

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2004.05.28	(73) Titular(es): AGENSYS, INC. 2225 COLORADO BOULEVARD SANTA MONICA CA 90404 US
(30) Prioridade(s): 2003.05.30 US 475064 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2006.03.01	
(45) Data e BPI da concessão: 2012.01.11 070/2012	(72) Inventor(es): WANGMAO GE US AYA JAKOBOVITS US PIA M. CHALLITA-EID US ARTHUR B. RAITANO US
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **VARIANTES DE ANTIGÉNIO DE CÉLULAS ESTAMINAIS DE PRÓSTATA (PSCA) E SUBSEQUÊNCIAS DAS MESMAS**

(57) Resumo:

DESCREVEM-SE PSCA E A PROTEÍNA QUE ELE CODIFICA, E VARIANTES DOS MESMOS, EM QUE PSCA EXIBE EXPRESSÃO ESPECÍFICA PARA TECIDO EM TECIDO ADULTO NORMAL, E QUE APRESENTA UMA EXPRESSÃO ABERRANTE NOS CANCROS LISTADOS NO QUADRO I. CONSEQUENTEMENTE, O PSCA PROPORCIONA UM ALVO DE DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO, PROFILÁCTICO E/OU TERAPÊUTICO PARA CANCRO. O GENE DE PSCA OU FRAGMENTO DO MESMO, OU A PROTEÍNA QUE ELE CODIFICA, OU VARIANTES DO MESMO, OU UM FRAGMENTO DO MESMO, PODE SER USADO PARA PROVOCAR UMA RESPOSTA HUMORAL OU IMUNE CELULAR; ANTICORPOS OU CÉLULAS T REACTIVAS COM PSCA PODEM SER USADAS EM IMUNIZAÇÃO ACTIVA OU PASSIVA.

RESUMO**"VARIANTES DE ANTIGÊNIO DE CÉLULAS ESTAMINAIS DE PRÓSTATA
(PSCA) E SUBSEQUÊNCIAS DAS MESMAS"**

Descrevem-se PSCA e a proteína que ele codifica, e variantes dos mesmos, em que PSCA exhibe expressão específica para tecido em tecido adulto normal, e que apresenta uma expressão aberrante nos cancros listados no Quadro I. Consequentemente, o PSCA proporciona um alvo de diagnóstico, prognóstico, profilático e/ou terapêutico para cancro. O gene de PSCA ou fragmento do mesmo, ou a proteína que ele codifica, ou variantes do mesmo, ou um fragmento do mesmo, pode ser usado para provocar uma resposta humoral ou imune celular; anticorpos ou células T reactivas com PSCA podem ser usadas em imunização activa ou passiva.

DESCRIÇÃO

"VARIANTES DE ANTIGÊNIO DE CÉLULA ESTAMINAL DE PRÓSTATA (PSCA) E SUBSEQUÊNCIAS DAS MESMAS"

Campo Técnico

A invenção descrita no presente documento refere-se a genes e às proteínas que eles codificam, denominados PSCA, expressos em determinados cancros e a métodos de diagnóstico e terapêuticos e composições úteis no tratamento de cancros que expressam PSCA.

Técnica Anterior

O cancro é a segunda causa de morte em seres humanos depois da doença coronária. Em todo o mundo, milhões de pessoas morrem de cancro em cada ano. Nos Estados Unidos apenas, conforme relatado pela *American Cancer Society*, o cancro causa a morte de bem mais de meio milhão de pessoas anualmente, com mais de 1,2 milhão de novos casos diagnosticados por ano. Embora as mortes relacionadas com a doença cardíaca venham diminuindo significativamente, aquelas resultantes de cancro geralmente estão a subir. No início do próximo século, prevê-se que o cancro se torne a principal causa de morte.

Em todo o mundo, vários cancros estabelecem-se como as principais causas de morte. Em particular, carcinomas do pulmão, próstata, mama, cólon, pâncreas e ovário representam as causas primárias de morte pelo cancro. Esses e virtualmente todos os outros carcinomas partilham uma característica letal comum. Com muito poucas excepções, a doença metastática oriunda de um carcinoma é fatal. Além disso, mesmo para aqueles pacientes com cancro que inicialmente sobrevivem aos seus cancros primários, a experiência comum tem mostrado que as suas vidas são dramaticamente alteradas. Muitos pacientes com cancro sentem fortes ansiedades impulsionadas pelo conhecimento de

uma possível recorrência ou fracasso do tratamento. Muitos pacientes com cancro sentem debilidades físicas após o tratamento. Além disso, muitos pacientes com cancro sofrem uma recorrência.

