioisótopo, un quelante metálico, una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminiscente o un compuesto quimioluminiscente.
22. Uso de acuerdo con la reivindicación 21, en donde dicho radioisótopo es ^{212}Bi , ^{131}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{211}At , ^{125}I , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{213}Bi , ^{32}P o Lu.
23. Uso de acuerdo con la reivindicación 20, en el que el agente citotóxico es ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorrubicina, un maitansinoide, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina, toxina diftérica, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modeccina, alfa sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inhibidor de *Saponaria officinalis*, glucocorticoide, auristatinas, auromicina, itrio, bismuto, combrestatina, duocarmicinas, dolostatina, cc1065 o un cisplatino.
24. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23, en donde la célula cancerosa es una célula de cáncer de próstata, páncreas, vejiga, riñón, colon, pulmón, ovario o mama.
25. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para uso en un método para tratar el cáncer en un sujeto, en donde el cáncer expresa la proteína PSCA.
26. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el cáncer es cáncer de próstata, páncreas, vejiga, riñón, colon, pulmón, ovario o mama.
27. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con las reivindicaciones 25 o 26, en donde dichos anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se administran junto con un agente quimioterapéutico, radiación o ambos.
28. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el anticuerpo monoclonal se administra antes, durante o después de comenzar la administración del agente quimioterapéutico o la radiación o ambos.
29. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 28, en donde el anticuerpo monoclonal se administra entre 1 y 60 días antes de comenzar la radioterapia y/o la quimioterapia.
30. Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo para uso de acuerdo con la reivindicación 27, en donde el agente quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en cisplatino, dacarbazina (DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), daunorrubicina, procarbacin, mitomicina, citarabina, etopósido, metotrexato, 5-fluorouracilo, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleuquina, asparaginasa, busulfán, carboplatino, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidroxurea, ifosfamida, interferón alfa, leuprolide, megestrol, melfalán, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargasa, pentostatina, pipobromán, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, tenipósido, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostaza de uracilo, vinorelbina, clorambucilo, taxol y combinaciones de los mismos.

Figura 1

Figura 1A. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 1) y aminoácidos (SEC ID N°: 2) de PSCAv.1
La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada.

```

1           M K A V L L A L L M A G L A L
1  agggagaggcagtgaccATGAAGGCTGTGCTGCTTGGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCC
16  Q P G T A L L C Y S C K A Q V S N E D C
61  TGCAGCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACT
36  L Q V E N C T Q L G E Q C W T A R I R A
121 GCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGGCATCCGGC
56  V G L L T V I S K G C S L N C V D D S Q
181 CAGTTGGCCTCCTGACCGTCATCAGCAAAGGCTGCAGCTTGAACTGCGTGGATGACTCAC
76  D Y Y V G K K N I T C C D T D L C N A S
241 AGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCCGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCA
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 TGCTGCTCTGGGGACCCGCCAGCTATAGgctctggggggccccgctgcagcccacactg
421 ggtgtggtgccccaggcctttgtgccactcctcacagaacctggcccagtgaggagcctgt
481 cctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtttgaccatgtatgtttgaccccccttttcc
541 ccnaacctgacctteccatgggccttttccaggattcccaaccggccagatcagttttag
601 tgacacagatccgcctgcagatggccccctccaaccctttctggtgctggttccatggccc
661 agcattttccacccttaaccctgtgttcaggcacttcttccccaggaagccttccctgc
721 ccaccccatttatgaattgagccaggtttggtccgtggtgtcccccgcaccagcagggg
781 acaggcaatcaggagggcccagtaaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggagg
841 acaagagttgacgtgagttcctgggagtttccagagatggggcctggaggcctggaggaa
901 ggggccaggcctcacatttgtggggctcccgaatggcagcctgagcacagcgtagggcct
961 taataaacacctgttggataagccaaaaaa
    
```

Figura 1B. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 3) y aminoácidos (SEC ID N°: 4) de PSCA v.2
La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada.

```

1           M K
1  tttgaggccatataaagtcacctgaggccctotccaccacagcccaccagtgaccATGAA
3  A V L L A L L M A G L A L Q P G T A L L
61  GGCTGTGCTGCTTGGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT
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 CCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
    
```

Figura 1B-2

```

63 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
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 GGCTGCCGCCATCCTTGGCGTGTCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
123 L *
421 GCTATAGGctctggggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgcactcctcacacaccggccagtgaggagcctgtcctggttctctgaggcacatecta
541 acgcaagtctgacctgtatgtctgcgccccctgtccccaccctgacctcccatggccc
601 tctccaggactcccaccggcagatcggtctattgacacagatccgcctgcagatggcc
661 cctccaaacctctctgtctgtgtttccatggcccagcattctccacccttaacctgtgc
721 tcaggaacctcttccccaggaagccttccctgcccaccccattctatgacttgagccagg
781 tctggtccgtggtgtccccgcaccagcaggggacaggaactcaggagggccccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggc
961 tccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca
    
```

Figura 1C. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 5) y aminoácidos (SEC ID N°: 6) de PSCA v.3
La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada.

```

1 tttgaggccatataaaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgacctgaa
61 ggctgtgctgcttgcctgttgatggcaggcttggccctgcagccaggcactgcccctgct
121 gtgctactcctgcaaagcccaggcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgc
181 agcttgaactgctggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgc
241 tgtgacaccgacttgtgactcggcctgctgctctggggacccggccagctataggctct
301 ggggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggectctgtgccaactcctca
361 cacaccogggcccagtgaggcctgtcctgggtcctgaggcacatcctaacgcaagtctga
1 M Y V C A P V P H P D P P M A L S R T P
421 ccATGTATGTCTGGGCCCTGTCCCCACCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTC
21 T R Q I G S I D T D P P A D G P S N P L
481 CCACCCGGCAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCTCCAACCCCTC
41 C C C F H G P A F S T L N P V L R H L F
541 TCTGCTGCTGTTCCATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCT
61 P Q E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V
601 TCCCCAGGAAGCCTTCCCTGCCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGG
81 S P A P S R G Q A L R R A R *
661 TGTCCCCCGCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAAaggctgagatgaa
721 gtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagctcctcagagat
781 ggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggc
841 agcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca
    
```

Figura 1D. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 7) y aminoácidos (SEC ID N°: 8) de PSCA v.4
La metionina de partida está subrayada.

```

1 gacagtgaaccctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
61 cccagggtttcgtgccgatcagcccaggacgggtcttccoggtgcagttctgatgcgggg
121 agggcagtgtgccttccggtcaccaggaccagtgtcagcccgcctgcttgaccccctt
181 acttagctggggtccaatecataccaatttagatgattcagaogatgggatttgaaact
241 tttgaaactgggtgagacttaagcaactgcctgtgtgctactcctgcaaagcccagggtga
301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccg
361 cgcgcacccgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcg
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 TGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGTCC
40 L H S A C C S G D P A S Y R L W G A P L
541 CTGCACTCGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCCCCGCTG
60 Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P A Q
601 CAGCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCGGCCAG
80 W E P V L V P E A H P N A S L T M Y V C
661 TGGGAGCCTGTCTGTTCTGAGGACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTATGTCTGC
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 GGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCTCCAACCCTCTCTGTGCTGTTTC
140 H G P A F S T L N P V L R H L F P Q E A
841 CATGGCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCAGGAAGCC
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 AGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAaaggctgagatgaagtggactgagtaga
1021 actggaggacaggagtgacgtgagttcctgggagttccagagatggggcctggaggcc
1081 tggaggaaggggcccagcctcacattcgtgggctccctgaatggcagcctcagcacagc
1141 gtaggcccttaataaacacctgttggataagcca

```

Figura 1E. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 9) y aminoácidos (SEC ID N°: 10) de PSCA v.5
La metionina de partida está subrayada.

```

1 gacagtgaaccctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
61 cccagggtttcgtgccgatcagcccaggacgggtcttccoggtgcagttctgatgcgggg
121 agggcagtgtgccttccggtcaccaggaccagtgtcagcccgcctgcttgaccccctt
181 acttagctggggtccaatecataccaatttagatgattcagaogatgggatttgaaact
241 tttgaaactgggtgagacttaagcaactgcctgtgtgctactcctgcaaagcccagggtga
301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccg

```

Figura 1E-2

361 cgcgcatccgtgagtggggggacgacagccgcccaggcctaggtctctgccactgaactat
 421 taatctttctggccatctgtccgcatctgtgtgctgttttcttccacctgtccccgacc
 481 cgtcccgcacctgcaccccccaacaatcaccagcactctgtccctccagccatcctcctcc
 541 atctgccactcctccactcactctgtccctcccatcctccatcttccactcctccacca
 601 tctgtccctcccatcctgagctcacttactcactcaccatcttctgagctcagcgg
 661 gtggtccatctgcctcggacatctggatagggctgagaccagggccgagaccagggcctc
 721 gcaactgcttgcaatcctgaggccagcccagggggactctagagcattaggcagggtgga
 781 caggaggaggcctggggcaggtcaggcaggtgagcacacagggcagcccatccccggat
 841 cccgctgctccccagggcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttga
 1 M T H R T T T W A R R T S R A V T
 901 actgcggtgg**ATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACA**
 18 P T C A T P A G P M P C S R L P P S L R
 961 CCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGGCG
 38 C S L H S A C C S G D P A S Y R L W G A
 1021 TGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCC
 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 GCCCAGTGGGAGCCTGTCTGGTTCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTAT
 98 V C A P V P H P D P P M A L S R T P T R
 1201 GTCTGCGCCCTGTCCCCACCCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGG
 118 Q I G S I D T D P P A D G P S N P L C C
 1261 CAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCTGCAGATGGCCCTCCAACCCTCTCTGCTGC
 138 C F H G P A F S T L N P V L R H L F P Q
 1321 TGTTTCCATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTCCCCCAG
 158 E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P
 1381 GAAGCCTTCCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGCTTGGTCCGTGGTGTCCCC
 178 A P S R G Q A L R R A R *
 1441 GCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAAaggctgagatgaagtggactg
 1501 agtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtctccagagatggggcctg
 1561 gaggcctggaggaaggggcccagggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcag
 1621 cacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

Figura 1F. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 11) y aminoácidos (SEC ID N°: 12) de PSCAv.6
 La secuencia Kozak se muestra en negrita, la metionina de partida está subrayada.

1 tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaa
 1 M A G L A L Q P G T A L L
 61 ggctgtgctgcttgccctgttg**ATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT**
 14 C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
 121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC

Figura 1F-2

34 Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I
 181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGTGGACCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
 54 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
 241 CAGCAAAGGCTGCAGCTGAACTGCGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
 74 N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
 301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCC
 94 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
 361 GGCTGCCGCCATCCTTGGCCTGCTCCCTGCACCTCGGCCCTGCTGCTCTGGGGACCCCGCCA
 114 L *

421 GCTATAGgctctgsgggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
 481 tgccactcctcacacaccggccccagtgaggcctgtcctggttcttgaggcacatccta
 541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgccccctgtccccaccctgaccctcccattggccc
 601 tctccaggactcccaccggcagatcggtctattgacacagatccgcctgcagatggcc
 661 cctccaaccctctctgctgctgtttccatggccccagcattctccacccttaaccctgtgc
 721 tcaggcacctcttccccagggaagccttccctgccaccccatctatgacttgagccagg
 781 tctggtccgtggtgtccccgcacccagcaggggacaggcactcaggaggggccccgtaaa
 841 ggctgagatgaagtggactgagttagaactggaggacaggagtcgaactgagttcctggga
 901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggc
 961 tccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

Figura 1G. Variantes de SNP de PSCA v.2, PSCA v.7 a v.18

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>
PSCAv.10	499	C/T	<i>Variante silenciosa</i>
PSCAv.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>
PSCAv.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>
PSCAv.17	878	G/A	<i>Variante silenciosa</i>
PSCA v.18	978	C/G	<i>Variante silenciosa</i>

Figura 1H. Variantes de SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 a v.30

Variante	Posición de ácido nucleico	Variación de ácido nucleico	Posición de aminoácido	Variación de aminoácido
PSCA v.19	521	CAT	33	P/L
PSCA v.20	578	A/C	52	Y/S
PSCA v.21	649	C/G	76	H/D
PSCAv.22	653	CAT	77	P/L
PSCA v.23	717	C/T	98	<i>Variante silenciosa</i>
PSCAv.24	721	G/A	100	A/T
PSCAv.25	781	G/A	120	G/S
PSCAv.26	788	T/G	122	I/S
PSCAv.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>