Mundialmente, o cancro de próstata é o quarto cancro mais prevalente em homens. Na América do Norte e no norte da Europa, ele é o cancro mais comum em homens e é a segunda causa de morte por cancro em homens. Nos Estados Unidos apenas, mais de 30.000 homens morrem anualmente dessa doença - ultrapassado apenas pelo cancro de pulmão. Apesar da magnitude desses quadros, ainda não existe tratamento eficaz para o cancro de próstata metastático. A prostatectomia cirúrgica, terapêutica por radiação, terapêutica de ablação hormonal, castração cirúrgica e quimioterapia continuam a ser as principais modalidades de tratamento. Infelizmente, esses tratamentos são ineficazes para muitos e são frequentemente associados a consequências indesejáveis.

Na frente do diagnóstico, a falta de um marcador de tumor de próstata que possa detectar precisamente tumores localizados em estágio precoce permanece uma limitação significativa no diagnóstico e tratamento dessa doença. Embora o ensaio de antígeno específico da próstata (PSA) no soro seja uma ferramenta muito útil, contudo, sua especificidade e utilidade geral são amplamente consideradas como deficientes em vários aspectos importantes.

O progresso na identificação de marcadores específicos adicionais para o cancro de próstata foi aperfeiçoado pela geração de xenoinxertos de cancro de próstata que podem recapitular diferentes estágios da doença em ratinhos. Os xenoinxertos LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) são xenoinxertos de cancro de próstata que sobreviveram à passagem em ratinhos gravemente imunodeficientes combinados (SCID) e exibiram a capacidade de imitar a transição de

dependência de androgénio para independência de androgénio (Klein *et al.*, 1997, *Nat. Med.* 3:402). O marcadores de cancro de próstata mais recentemente identificados incluem PCTA-1 (Su *et al.*, 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7252), antigénio de membrana específico da próstata (PSM) (Pinto *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2 de Setembro de 1996; (9): 1445-51), STEAP (Hubert *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 7 de Dezembro de 1999; 96 (25): 14523-8) e antigénio de células estaminais da próstata (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:1735).

Embora os marcadores anteriormente identificados, tais como PSA, PSM, PCTA e PSCA, tenham facilitado os esforços para diagnosticar e tratar o cancro de próstata, é necessária a identificação de marcadores e alvos terapêuticos adicionais para cancro de próstata e cancros relacionados de forma a melhorar adicionalmente o diagnóstico e terapêutica.

O carcinoma de células renais (RCC) representa aproximadamente 3 por cento de malignidades em adultos. Uma vez que os adenomas atingem um diâmetro de 2 a 3 cm, existe potencial maligno. No adulto, os dois principais tumores renais malignos são adenocarcinoma de células renais e carcinoma de células transicionais da pélvis renal ou ureter. A incidência de adenocarcinoma de células renais é estimada em mais de 29.000 casos nos Estados Unidos e mais de 11.600 pacientes morreram dessa doença em 1998. O carcinoma de células transicionais é menos frequente, com uma incidência de aproximadamente 500 casos por ano nos Estados Unidos.

A cirurgia foi a terapêutica primária para adenocarcinoma de células renais durante muitas décadas. Até recentemente, a doença metastática era resistente a qualquer terapêutica sistémica. Com desenvolvimentos recentes em terapêuticas sistémicas, particularmente imunoterapias, o carcinoma de células renais metastático

pode ser abordado agressivamente em pacientes apropriados com uma possibilidade de respostas duráveis. Entretanto, existe ainda uma necessidade de terapêuticas eficazes para esses pacientes.

De todos os novos casos de cancro nos Estados Unidos, o cancro de bexiga representa aproximadamente 5 por cento em homens (quinto neoplasma mais comum) e 3 por cento em mulheres (oitavo neoplasma mais comum). A incidência está a crescer lentamente, concorrendo com um aumento da população mais velha. Em 1998, eram estimados 54.500 casos, incluindo 39.500 em homens e 15.000 em mulheres. A incidência ajustada à idade nos Estados Unidos é de 32 por 100.000 para homens e oito por 100.000 em mulheres. A proporção histórica de homens/mulheres de 3:1 pode estar a diminuir com relação aos padrões de tabagismo em mulheres. Estimaram-se 11.000 mortes em virtude de cancro de bexiga em 1998 (7.800 em homens e 3.900 em mulheres). A incidência e mortalidade pelo cancro de bexiga aumentam fortemente com a idade e será um problema crescente à medida que a população se torna mais velha.