Figura 11 (a). Expresión de Variantes de PSCA

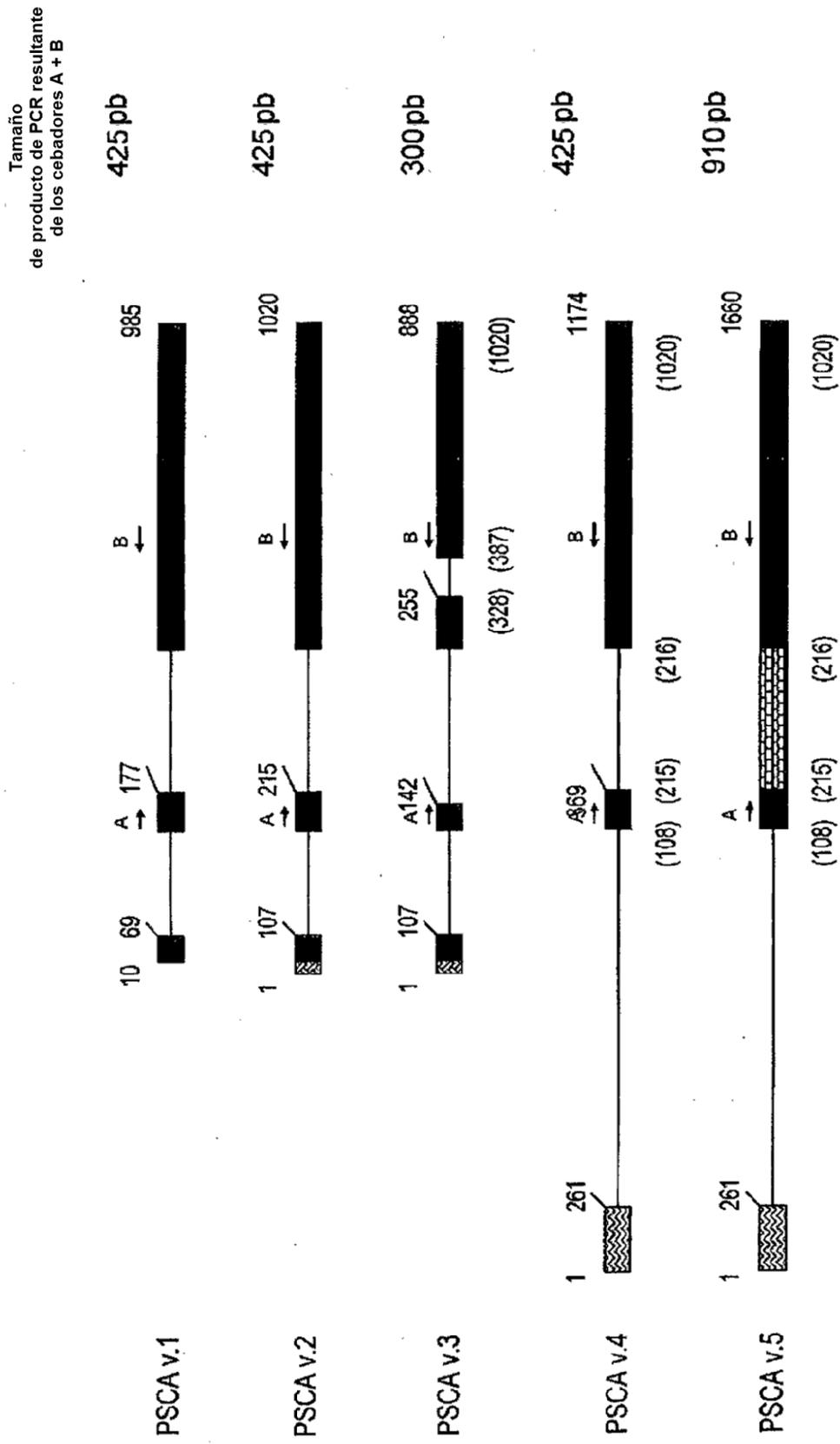
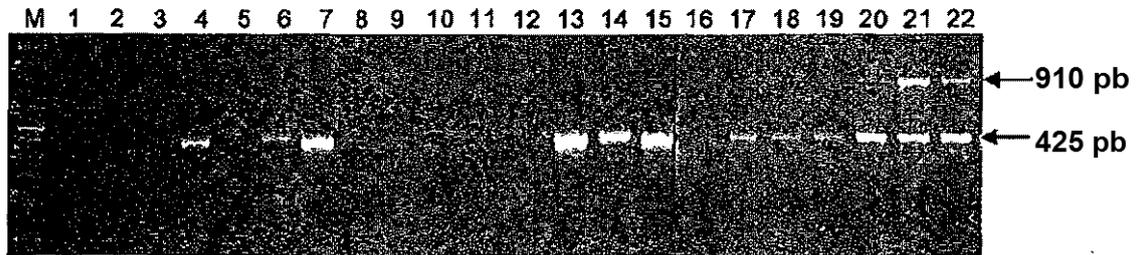


Figura 1I(b). Expresión de Variantes de PSCA



M = Marcador

- Vejiga
- Cerebro
- Corazón
- Riñón
- Hígado
- Pulmón
- Próstata
- Bazo
- Músculo esquelético
- Testículo
- Páncreas
- Colon
- Estómago

- Cáncer de próstata
- Cáncer de vejiga
- Cáncer de riñón
- Cáncer de colon
- Cáncer de pulmón
- Cáncer de ovario
- Cáncer de mama
- Metástasis de cáncer
- Cáncer de páncreas

Figura 1 J(a). Expresión de PSCA v.4 y PSCA v.5

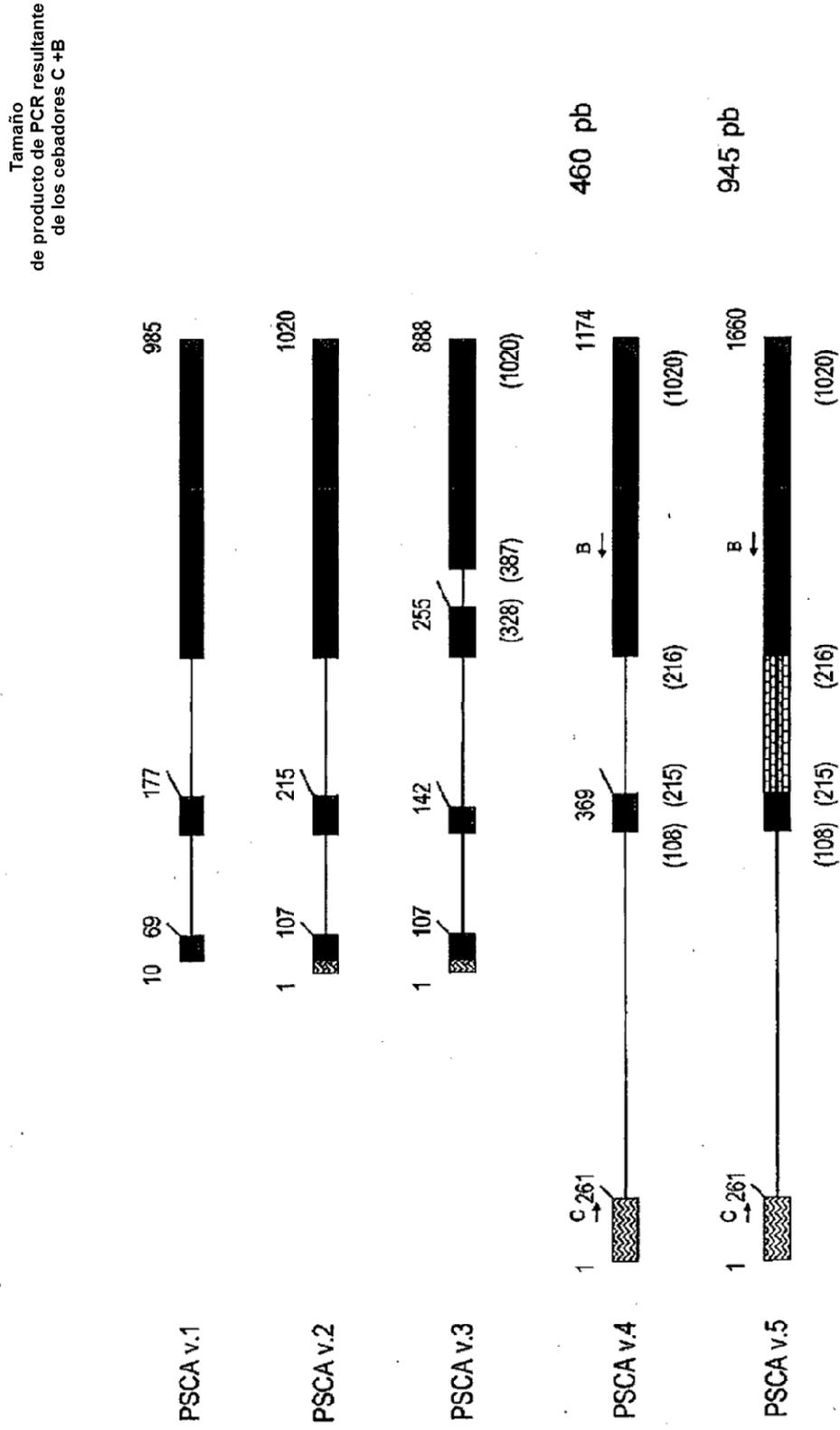
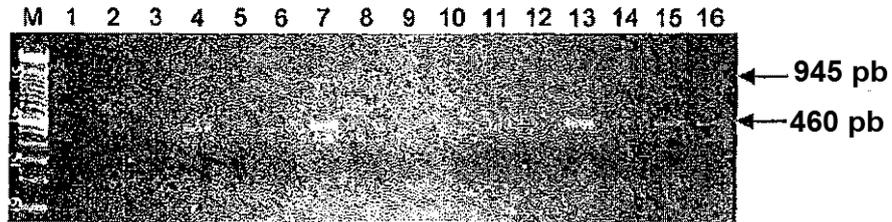


Figura 1J(b). Expresión de PSCA v.4 y PSCA v.5



M = Marcador

- Vejiga
- Cerebro
- Corazón
- Riñón
- Hígado
- Pulmón
- Próstata
- Bazo
- Músculo esquelético
- Testículo
- Páncreas
- Colon
- Estómago

- Cáncer de próstata
- Cáncer de vejiga
- Grupo de xenoinjerto múltiple

Figura 2:

Figura 2A. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 13) de Ha1-4.117 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada.

1 VAAPRWVLSQ VQLQESGPGV VKPSQTLTSLT CTVSGGSISS GGYWIIWIRQ HPGKGLEWIG
61 YIYYNGNTYY NPSLKSRTVM SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARDG ITMIRGYIYG
121 MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVKGPSVF

Figura 2B. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 14) de Ha1-4.117 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera.

1 QLTQSPSSVS ASVGDRVTIT CRASRGISW LAWYQQKPGK APKLLIYTAS SLQSGVPSRF
61 SGSGSGTDFE LTISSLQPED FATYYCQAY SFRFTFGQGT KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD
121 EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSG

Figura 2C. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 15) de Ha1-4.120 VH

1 QCVAAPRWVL SQVQLQESGP GLVKPSQTLS LTCTVSGGSI SGGYIWSWI RQHPKGLEW
61 IGYIYSGST YNPSLKSRTV TISVDTSKNQ FSLKLSSVTA ADTAVYYCAR DRITMVRGGI
121 PSGMDVWGQG TTVTVS

Figura 2D. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 16) de Ha1-4.120 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 SPFTCRASQS ITNYLNWYQQ KPGEAPKLLI HVASSLQSGV PSRFSGSGSG RDTLTISSL
61 QPDEFATYYC QQSHSIPRTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLNN
121 FYPREAKVQW KVDNALQSG

Figura 2E. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 17) de Ha1-5.99 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 QVHLQQWAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFY GYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTSYK
61 PSLKSRTVTS VDTSKNQFSL KLSYVTAADT AVYYCARDRG DYGDFLFDYW GQGLVTVSS
121 ASTKGPSVFP LAPSSKST

Figura 2F. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 18) de Ha1-5.99 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 SPGERATLSC RASQSIGSTY LAWYQQKPGQ APRLLIYGAS SRATGIPERF SGSGSGTDFE
61 LTISGLEPED FAVFYCQCG SSPPTFGQGT KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV
121 VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN A

Figura 2G. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 19) de Ha1-4.121 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 GLQCVAAPRW VLSQVQLQQW GAGLLKPSSET LSLTCAVYGG SFSGNYWSWI RQPPGKGLEW
61 IGEINHSGST NYNPSLKSRV TISVDTSKNQ FSLKLSVTA ADTAVYYCAR GGSYNYFDYW
121 GQGLTVTVSS ASTKGPSVK

Figura 2H. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 20) de Ha1-4.121 VL c.5
Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 MDMRVAQIL GLLLLWLSGA RCDIQMTOSP SLSASVGDV VTITCQASQD ISNYLNWYQQ
61 SPGKAPKFLI SDASNLKTVG PSRFSGSGSG TDFSETISL QPEDIATYCC QYDQLPFTF
121 GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
181 SQESVTEQDS KSTYLSST LTLKADYK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

Figura 2I. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 21) de Ha1-4.121 VL c.26
Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 MRLPAQLLGL LMLWVSGSSG DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNYNYLVW
61 YLQKPGQSPQ LLIYLGSIKRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQPLQTP
121 ITEGQGRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ
181 SGNSQESVTE QDSKSTYSL SSTLTKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

Figura 2J. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 22) de Ha1-1.16 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 QVQLQSGPG LVKPSQTLSL TCAISGDSVS SNSAAWNWR QSPSRGLEWL GRYYRSKMY
61 NGYAVSVKSR MTINPDTSK QFSLQINSVT PEDTAVYYCA RERLGELYGM DVWGQGT'VTV
121 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS T

Figura 2K. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 23) de Ha1-1.16 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 QLTQSPDSLAVSLGERATIN CKSSQNIYR SSKKNHLVWY QOKPGQPPKL LIYWASTRES
61 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS TLQAEDVAVY YCQQYSTPP TFGQGRLEI KRTVAAPSVF
121 IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS G

Figura 2L. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 24) de Ha1-4.5 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 GPGXXXPSQX LSLTGTVSGG SISSGGYWS WIRQHPGKGL EWIGNIYYSG
51 STYYNPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSAV TAADTAVYYC ARDNITMVRG
101 VYGMQVWGO GTTIVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTY

Figura 2M. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 25) de Ha1-4.5 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1   YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC QQAHSLEPRTE
51  GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPRKAKVQW
101 KVDNTLQ

```

Figura 2N. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 26) de Ha1-4.40 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1   QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS RHGVHWVRQA PGKGLEWVAV
51  IWYDGSNKYY ADSVKGRETI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
101 LIAVRPGYYY YGMDVWGQGT TTVVSSASTK GPSVFPLAPS SKST

```

Figura 2O. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 27) de Ha1-4.40 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1   EMQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQIS SYLNWYQKP GKAPKLLIYA
51  ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQPED FATYYCQQ SYSTPLTFTGG
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWQV
151 DNALQSG

```

Figura 2P. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 28) de Ha1-4.37 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1   CPGALQESGP GLVLRPSQTLT LTCTVSGGSI SSGGTYWVW IRQHPGKGLE
51  WIGYIYYSGS TYYNPSLKSQ VTISVDTSKN QFSLKLSSVT AADTAVYYCA
101 RDGITMVRGI SGGMDVWGQGT TTVVSSAST KGPSVKGPSV F

```

Figura 2Q. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 29) de Ha1-4.37 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1   ASVGDRTVIT CRASQSISSH LNWYQKPKG APKLLIYAAS SLQSGVPSRF
51  SSGSGTDEFT LSISSLQPED FATYFCQQSY SIPRTFGQGT KVEITRTVAA
101 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWQVDN ALQSG

```

Figura 2R. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 30) de Ha1-1.43 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1   QLQSGPGLV KPSQTLSTLC AISGDSVSSN SAAWNWIRQS PSRGLEWLGR
51  TYYRSKWYNE YAVSVKSRMT INPDTSKNQF SLQLNSVTPE DTAVYYCARE
101 RLGELYGMDV WGQGTMTVVS SASTKGPSVF PLAPSSKST

```

Figura 2S. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 31) de Ha1-1.43 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1   LQVQPECLYT VSDKNNFLCW YQOKPGQPPK LLMYWASIRE SGVPDRFSGS
51  GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YYCQYYSTP PTFGQGRLE IKRTVAAPSV
101 FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRE

```

Figura 2T. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 32) de Ha1-1.152 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1   QVQLQQSGPG LVKPSQTLTL TCAISGDSVS SNSAAWNWIR QSPWRGLEWL
51  GRYYRISKWY NEYAVSVKSR MTINPDTSKN QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA
101 RERLGELYGM DVWGQGTITV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS T

```

Figura 2U. La secuencia de aminoácidos (SEC ID N°: 33) de Ha1-1.152 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1   MQLTQSPDSL AVSLGERATI NCKSSQNVLY RSNKKNFLVW YQOKPGQPPK
51  LLIYWASIRE SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQTEDVAV YYCQYYSTP
101 PTFGQGRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SG

```

Figura 3:

Figura 3A. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 34) y aminoácidos (SEC ID N°: 35) de Ha1-4.117 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1 V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P G L
1  gtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtgggcccaggactg
21 V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S S
61  gtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgggtggctccatcagcagt
41 G G Y Y W I W I R Q H P G K G L E W I G
121 ggtggttactactggatctggatccgccagcaccaggggaagggcctggagtggattggg
61 Y I Y Y N G N T Y Y N P S L K S R V T M
181 tacatctattacaatgggaacacctactacaaccctccctcaagagtgcagttaccatg
81 S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D
241 tcagtagacacgtctagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgggac
101 T A V Y Y C A R D G I T M I R G Y Y Y G
301 acggccgtgtattactgtgcgagagatggtattactatgatagcggctactactacggt
121 M D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P
361 atggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctccctcagcctccaccaagggcca
141 S V K G P S V F
421 tcggtcaagggcccatcggtcttca

```

Figura 3B. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 36) y aminoácidos (SEC ID N°: 37) de Ha1-4.117 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1 Q L T Q S P S S V S A S V G D R V T I T
1  cagetgacncagctccatcttccgtgtctgcatctgtaggagacagagtcaccatcaet
21 C R A S R G I S S W L A W Y Q Q K P G K
61  tgtcgggagagtcgggtattagcagctgggttagcctggatcagcagaaaccagggaaa
41 A P K L L I Y T A S S L Q S G V P S R F
121 gcccctaagctcctgatctatactgcatccagtttgcaaagtggagtcaccatcaaggttc
61 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D
181 agcggcagtggtctctgggacagattcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat
81 F A T Y Y C Q Q A Y S F P R T F G Q G T
241 tttgcaacttactattgtcaacaggtttacagtttccctcggacgttcggccaagggacc
101 K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D
301 aaggtggaatcaaacgaactgtggtgcaccatctgtcttccatcttcccggcatctgat
121 E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R
361 gacagttgaaatctggaactgcctctgtgtgctgctgaataacttctatcccaga
141 E A K V Q W K V D N A L Q S G
421 gaggccaaggtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta

```

Figura 3C. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 38) y aminoácidos (SEC ID N°: 39) de Ha1-4.120 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1 Q C V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P
1  cagtgtgtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtgggcca
21 G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I
61  ggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgggtggctccatc
41 S S G G Y Y W S W I R Q H P G K G L E W
121 agcagtggtggttactactggagctggatccgccagcaccaggggaagggcctggagtgg
61 I G Y I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V
181 attgggtacatatattacagtgaggacacctactacaaccctccctcaagagtgcagtt
81 T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
241 accatatacagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactgcc
101 A D T A V Y Y C A R D R I T M V R G G I
301 gggacacggcctgtattactgtgcgagagatcgaattactatggttcggggaggtatt
121 P S G M D V W G Q G T T V T V S
361 cccagtggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcct

```

Figura 3D. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 40) y aminoácidos (SEC ID N°: 41) de Ha1-4.120 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1 S P F T C R A S Q S I T N Y L N W Y Q Q
1 tcaccattcacttgccgggcaagtcagagcattaccaactatTTAAATTGGTATCAGCAG
21 K P G E A P K L L I H V A S S L Q S G V
61 aaaccaggggaagcccctaagctcctgatccatgTTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGGTC
41 P S R F S G S G S G R D F T L T I S S L
121 ccatcaaggttcagtgccagtggtatctgggagagatttcaactctcaccatcagcagtg
61 Q P E D F A T Y Y C Q Q S H S I P R T F
181 caacctgaagatTTTgcaacttactactgtcaacagagtcacagtatccctcggagcttc
81 G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F
241 ggccaagggaccaaggtggaatcaaacgaaactgTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTC
101 P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
301 ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataac
121 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
361 ttctatcccagagaggccaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggt

```

Figura 3E. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 42) y aminoácidos (SEC ID N°: 43) de Ha1-5.99 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1 Q V H L Q Q W G A G L L K P S E T L S L
1 caggtgcatctacagcagtgggggcagagactgTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTC
21 T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q P
61 acctgocgtgtctatggTGGGTCTTCAAGTGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCC
41 P G K G L E W I G E I N H S G S T S Y K
121 cgggggaagggactggagtggttggggaatcaatcatagtggaagcaccagctacaag
61 P S L K S R V T V S V D T S K N Q F S L
181 cgtccctcaagagtcagtcaccgtatcagtggaacagtcacaagaaccagttctccctg
81 K L S Y V T A A D T A V Y Y C A R D R G
241 aagctgagctatgtgaccgcgcggacacggctgtgtattactgtgagagataggggt
101 D Y G D F L F D Y W G Q G T L V T V S S
301 gactacggtgacttcccttttgactactggggccagggaaacctggtcacctctctca
121 A S T K G P S V F P L A P S S K S T
361 gcctccaccaagggcccctcgggtcttccccctggcaccctcctccaagagcaccta

```

Figura 3F. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 44) y aminoácidos (SEC ID N°: 45) de Ha1-5.99 VL
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1 S P G E R A T L S C R A S Q S I G S T Y
1 ttccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtattggcagcacctac
21 L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
61 ttagcctggtaccagcagaaacctggccaggtcccaggctcctcatctatggtgcatcc
41 S R A T G I P E R F S G S G S G T D F T
121 agcagggccactggcatcccagaaaggttcagtgccagtggtctgggacagaacttcaact
61 L T I S G L E P E D F A V F Y C Q Q C G
181 ctaccatcagcggactggagcctgaagatTTTgagtgTTTTactgtcaacagtgTGGT
81 S S P P T F G Q G T K V E I K R T V A A
241 agctcacctccgacgTTGGCCAAGGGACCAAGGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCA
101 P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
301 ccatctgtcttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
121 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N
361 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaagtacagtggaaggtggataac
141 A
421 gcctc

```

Figura 3G. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 46) y aminoácidos (SEC ID N°: 47) de Ha1-4.121 VH
Está subrayada la región constante de cadena pesada

```

1 G L Q C V A A P R W V L S Q V Q L Q Q W
1 ggtctgcagtggtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctacagcagtg
21 G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G
61 ggcgcaggactggtgaagccttcggagaccctgtccctcaactgcgctgtctatgggtgg
41 S F S G N Y W S W I R Q P P G K G L E W
121 tccttcagtggttaactactggagctggatccgccagccccaggggaaggggctggagtgg
61 I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V
181 attggggaaatcaatcatagtgggaagcacaactacaaccogtccctcaagagtcgatgc
81 T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
241 accatatcagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgcc
101 A D T A V Y Y C A R G G S Y N Y F D Y W
301 gggacacggctgtgtattactgtcgcagaggggggagctacaactactttgactactgg
121 G Q G T L V T V S S A S T K G P S V K
361 ggccagggaaacctggtcacogtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcaag
    
```

Figura 3H. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 48) y aminoácidos (SEC ID N°: 49) de Ha1-4.121 VL c.5
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1 M D M R V P A Q L L G
1 aaaaaagtcaagcccaaccaggacacagcATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGG
12 L L L L W L S G A R C D I Q M T Q S P S
61 GGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAT
32 S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q D I
121 CCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACA
52 S N Y L N W Y Q Q S P G K A P K F L I S
181 TTAGCAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAGTCCCGGGAAAGCCCCTAAGTTCCTGATCT
72 D A S N L K T G V P S R F S G S G T
241 CCGATGCATCCAATTTAAAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTTCAAGTGGAGTGGATCTGGGA
92 D F S F T I S S L Q P E D I A T Y C C Q
301 CAGATTTTTCTTTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATATTGCGACCTATTGCTGTC
112 Q Y D S L P F T F G P G T K V D I K R T
361 AACAGTATGATAGTCTCCCATCACTTTCCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAA
132 V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T
421 CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTTCTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAATCTGGAA
152 A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K
481 CTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
172 V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K
541 AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
192 D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H
601 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
212 K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F
661 ACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
232 N R G E C *
721 TCAACAGGGGAGAGTGTAGaggggagaagtgccccacctgtcctcagttccagcctga
781 cccccctccatcctttggcctctgacccttttccacaggggacctaccctatgcggt
841 cctccagctcatcttcacctcaccctcctcctcctccttggctttaattatgctaagt
901 tggaggagaatgaataaataaagtgaatctttg
    
```

Figura 3I. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 50) y aminoácidos (SEC ID N°: 51) de Ha1-4.121 VL c.26
Está subrayada la región constante de cadena ligera

```

1 M R L P A Q L L G
1 aaagatcaggactcctcagttcacottctcacaATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGG
10 L L M L W V S G S S G D I V M T Q S P L
61 CTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTC
30 S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L
    
```

Figura 3I-2

121 TCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTC
 50 L H S N G Y N Y L V W Y L Q K P G Q S P
 181 CTACATAGTAATGGATACAACTATTTGGTTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGACAGTCTCCA
 70 Q L L I Y L G S I R A S G V P D R F S G
 241 CAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTATTCGGGGCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGC
 90 S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G
 301 AGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
 110 V Y Y C M Q P L Q T P I T F G Q G T R L
 361 GTTTATTACTGCATGCAACCTCTACAACTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTG
 130 E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q
 421 GAGATTAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
 150 L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A
 481 TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATPCCAGAGGCC
 170 K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
 541 AAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACA
 190 E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A
 601 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAGCA
 210 D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
 661 GACTACGAGAACAACAAGTCTACGCCTCGCAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
 230 V T K S F N R G E C *
 721 GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGaggggagaagtgccccacctgctcctc
 781 agttccagcctgacccccctcccatcctttggcctctgaccccttttccacaggggacctc
 841 cccctattgaggctcctccagctcctcttccacctcaccocctcctcctccttggcttta
 901 attatgctaattgttgaggagaatgaataaataaagtgaatctttgcaaaaaaaaaaaaa
 961 aaaaaaa

Figura 3J. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 52) y aminoácidos (SEC ID N°: 53) de Ha1-1.16 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L
 1 caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgagaccctctcactc
 21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
 61 acctgtgccatctccggggacagtgctcttagcaacagtgctgcttggaaactggatcagg
 41 Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
 121 cagtcoccatcgagggccttggtggctgggaaggacatactacaggtccaagtggtat
 61 N G Y A V S V K S R M T I N P D T S K N
 181 aatggttatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaac
 81 Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A
 241 cagttctccctgcagctgaactctgtgactcccgaggacacggctgtgtattactgtgca
 101 R E R L G E L Y G M D V W G Q G T T V T
 301 agagagaggttagggagttatcgggtatggagctctggggccaagggaccacggctcacc
 121 V S S A S T K G P S V F P L A P S K S
 361 gtctcctcagcctccaaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc
 141 T
 421 accta

Figura 3K. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 54) y aminoácidos (SEC ID N°: 55) de Ha1-1.16 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 Q L T Q S P D S L A V S L G E R A T I N
 1 cagctgacgcagctctccagactccctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaac
 21 C K S S Q N I L Y R S S K K N H L V W Y
 61 tgcaagtccagccagaatattttatacaggtccagcaagaagaaccacttagtttggtac
 41 Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S
 121 cagcagaaccagggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctaccggggaatcc
 61 G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S
 181 ggggtccctgcccattcagtgccagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagc
 81 T L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P P
 241 accctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagttactcctccc
 101 T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F

Figura 3K-2

301 accttcggccaagggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttc
 121 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L
 361 atcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgacctgctg
 141 N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S
 421 aataacttctatcccagagagggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcg
 161 G
 481 ggta

Figura 3L. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 56) y aminoácidos (SEC ID N°: 57) de Ha1-4.5 VH
 Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 A Q D X X S L H R P V P H R H C L W W P
 1 Ggcccaggaacngngaagccttcacagacctgtccctcaccggcactgtctctggtggcc
 21 I S S G G Y Y W S W I R Q R P G K G L E
 61 catcagcagtggtggttattactggagctggatccgccagcaccaggggaagggcctgga
 41 W I G N I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R
 121 gtggattgggaacatctattacagtgggagcacctactacaaccctccctcaagagctcg
 61 V T I S V D T S K N Q F S L K L S A V T
 181 agttaccatatacagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagcgtgtgac
 81 A A D T A V Y Y C A R D N I T M V R G V
 241 tgcogdgacacggcogtattactgtgagagataatattactatggttcggggagt
 101 Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T
 301 ctactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagcctccac
 121 K G P S V F P L A P S S K S T Y
 361 caagggcccatcggctctccccctggcaccctcctccaagagcacctat

Figura 3M. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 58) y aminoácidos (SEC ID N°: 59) de Ha1-4.5 VL
 Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G
 1 tatgcagcatccagtttgcaaagtggtggtcccatcaaggttcagcggcagtggtatctgga
 21 T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C
 61 acagacttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttactattgt
 41 Q Q A H S L P R T F G Q G T K V E I K R
 121 caacaggtcacagctctccctcggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacga
 61 T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
 181 actgtggctgcaccatctgtcttccatcttccccgccatctgatgagcagttgaaatctgga
 81 T A S V V C L L N N F Y P R K A K V Q W
 241 actgcctctgttggtgctgctgaataacttctatcccagaaagggccaaagtacagtg
 101 K V D N T L Q
 301 aaggtggataacaccctccaa

Figura 3N. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 60) y aminoácidos (SEC ID N°: 61) de Ha1-4.40 VH
 Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
 1 Caggtgcagctggtgagctctgggggagggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc
 21 S C A A S G F T F S R H G V H W V R Q A
 61 tcctgtgcagcgtccggatccacttcagtcgccatggcgtgactgggtccgccaggct
 41 P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y
 121 ccaggcaaggggctggagtggtggcagttatattggtatgatggaagtaataaatactat
 61 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 181 gcagactccgtgaagggccgattaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
 81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G G
 241 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgagagaggagcc
 101 L I A V R P G Y Y Y Y G M D V W G Q G T
 301 cttatagcagttcgtccgggtactactactacggtatggacgtctggggccaagggacc
 121 T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S
 361 acggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggctctccccctggcaccctcc

Figura 3N-2

141 S K S T
421 tccaagagcacct

Figura 3O. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 62) y aminoácidos (SEC ID N°: 63) de Ha1-4.40 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera.