A maioria dos cancros de bexiga reocorre na bexiga. O cancro de bexiga é tratado com uma combinação de ressecção transuretral da bexiga (TUR) e quimioterapia intravesical ou imunoterapia. A natureza multifocal e recorrente do cancro de bexiga realça as limitações da TUR. A maioria dos cancros músculo-invasivos não é curada pela TUR apenas. A cistectomia radical e derivação urinária são os meios mais eficazes para eliminar o cancro, mas trazem um impacto inegável sobre a função urinária e sexual. Continua a existir uma necessidade significativa de modalidades de tratamento que sejam benéficas para pacientes com cancro de bexiga.

130.200 casos estimados de cancro colorectal ocorreram em 2000 nos Estados Unidos, incluindo 93.800 casos de cancro de cólon e 36.400 de cancro rectal. Cancros

colorectais são o terceiro cancro mais comum em homens e mulheres. As taxas de incidência declinaram significativamente durante 1992-1996 (-2,1 % por ano). A pesquisa sugere que esses declínios foram em virtude de um aumento do rastreio e da remoção de pólipos, impedindo a progressão de pólipos em cancros invasivos. Estimam-se 56.300 mortes (47.700 por cancro de cólon, 8.600 por cancro rectal) em 2000, somando cerca de 11 % de todas as mortes por cancro nos E.U.A..

No momento, a cirurgia é a forma mais comum de terapêutica para o cancro colorectal e para cancros que não se disseminaram, ela é frequentemente curativa. A quimioterapia ou quimioterapia mais radiação, é fornecida antes ou após a cirurgia para a maioria dos pacientes cujo cancro perfurou profundamente a parede do intestino ou se disseminou para os gânglios linfáticos. Uma colostomia permanente (criação de uma abertura abdominal para eliminação de resíduos corporais) é ocasionalmente necessária para o cancro de cólon e não é rara ser requerida para o cancro rectal. Continua a existir uma necessidade por modalidades diagnósticas e de tratamento eficazes para o cancro colorectal.

Estimaram-se 164.100 novos casos de cancro de pulmão e brônquico em 2000, somando 14 % de todos os diagnósticos de cancro nos E.U.A.. A taxa de incidência de cancro de pulmão e brônquico está a diminuir significativamente em homens, de 86,5 por 100.000 em 1984 para 70,0 em 1996. Na década de 1990, a taxa de aumento entre mulheres começou a diminuir. Em 1996, a taxa de incidência em mulheres era de 42,3 por 100.000.

O cancro de pulmão e brônquico causou uma estimativa de 156.900 mortes em 2000, somando 28 % de todas as mortes por cancro. Durante 1992-1996, a mortalidade por cancro de pulmão declinou significativamente entre homens (-1,7 % por ano), enquanto que as taxas para mulheres ainda são

significativamente crescentes (0,9 % por ano). Desde 1987, mais mulheres têm morrido a cada ano por cancro de pulmão do que de cancro de mama que, durante mais de 40 anos, era a principal causa de morte por cancro em mulheres. A diminuição das taxas de mortalidade e incidência de cancro de pulmão resultou, mais provavelmente, das taxas diminuídas de tabagismo durante os 30 anos anteriores; contudo, a diminuição do padrão de tabagismo entre mulheres não acompanha aquela dos homens. Preocupante é que, enquanto o declínio no consumo de tabaco em adultos é lento, a utilização de tabaco por jovens está a aumentar novamente.

As opções de tratamento para o cancro de pulmão e brônquico são determinadas pelo tipo e estágio do cancro e incluem cirurgia, terapêutica por radiação e quimioterapia. Para muitos cancros localizados, a cirurgia é usualmente o tratamento de escolha. Em virtude do fato de a doença usualmente já se ter disseminado quando é diagnosticada, a terapêutica por radiação e quimioterapia são, frequentemente, necessárias em combinação com cirurgia. A quimioterapia sozinha ou combinada com radiação é o tratamento de escolha para cancro do pulmão de pequenas células; sob esse regime, uma grande percentagem de pacientes experimenta remissão a qual, em alguns casos, é de longa duração. Contudo, existe uma necessidade real de um tratamento eficaz e abordagens diagnósticas para os cancros de pulmão e brônquicos.