1 E M Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 Gaaatgcagctgacccagctcctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
21 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
61 atcacttgcgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaacca
41 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
121 gggaaagccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 aggttcagtggcagtggtctgggacagatttcaactctcaccatcagcagctctgcaact
81 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P L T F G G G
241 gaagattttgcaacttactctgcaacagagttacagtagcaccgctcactttcgggga
101 G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
301 gggaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccggcca
121 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
361 tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgctgctgaataacttctat
141 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
421 cccagagagcccaaagtcagtggaaggtggataacgcctccaatcgggt

Figura 3P. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 64) y aminoácidos (SEC ID N°: 65) de Ha1-4.37 VH. Está subrayada la región constante de cadena pesada.

1 C P G A L Q E S G P G L V R P S Q T L S
1 tgtccaggtgcaactgcaggagtcgggcccaggactgggtgaggecttcacagaccctgtcc
21 L T C T V S G G S I S S G G T Y Y W I W
61 ctcacctgcaactgtctctggtggctccatcagcagtggtggtacttactactggatctgg
41 I R Q H P K G L E W I G Y I Y Y S G S
121 atccgccagcaccaggggacgctggagtggtggtacatctattacagtgggagc
61 T Y Y N P S L K S R V T I S V D T S K N
181 acctactacaaccogtccctcaagagtcgagttaccatatacagtagacacgtctaagaac
81 Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A
241 cagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgggacacggcctgtattactgtgag
101 R D G I T M V R G I S G G M D V W G Q G
301 agagatggaattactatggttcggggaattagcgggggcatggacgtctggggccaaggg
121 T T V T V S S A S T K G P S V K G S V
361 accacggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcgggtcaagggcccatcggtc
141 F
421 ttca

Figura 3Q. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 66) y aminoácidos (SEC ID N°: 67) de Ha1-4.37 VL. Está subrayada la región constante de cadena ligera.

1 A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S H
1 Gcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgcgggcaagtcagagcattagtagtcat
21 L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S
61 ttaaattggtatcagcagaaccagggaaagccctaagctcctgatctatgctgctcc
41 S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
121 agtttgcaaagtgggtcccatcaaggttcagtggcagtggtctgggacagatttcaact
61 L S I S S L Q P E D F A T Y F C Q Q S Y
181 ctctccatcagcagctgcaactgaagattttgcaacttacttctgtcaacagagttac
81 S I P R T F G Q G T K V E I T R T V A A
241 agtatccctcggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcacacgaactgtggctgca
101 P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
301 ccatctgtcttcatcttccggccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
121 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N

Figura 3Q-2

361 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac
 141 A L Q S G
 421 gccctccaatcgggta

Figura 3R. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 68) y aminoácidos (SEC ID N°: 69) de Ha1-1.43 VH
 Está subrayada la región constante de cadena pesada

1 Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C
 1 Cagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactcacctgt
 21 A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S
 61 gccatctccggggacagtgctcttagcaacagtgctgcttggaaactggatcaggcagtc
 41 P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N E
 121 ccategagaggccttgagtggtgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgaa
 61 Y A V S V K S R M T I N P D T S K N Q F
 181 tatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaaccagttc
 81 S L L N S V T P E D T A V Y Y C A R E
 241 tccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtattactgtgcaagagag
 101 R L G E L Y G M D V W G Q G T M V T V S
 301 aggttaggggagttatacgggtatggacgtctggggccaagggaccatgggtcacctctcc
 121 S A S T K G P S V F P L A P S S K S T
 361 tcagcctccaccaagggcccatcgggtcttcccctggcaccctctccaagagcacc

Figura 3S. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 70) y aminoácidos (SEC ID N°: 71) de Ha1-1.43 VL
 Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 L Q V Q P E C L Y T V S D K N N F L C W
 1 Ctgcagctccagccagagtgctctttatacagtgctccgacaagaacaacttcttatggtgg
 21 Y Q Q K P G Q P P K L L M Y W A S I R E
 61 taccagcagaaaccaggacagcctcctaaactgctcatgtactgggcatctatccgggaa
 41 S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I
 121 tccggggctccctgaccgattcagtgggcagcgggtctgggacagatttccactctcaccatc
 61 S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P
 181 agcagcctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtactcct
 81 P T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V
 241 cccaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
 101 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
 301 ttoatcttcccgcctctgatgagcagttgaaatctggaactgocctctgttgtgtgctg
 121 L N N F Y P R E
 361 ctgaataacttctatcccagagag

Figura 3T. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 72) y aminoácidos (SEC ID N°: 73) de Ha1-1.152 VH
 Está subrayada la región constante de cadena pesada.

1 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L
 1 caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgcagaccctctcactc
 21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
 61 acctgtgccatctccggggacagtgctcttagcaacagtgctgcttggaaactggatcagg
 41 Q S P W R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
 121 cagtccccatggagaggccttgagtggtgggaaggacatactacaggtccaagtggtat
 61 N E Y A V S V K S R M T I N P D T S K N
 181 aatgaatatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaac
 81 Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A
 241 cagttctccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtattactgtgca
 101 R E R L G E L Y G M D V W G Q G T T V T
 301 agagagaggttaggggagttatacgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcacc
 121 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S

Figura 3T-2

361 gtctcctcagcctccaccaagggcccacgggtcttccccctggcaccctcctccaagagc
 141 T
 421 accta

Figura 3U. La secuencia de ADNc (SEC ID N°: 74) y aminoácidos (SEC ID N°: 75) de Ha1-1.152 VL
 Está subrayada la región constante de cadena ligera

1 M Q L T Q S P D S L A V S L G E R A T I
 1 atgcagctgacncagctctccagactccctggctgtgtctctgggagagagggccaccatc
 21 N C K S S Q N V L Y R S N K K N F L V W
 61 aactgcaagtcagccagaatgttttatacaggtccaacaagaagaacttcttagtttgg
 41 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S I R E
 121 taccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctatccgggaa
 61 S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I
 181 tccggggtccctgaccgattcagtgccagcgggtctgggacagatttcactctcaccato
 81 S S L Q T E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P
 241 agcagcctgcagactgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtactcct
 101 P T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V
 301 cccaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgaaactgtggctgcaccatctgtc
 121 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
 361 ttcatcttcccgcacatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctg
 141 L N N F Y P R E A K V Q N K V D N A L Q
 421 ctgaataacttctatcccagagaggccaagtacagtggaaggtggataaacgcctccaa
 161 S G
 481 tcgggta

Figura 4C Alineamiento de Ha1-4.120 VH con VH4-31 humana

```

<-----FWR1-----> <-CDR1> <-----FWR2-----> <-----CDR2-----> <-----
Ha1-4.120 VH 12 QVQLQESGPELVKPSQTLSTLCTVSGGSIS SGCYYWS WIRQHFGKGLEWI-G YIY---YSG-S-T-Y--YNPSLKS RVTI 82
(VH4-31/D3-10/JH6)
VH4-31 1 ..... 71
-----FWR3-----> <-----CDR3-----> <región constante>
Ha1-4.120 VH 83 SVDTSKNQFSLKLSVTAADTAIVYICAR DRITMVRGGIPSGMDV WQQGTTVTVSS ASIXGFSVKGPSVF
(VH4-31/D3-10/JH6)
VH4-31 72 .....

```

Figura 4D Alineamiento de Ha1-4.120 VL con O2 humana

```

<-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2> <-----FWR3----->
Ha1-4.120 VL 4 -----TC RASQSIIN-YLN WYQKPGKAPKLLIH VASSLQS GVPFRFSGSGSGRDFLTITSSLQ 61
(O2/JK1)
O2 1 DIQMTQSPSSLSASVGRVTI... ..K.....Y A.....T.....
-----> <-CDR3> <región constante>
Ha1-4.120 VL 62 PEDEATYYC QQSHSIP RTFGQGTKVELK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(O2/JK1)
O2 80 .....Y.T. -----

```

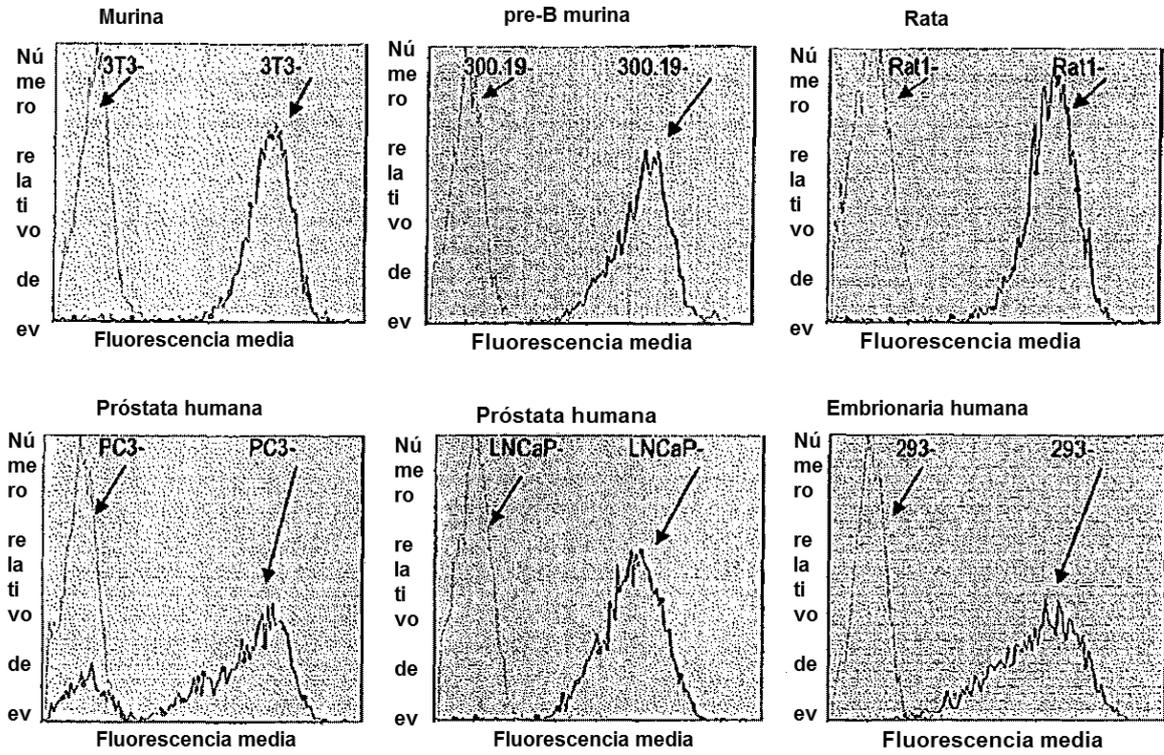



Figura 5
Expresión de PSCA en líneas celulares recombinantes murinas, de rata y humanas

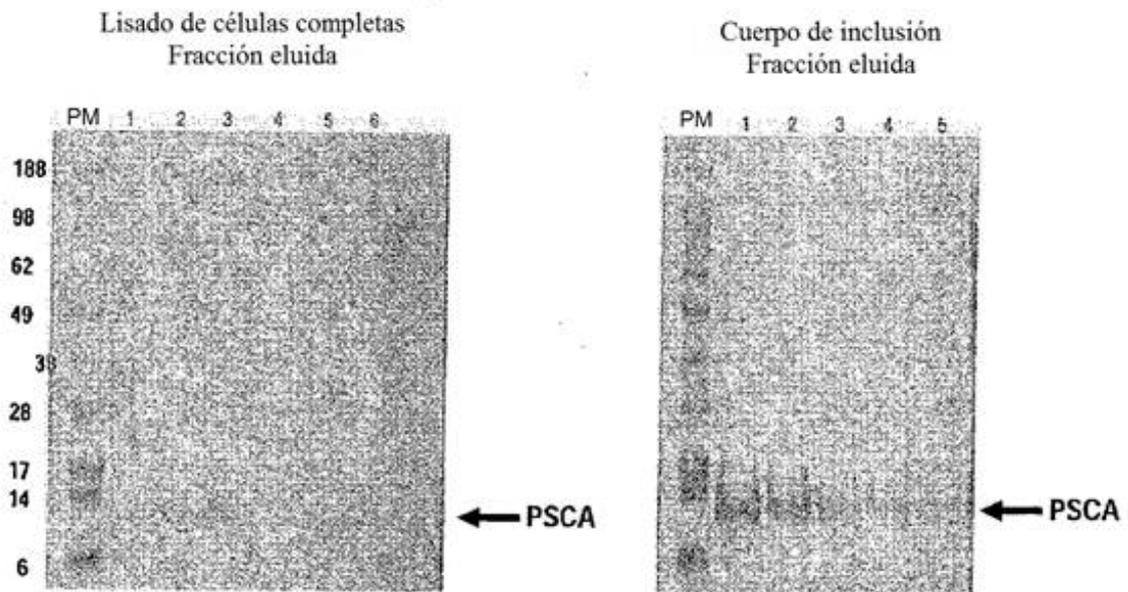


Figura 6
Purificación de PSCA de *E. coli*
(vector pET-21b que codifica los aminoácidos 21-94)