182.800 novos casos invasivos estimados de cancro de mama são esperados que ocorram entre mulheres nos Estados Unidos durante 2000. Adicionalmente, espera-se que cerca de 1.400 novos casos de cancro de mama sejam diagnosticados em homens em 2000. Após aumentar cerca de 4 % por ano na década de 1980, as taxas de incidência de cancro de mama em mulheres mantiveram-se num platô na década de 1990 em torno de 110,6 casos por 100.000.

Nos E.U.A. apenas, estimaram-se 41.200 mortes (40.800 em mulheres, 400 em homens) em 2000 em virtude de cancro de mama. O cancro de mama é classificado como o segundo entre as mortes por cancro em mulheres. De acordo com os dados mais recentes, as taxas de mortalidade declinaram significativamente durante 1992-1996, com as maiores diminuições em mulheres mais jovens, brancas e negras. Essa diminuição foi, provavelmente, o resultado de detecção mais precoce e tratamento aperfeiçoado.

Levando-se em conta as circunstâncias médicas e as preferências do paciente, o tratamento do cancro de mama pode envolver lumpectomia (remoção local do tumor) e remoção dos gânglios linfáticos sob o braço; mastectomia (remoção cirúrgica da mama) e remoção dos gânglios linfáticos sob o braço; terapêutica por radiação; quimioterapia; ou terapêutica hormonal. Frequentemente, dois ou mais métodos são usados em combinação. Numerosos estudos mostraram que, para a doença em estágio precoce, as taxas de sobrevivência a longo prazo após lumpectomia mais radioterapia são similares às taxas de sobrevivência após mastectomia radical modificada. Os avanços significativos nas técnicas de reconstrução proporcionam várias opções para reconstrução da mama após mastectomia. Recentemente, tal reconstrução tem sido feita ao mesmo tempo em que a mastectomia.

A excisão local do carcinoma ductal *in situ* (DCIS) com quantidades adequadas de tecido de mama normal subjacente pode impedir a recorrência local de DCIS. Radiação à mama e/ou tamoxifeno podem reduzir a chance de que DCIS ocorra no tecido da mama restante. Isso é importante porque a DCIS, se for deixada não tratada, pode desenvolver-se em cancro de mama invasivo. Entretanto, existem graves efeitos colaterais ou sequelas a esses tratamentos. Existe, portanto, uma necessidade de tratamentos eficazes para o cancro de mama.

Existiram 23.100 novos casos estimados de cancro ovariano nos Estados Unidos em 2000. O mesmo responde por 4 % de todos os cancros entre mulheres e é classificado como o segundo entre os cancros ginecológicos. Durante 1992-1996, as taxas de incidência de cancro ovariano diminuíram significativamente. Em consequência do cancro ovariano, estimaram-se 14.000 mortes em 2000. O cancro ovariano causa mais mortes do que qualquer outro cancro do sistema reprodutor feminino.

Cirurgia, terapêutica por radiação e quimioterapia são as opções de tratamento para o cancro ovariano. A cirurgia usualmente inclui a remoção de um ou ambos os ovários, das trompas de Falópio (salpingo-ooforectomia) e do útero (histerectomia). Em alguns tumores muito precoces, somente o ovário envolvido será removido, especialmente em mulheres jovens que desejam ter filhos. Na doença avançada, uma tentativa é feita para remover toda a doença intra-abdominal para intensificar o efeito da quimioterapia. Continua a haver uma necessidade importante de opções de tratamento eficazes para o cancro ovariano.

Foram estimados 28.300 novos casos de cancro pancreático nos Estados Unidos em 2000. Durante os últimos 20 anos, as taxas de cancro pancreático têm declinado em homens. As taxas entre as mulheres permaneceram aproximadamente constantes, mas começam a declinar. O cancro pancreático causou 28.200 mortes estimadas em 2000 nos Estados Unidos. Durante os últimos 20 anos, houve uma leve, mas significativa diminuição nas taxas de mortalidade entre homens (cerca de -0,9 % por ano), enquanto que as taxas têm aumentado ligeiramente entre mulheres.

Cirurgia, terapêutica por radiação, e quimioterapia são as opções de tratamento para o cancro pancreático. Essas opções de tratamento podem aumentar a sobrevivência e/ou aliviar os sintomas em muitos pacientes, mas não é provável que produzam uma cura para a maioria. Existe uma

necessidade significativa de opções terapêuticas e diagnósticas para o cancro pancreático.