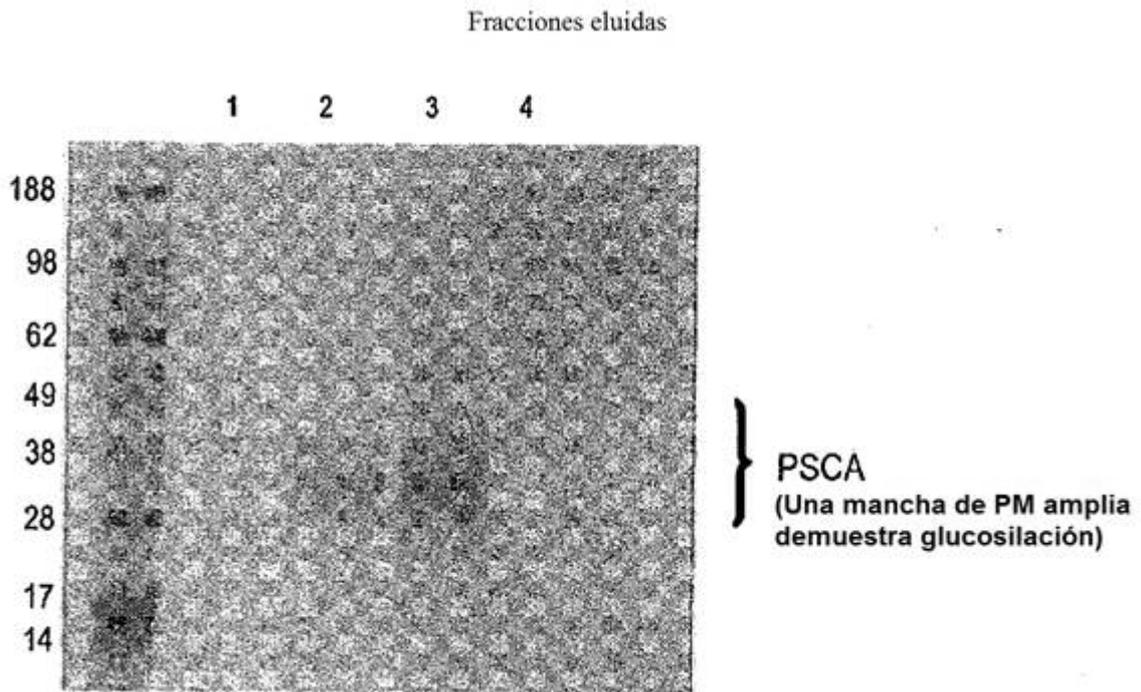


Figura 7
Purificación de PSCA glucosilado recombinante expresado
a partir de células 293T

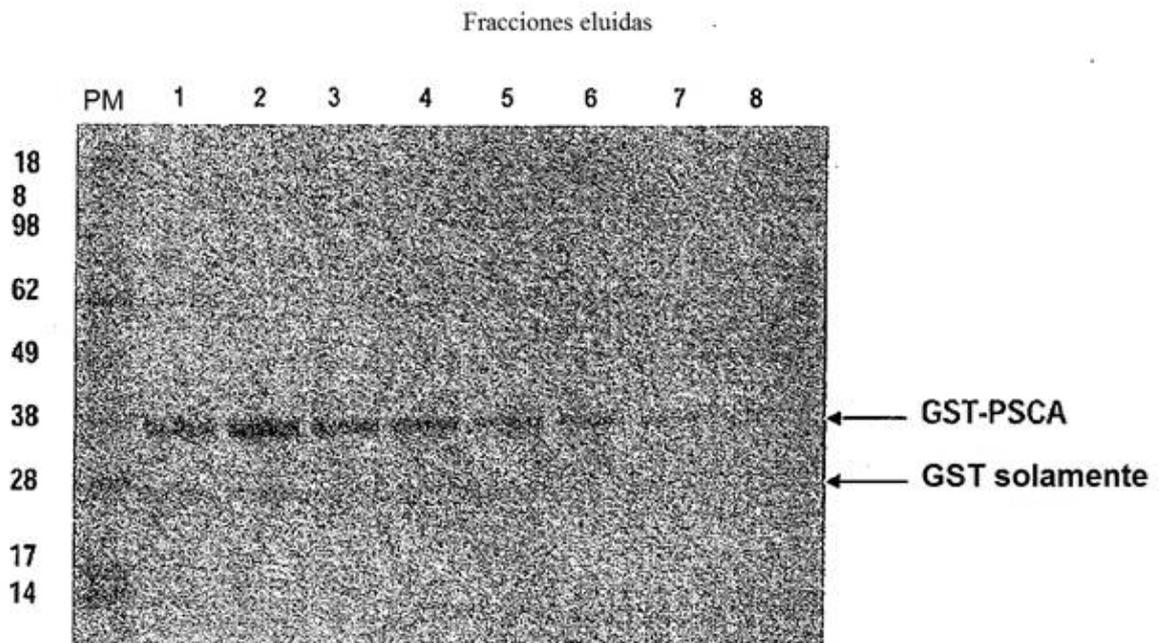


Figura 8
Purificación de GST-PSCA de *E. coli*
(aminoácidos 18-98)

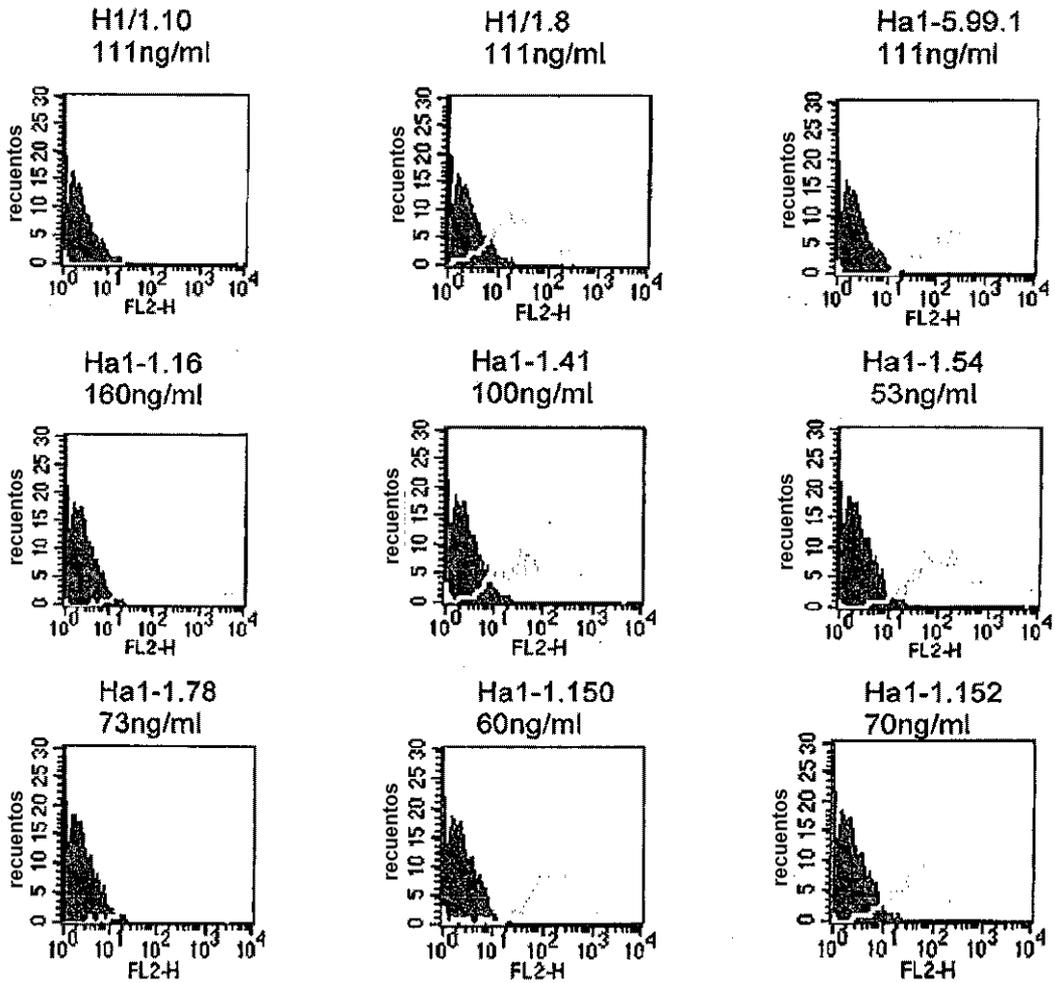


Figura 9A
Análisis de FACS de anticuerpos de PSCA
(LAPC9AI)

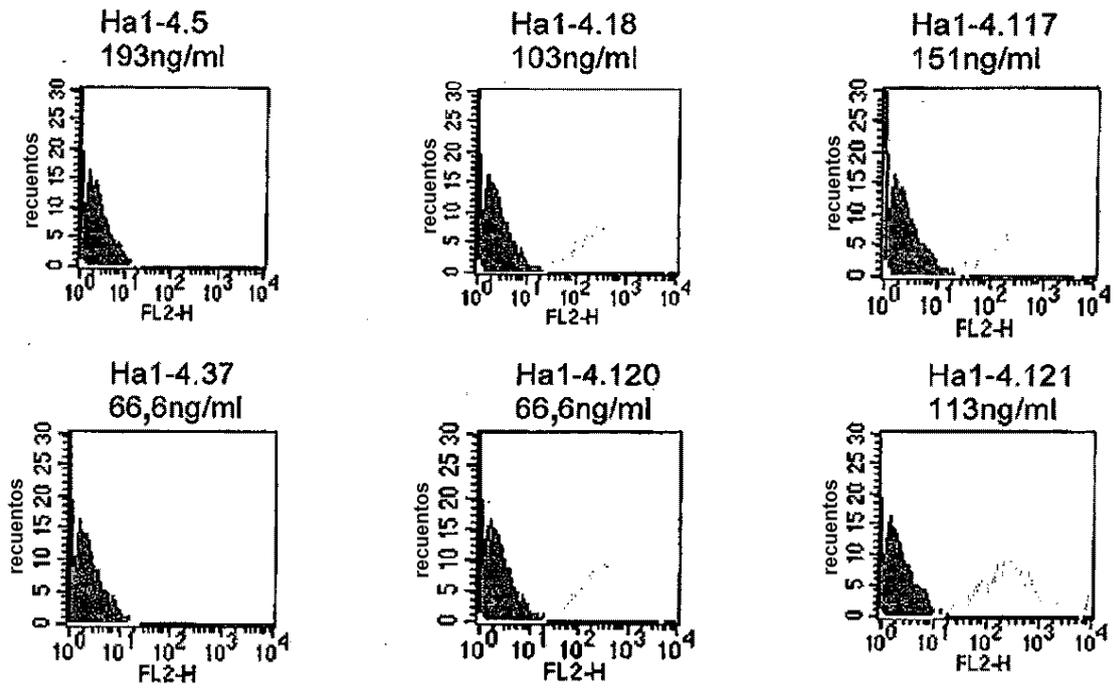


Figura 9B
Análisis de FACS de anticuerpos de PSCA
(LAPC9AI)

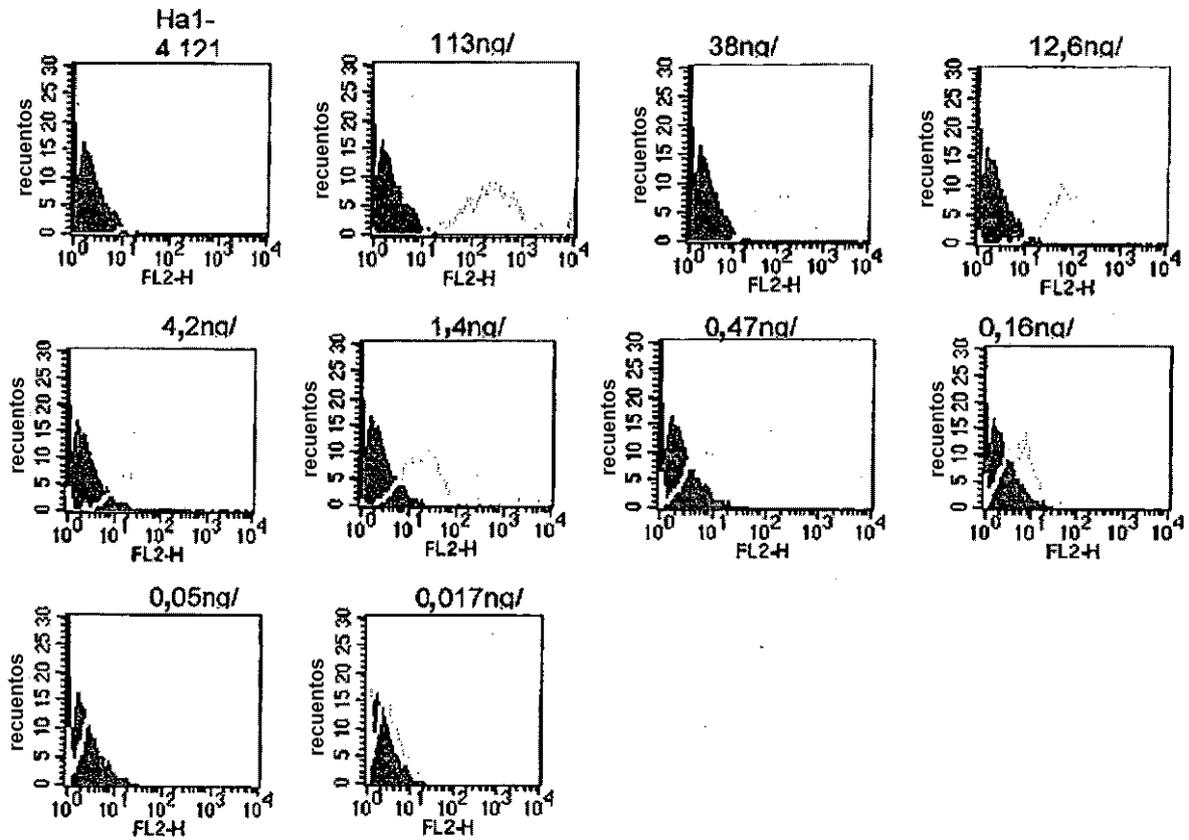


Figura 10
Análisis de afinidad de mAb de PSCA 4.121 por FACS

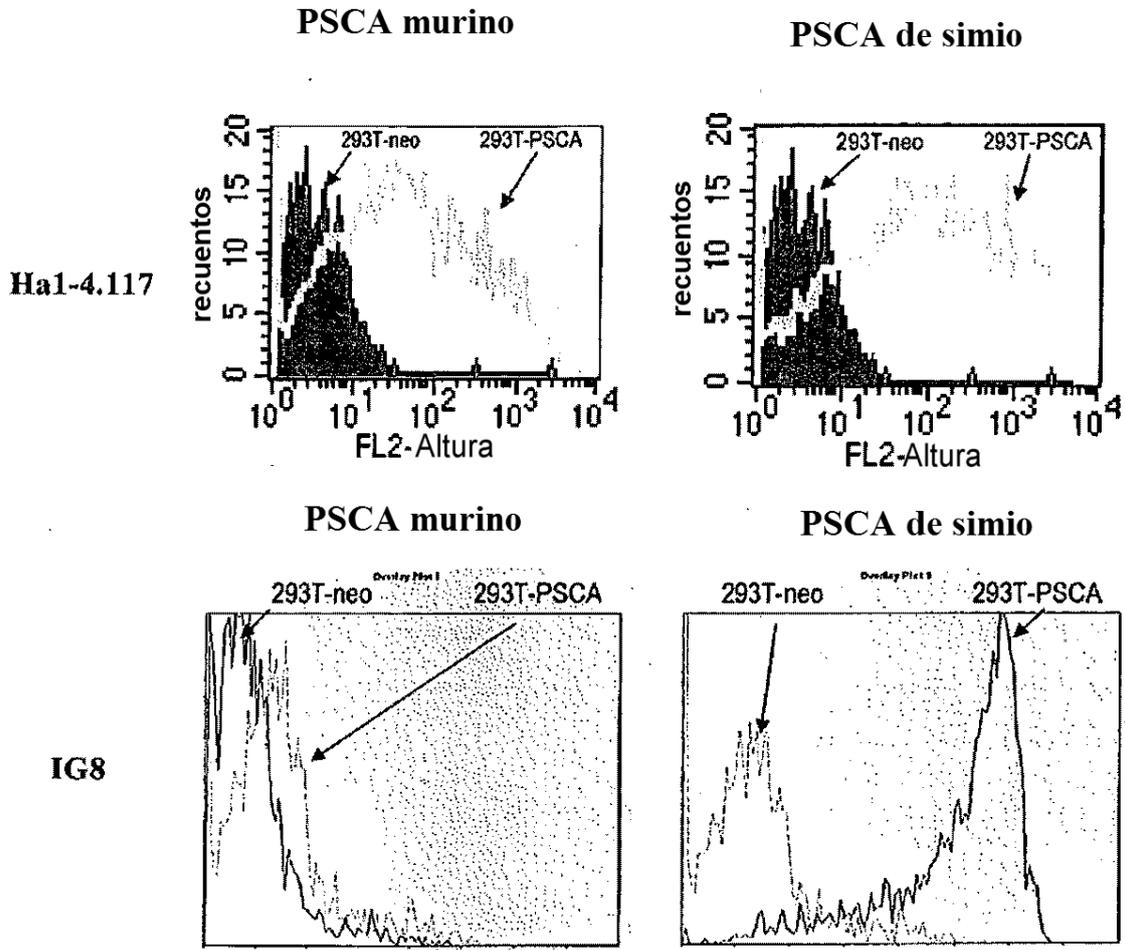


Figura 11
Expresión de PSCA murino y de simio en células 293T:
reconocimiento por MAb anti-PSCA humano

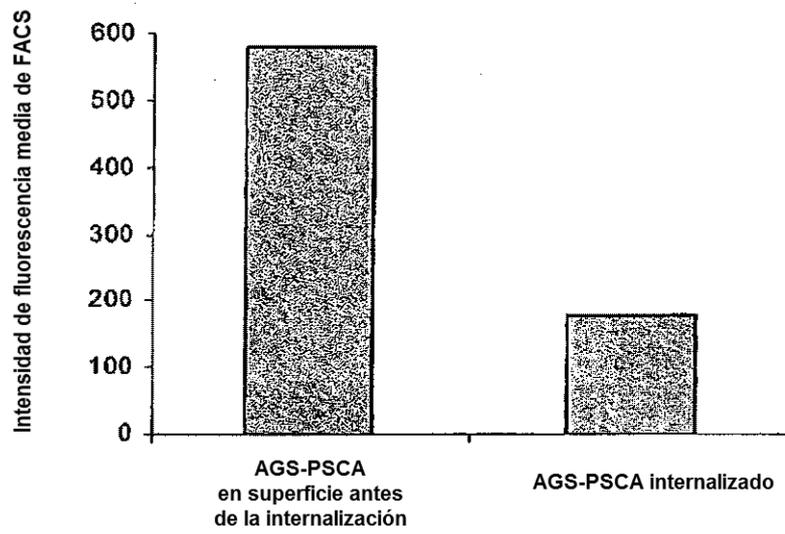


Figura 12
Internalización de PSCA 4.121 en células PC3-PSCA
después de incubación de dos horas a 37 °C

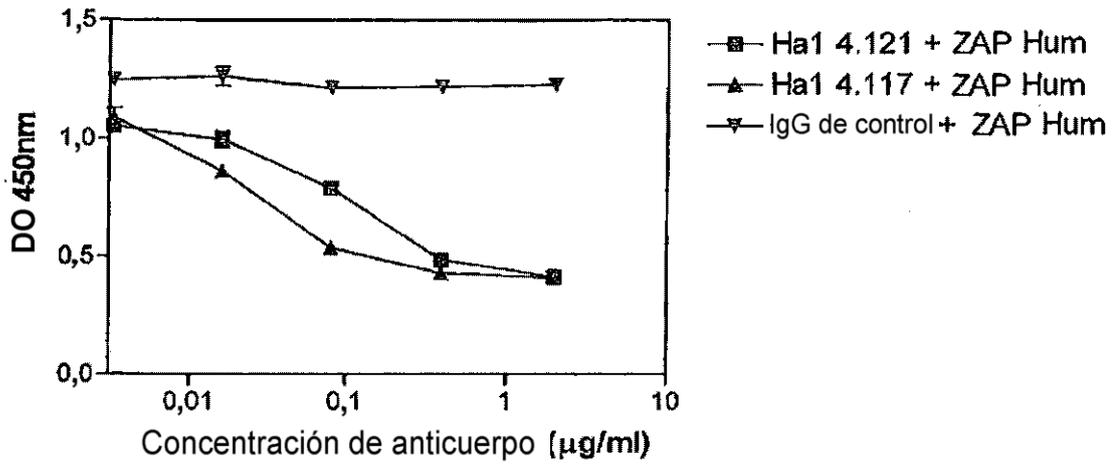


Figura 13A
Los anticuerpos para PSCA median en la destrucción dependiente de saporina en células que expresan PSCA

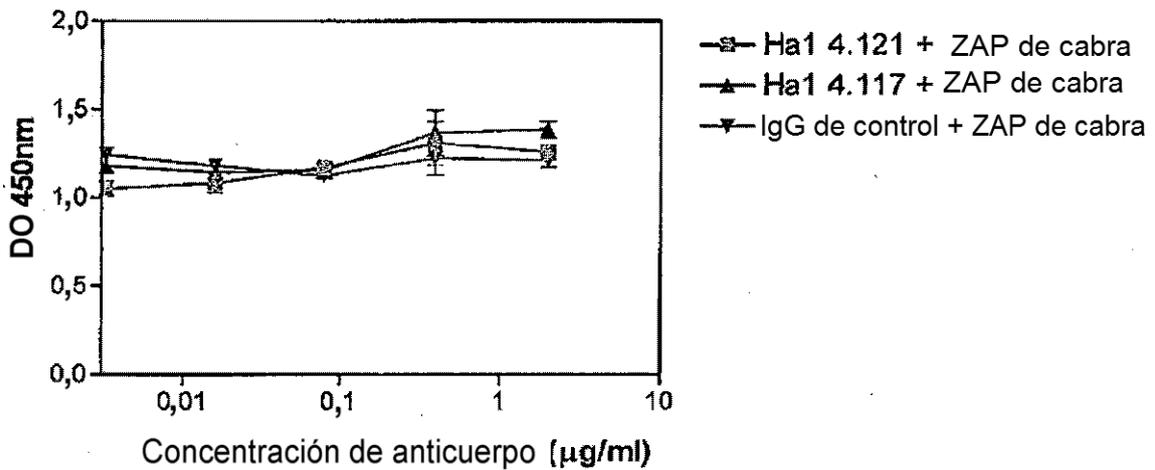


Figura 13B
Los anticuerpos para PSCA median en la destrucción dependiente de saporina en células que expresan PSCA

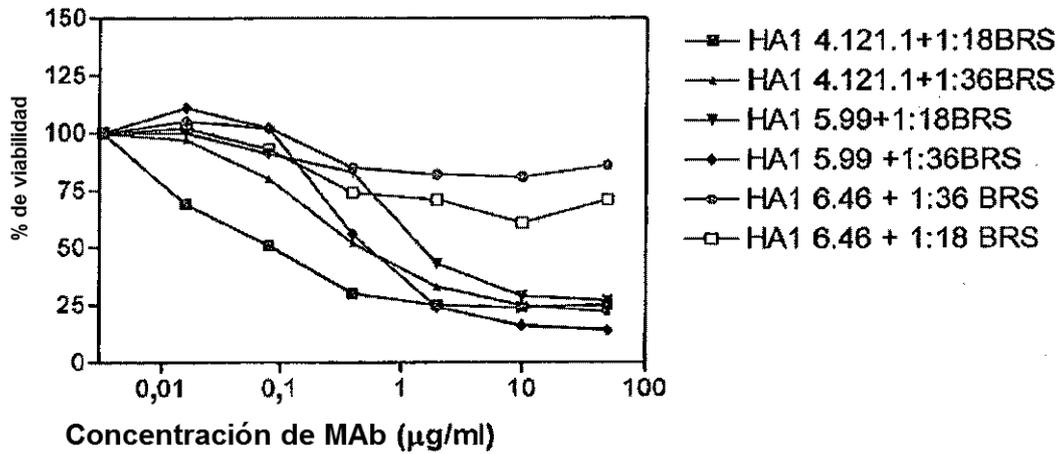


Figura 14
Citotoxicidad mediada por complemento de cría de conejo en
B300.19/PSCA (100.000 células/pocillo)

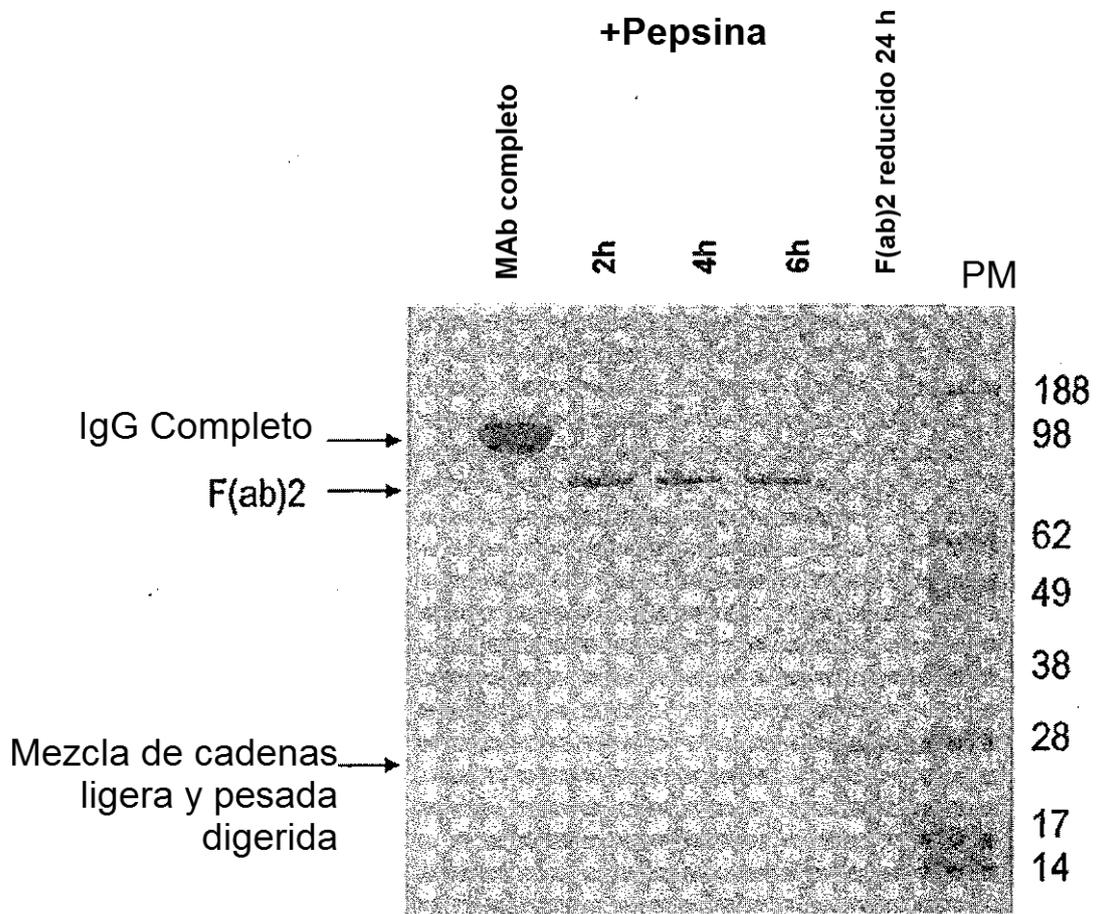


Figura 15
Generación de fragmentos $F(ab')_2$ de mAb Ha1-4.121 por digestión con pepsina