A presente invenção refere-se a um gene, designado PSCA, que se descobriu que é sobre-expresso em cancros. O documento WO 98/40403, documento WO 01/40309 e Patente US Nº 6.258.939 descrevem variantes de PSCA, anticorpos contra os mesmos e utilizações terapêuticas dos mesmos. A análise de expressão por Northern blot da expressão de gene de PSCA em tecidos normais mostra um padrão de expressão restrito a tecidos adultos. Proporcionam-se as sequências de nucleótido (Figura 2) e aminoácido (Figura 2, e Figura 3) de PSCA. O perfil relacionado com o tecido de PSCA em tecidos adultos normais, combinado com a sobre-expressão observada nos tecidos listados no Quadro I, mostra que PSCA é aberrantemente sobre-expresso em pelo menos alguns cancros, e assim serve como um alvo de diagnóstico, profilático, prognóstico, e/ou terapêutico útil para cancros do(s) tecido(s) tal(is) como aqueles listados no Quadro I.

Sumário da invenção

A presente invenção refere-se mais particularmente a detecção de uma variante de transcrito específica não revelada anteriormente, PSCA v. 4 (SEQ. ID. NO:11; veja-se Quadro V(c) e Figura 2D) e variantes de nucleótido único identificadas do mesmo. Assim, num aspecto, a presente invenção proporciona um método *in vitro* para detectar a presença de um polinucleótido de PSCA numa amostra de teste derivada de um indivíduo como um indicador da presença de cancro que compreende:

colocar em contacto a amostra com uma sonda que se liga especificamente ao polinucleótido de PSCA, e detectar a ligação da sonda ao polinucleótido de PSCA, em que o polinucleótido de PSCA é seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- (a) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993;
 - (b) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 521 é T;
 - (c) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 578 é C;
 - (d) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 649 é G;
 - (e) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 653 é T;
 - (f) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 721 é A;
 - (g) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 781 é A;
 - (h) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 788 é G;
 - (i) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 989 é A;
- e
- (j) um polinucleótido completamente complementar a um polinucleótido de qualquer um de (a) a (i);
- em que a etapa de detecção compreende comparar uma quantidade de ligação da sonda que se liga especificamente ao polinucleótido de PSCA à quantidade de ligação da sonda ao polinucleótido numa amostra de tecido normal correspondente, e em que a presença de

polinucleótido de PSCA elevado na amostra de teste em relação à amostra de tecido normal proporciona uma indicação da presença de cancro.

Num outro aspecto, a presente invenção proporciona um método *in vitro* para detectar a presença de uma proteína de PSCA que tem uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOS:14, 11, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 numa amostra de teste derivada de um indivíduo como um indicador da presença de cancro que compreende:

colocar em contacto a amostra com um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga especificamente à proteína de PSCA, e detectar uma quantidade de ligação do anticorpo ou fragmento do mesmo à proteína de PSCA na amostra de teste e comparar a ligação do anticorpo ou fragmento do mesmo à proteína numa amostra de tecido normal, em que a presença de proteína de PSCA elevada na amostra de teste em relação à amostra de tecido normal proporciona uma indicação da presença de cancro.

O pedido de patente publicado US 2003/023054 (Genentech) revela uma proteína secretada humana PR0232, que tem uma sequência 97 % idêntica a SEQ ID NOS:14, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 e 96 % idêntica a SEQ ID NOS:21 e 22. Enquanto a expressão de polinucleótido PR0232 é indicada em epitélio prostático, não existe ensinamento na mesma memória descritiva de qualquer meio de diagnóstico de cancro. Nota-se meramente que a proteína PR0232 mostra homologia a um antigénio de superfície de célula estaminal.

Breve Descrição dos Desenhos

Figura 1. Intencionalmente Omitida.

Figura 2.

A) A sequência de ADNc e de aminoácidos da variante 1 de PSCA (também denominada "PSCA v.1" ou "variante 1 de PSCA") é mostrada na Figura 2A. A metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se do ácido nucleico 18-389 incluindo o codão de terminação.

B) A sequência de ADNc e de aminoácidos da variante 2 de PSCA (também denominada "PSCA v.2") é mostrada na Figura 2B. O codão para a metionina de iniciação está sublinhado. A grelha de leitura aberta estende-se do ácido nucleico 56-427 incluindo o codão de terminação.

C) A sequência de ADNc e de aminoácidos da variante 3 de PSCA (também denominada "PSCA v.3") é mostrada na Figura 2C. O codão para a metionina de iniciação está sublinhado. A grelha de leitura aberta estende-se do ácido nucleico 423-707 incluindo o codão de terminação.