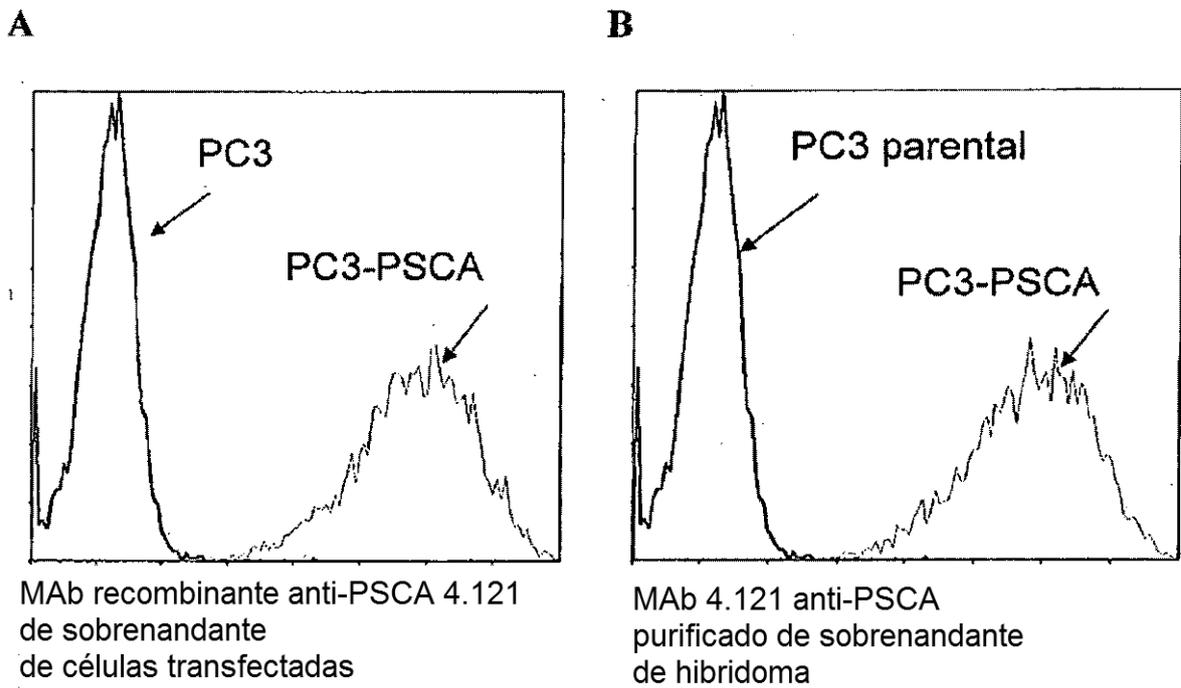


Figura 16
Unión de MAb humano recombinante anti-PSCA con PSCA por citometría flujo

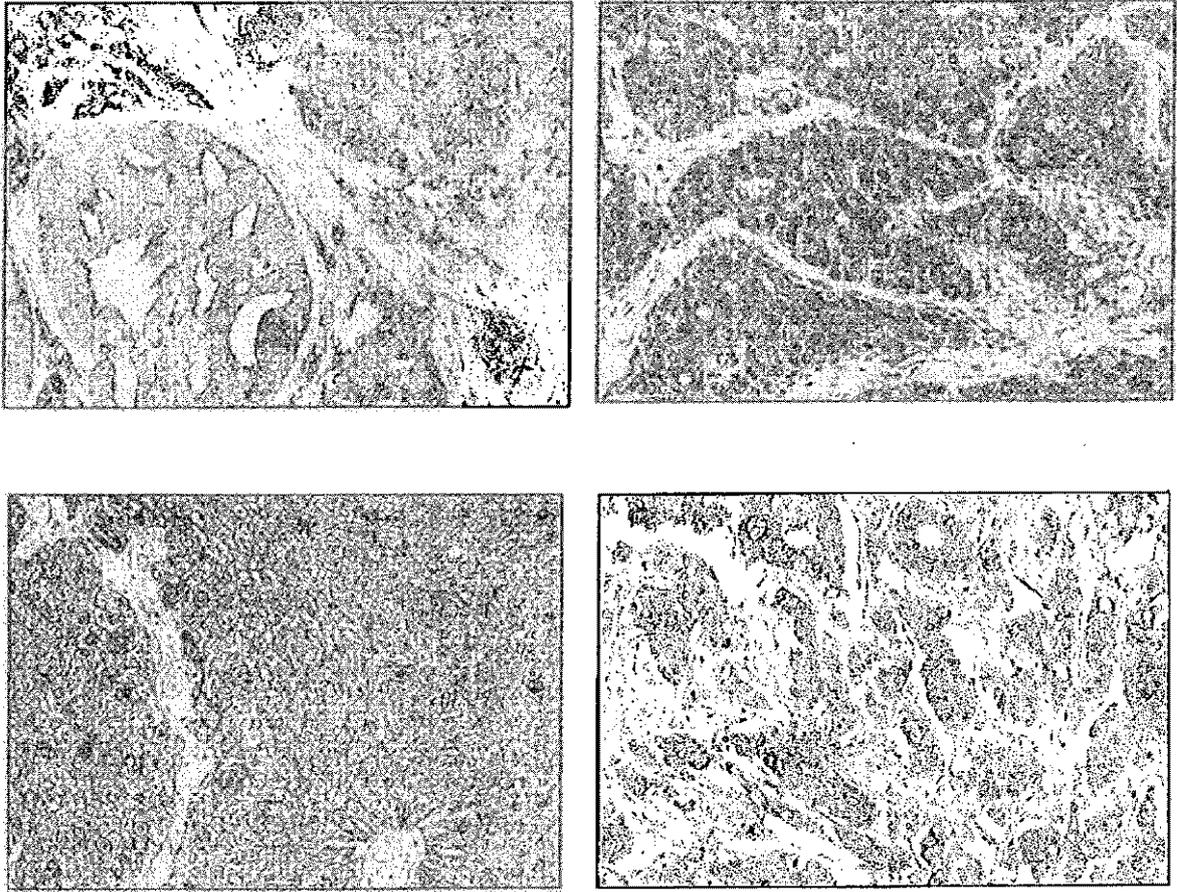


Figura 17
Detección de proteína PSCA por inmunohistoquímica en diversas muestras de ensayo de pacientes de cáncer

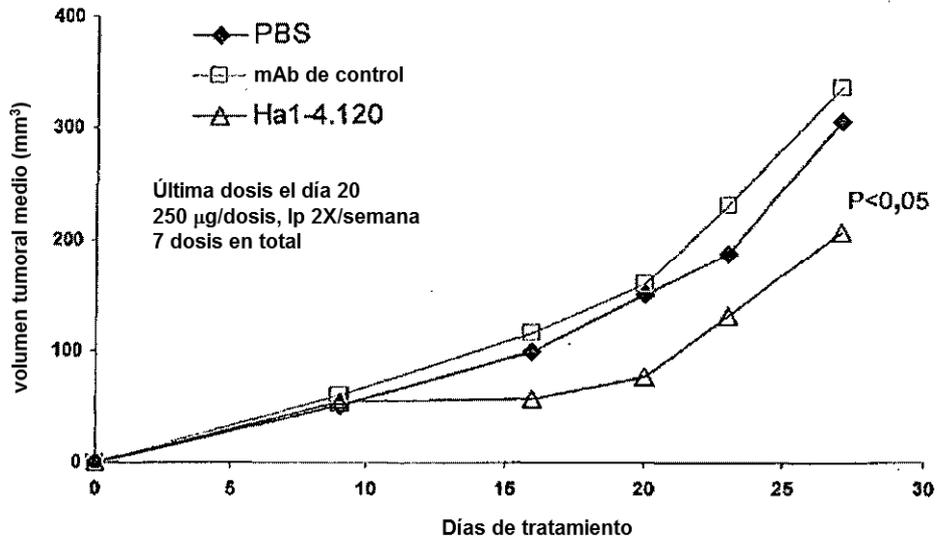


Figura 18
El mAb de PSCA Ha1-4.120 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de
cáncer de próstata subcutáneos

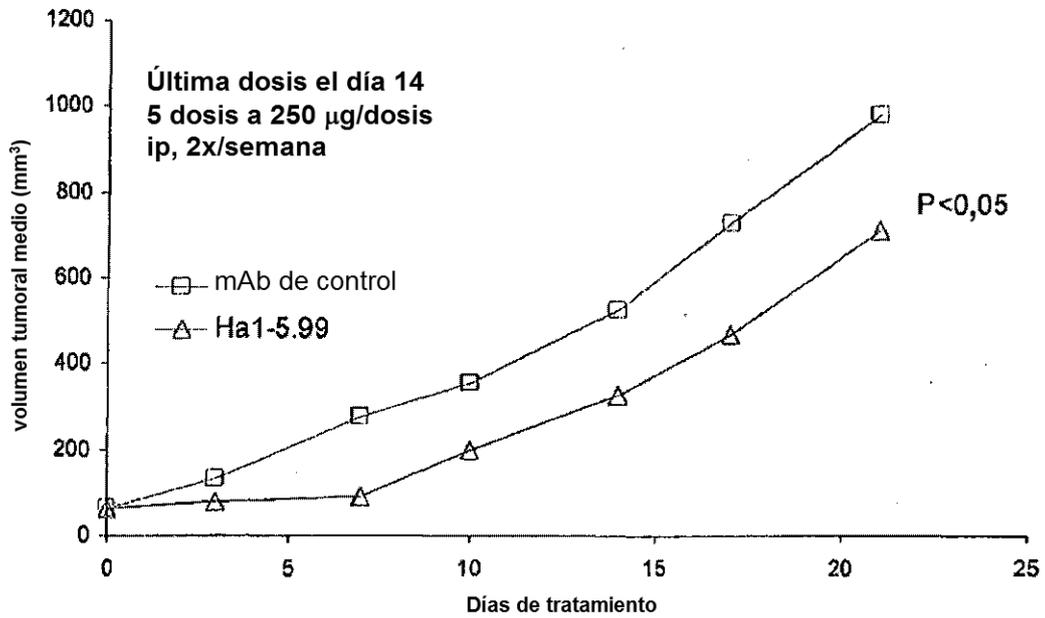


Figura 19
El mAb de PSCA Ha1-5.99 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de
cáncer de próstata establecidos en ratones SCID

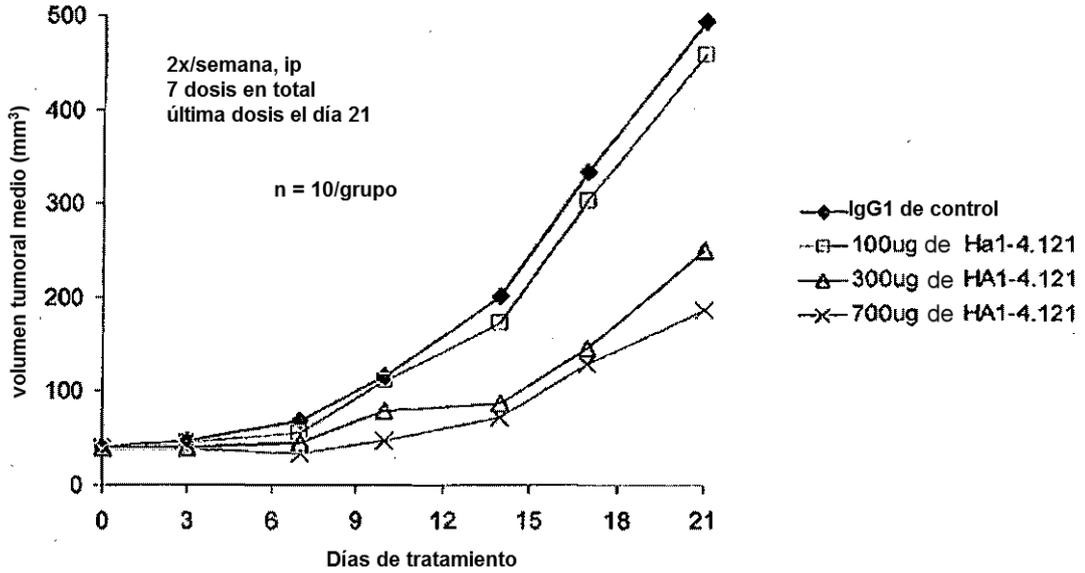


Figura 20

El mAb de PSCA Ha1-4.121 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata humano dependiente de andrógenos establecidos

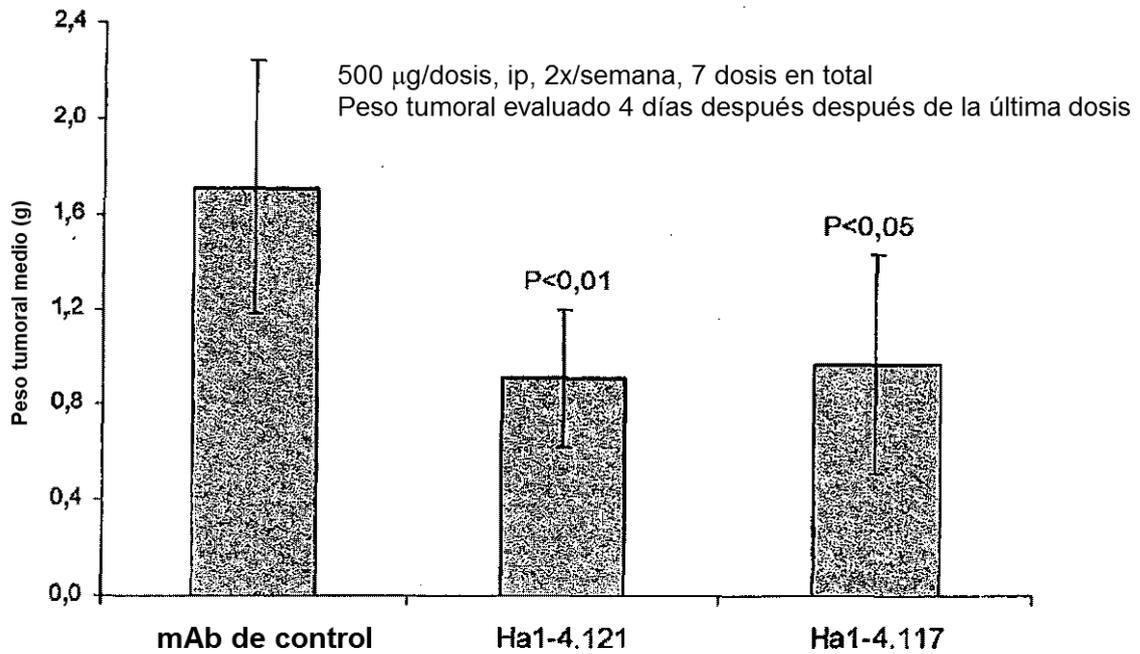


Figura 21
Los MAb de PSCA Ha1-4.121 y Ha1-4.117 inhibe el crecimiento de xenoinjertos de cáncer de próstata humano ortotópicos establecidos

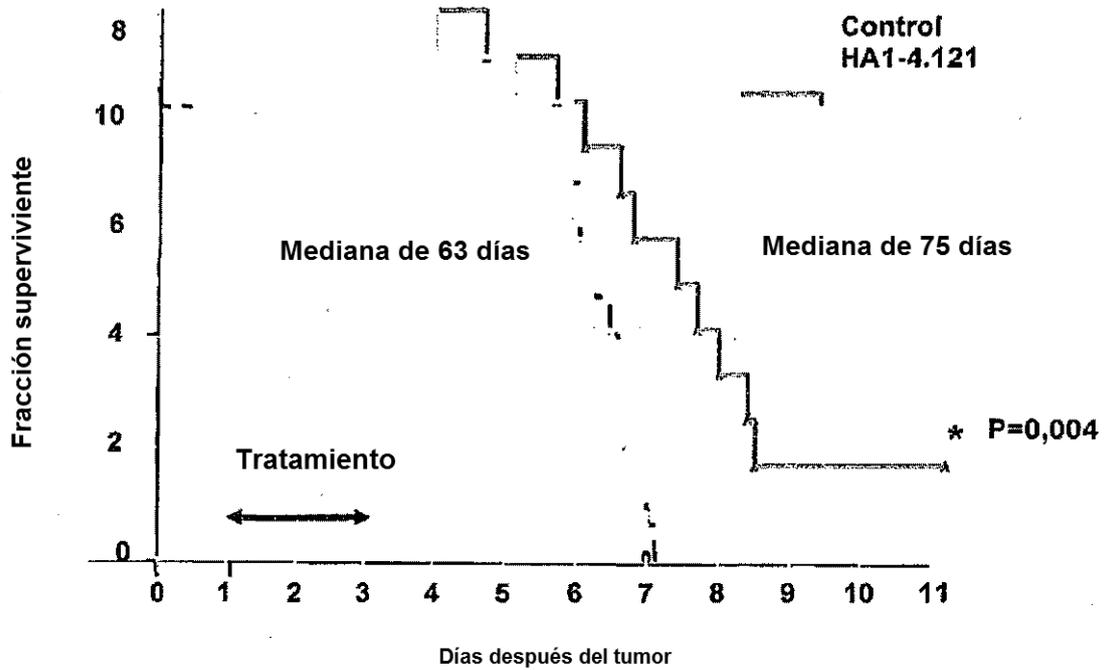


Figura 22
El HA1-4.121 prolonga la supervivencia de ratones SCID con tumores de próstata dependiente de andrógenos humanos ortotópicos establecidos

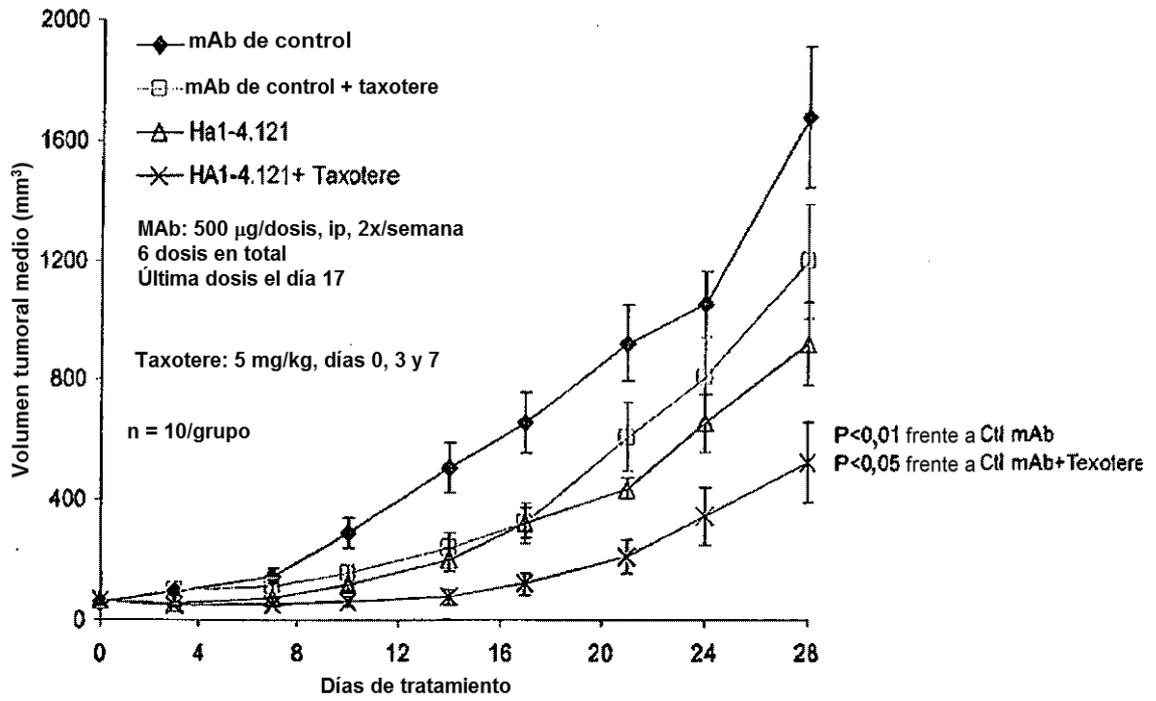


Figura 23
Inhibición potenciada del crecimiento de tumor de próstata con terapia de combinación de HA1-4.21 y Taxotere®

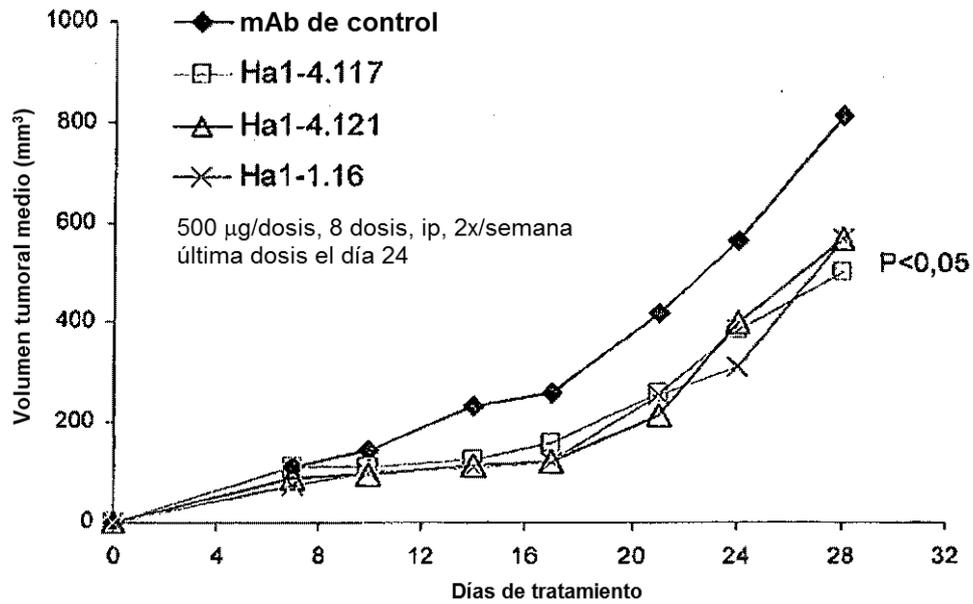


Figura 24
Los MAb de PSCA humanos inhiben el crecimiento de xenoinjertos de cáncer pancreático en ratones SCID

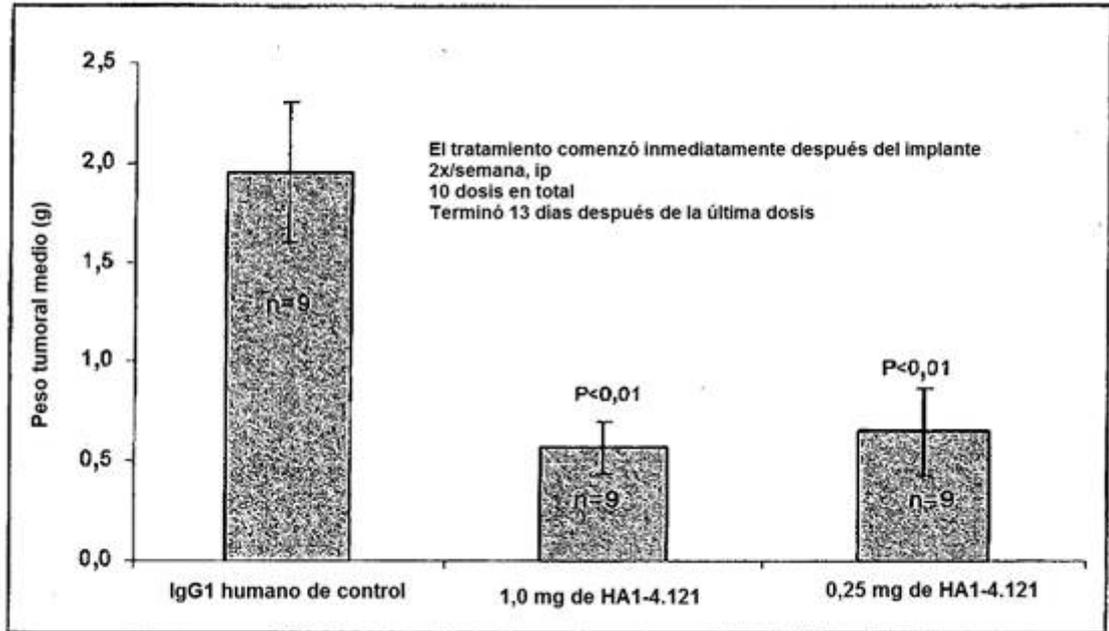


Figura 25
El HA1-4.121 inhibe el crecimiento de tumores pancreáticos implantados de forma ortotópica en ratones SCID

Figura 26
El mAb de PSCA HA1-4.121 inhibe las metástasis

Sumario de metástasis

Grupo	Incidencia de metástasis por examen microscópico			Incidencia de metástasis e invasiones por examen global	
	Pulmón	p-valor*	LN	Todos los sitios**	p-valor*
H3-1.4.1.2	5/8	-	7/9	8/9	-
HA1-4.121 1,0 mg	1/9	0,0498	1/9	2/9	0,0152
HA1-4.121 0,25 mg	2/9	0,1534	1/9	2/9	0,0152
LN= Ganglios linfáticos					
* Tratado frente a control por el ensayo exacto de Fisher					
** Los sitios de invasión incluyen la pared abdominal, el colon, el bazo, el riñón, la glándula adrenal, el retroperitoneo, etc.					
Los sitios de metástasis incluyen ganglios linfáticos					

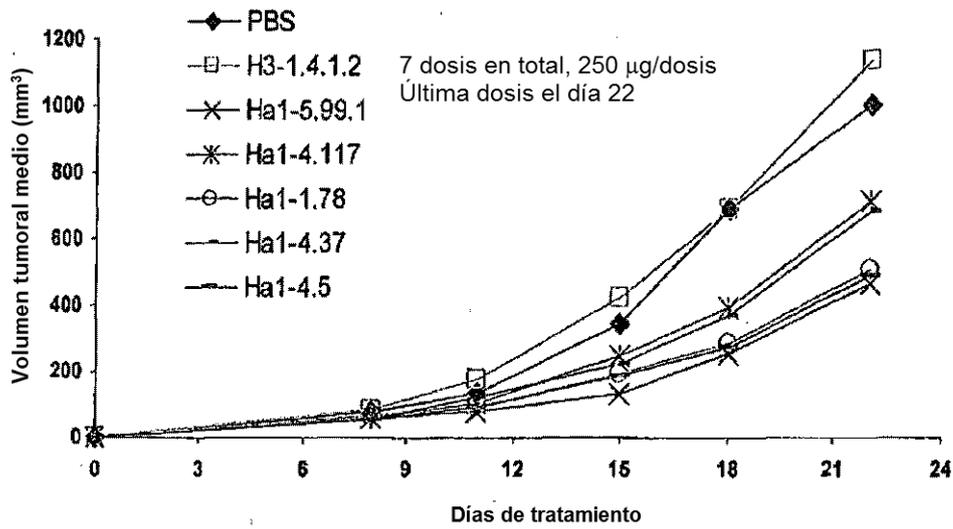


Figura 27
Los MAb de PSCA humanos inhiben el crecimiento de tumores de vejiga SW780 en ratones SCID