D) A sequência de ADNc e de aminoácidos da variante 4 de PSCA (também denominada "PSCA v.4") é mostrada na Figura 2D. O codão para a metionina de iniciação está sublinhado. A grelha de leitura aberta estende-se do ácido nucleico 424-993 incluindo o codão de terminação.

E) A sequência de ADNc e de aminoácidos da variante 5 de PSCA (também denominada "PSCA v.5") é mostrada na Figura 2E. O codão para a metionina de iniciação está sublinhado. A grelha de leitura aberta estende-se do ácido nucleico 910-1479 incluindo o codão de terminação.

F) A sequência de ADNc e de aminoácidos da variante 6 de PSCA (também denominada "PSCA v.6") é mostrada na Figura 2F. O codão para a metionina de iniciação está sublinhado. A grelha de leitura aberta estende-se do ácido nucleico 83-427 incluindo o codão de terminação.

G) Variantes de SNP de PSCA v.2, PSCA v.7 até v.18. As proteínas de PSCA v.7 a v.18 têm 123 aminoácidos. As variantes de PSCA v.7 até v.18 são variantes com uma única diferença de nucleótido com relação à PSCA v.2 e codificam a mesma proteína que a v.2. Embora essas variantes de SNP sejam mostradas separadamente, elas também podem ocorrer em quaisquer combinações e em qualquer uma das variantes de transcrito listadas acima nas Figuras 2A até 2F.

H) Variantes de SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 até v.30. As proteínas de PSCA v.19 até v.30 têm 189 aminoácidos. As variantes de PSCA v.19 até v.30 são variantes com uma única diferença de nucleótido com relação à PSCA v.4. As proteínas de PSCA v.9, v.10, v.11, v.24 e v.25 diferem da PSCA v.1 por um aminoácido. PSCA v.23, v.28, v.29 e v.30 codificam a mesma proteína que a v.4. Embora essas variantes de SNP sejam mostradas separadamente, elas também podem ocorrer em quaisquer combinações e em qualquer uma das variantes de transcrito v.3 e v.4.

Figura 3.

A) A sequência de aminoácidos da PSCA v.1 é mostrada na Figura 3A; ela tem 123 aminoácidos.

B) A sequência de aminoácidos da PSCA v.3 é mostrada na Figura 3B; ela tem 94 aminoácidos.

C) A sequência de aminoácidos da PSCA v.4 é mostrada na Figura 3C; ela tem 189 aminoácidos.

D) A sequência de aminoácidos da PSCA v.6 é mostrada na Figura 3D; ela tem 114 aminoácidos.

E) A sequência de aminoácidos da PSCA v.19 é mostrada na Figura 3E; ela tem 189 aminoácidos.

F) A sequência de aminoácidos da PSCA v.20 é mostrada na Figura 3F; ela tem 189 aminoácidos.

G) A sequência de aminoácidos da PSCA v.21 é mostrada na Figura 3G; ela tem 189 aminoácidos.

H) A sequência de aminoácidos da PSCA v.22 é mostrada na Figura 3H; ela tem 189 aminoácidos.

I) A sequência de aminoácidos da PSCA v.24 é mostrada na Figura 3I; ela tem 189 aminoácidos.

J) A sequência de aminoácidos da PSCA v.25 é mostrada na Figura 3J; ela tem 189 aminoácidos.

K) A sequência de aminoácidos da PSCA v.26 é mostrada na Figura 3k; ela tem 189 aminoácidos.

L) A sequência de aminoácidos da PSCA v.27 é mostrada na Figura 3L; ela tem 189 aminoácidos.

Como é utilizado no presente documento, uma referência a PSCA inclui todas as variantes do mesmo, incluindo aquelas mostradas nas Figuras 2, 3, 10, 11 e 12, a menos que o contexto indique claramente de outro modo.

Figura 4. Alinhamento de PSCA v.4 com antigénio de células estaminais da próstata humana (gi 27482160).

Figura 5. Figuras 5(a)-(c): Perfil de Hidrofilicidade de aminoácidos de PSCA v.1, v.3, e v.4 determinado através de análise de sequência por algoritmo em computador usando o método de Hopp e Woods (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828) acessido ao website ProtScale localizado na World Wide Web em (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) através do servidor de biologia molecular ExPasy.

Figura 6. Figuras 6(a)-(c): Perfil de Hidropaticidade de aminoácidos de PSCA v.1, v.3, e v.4, determinado através de análise de sequência por algoritmo de computador usando o método de Kyte e Doolittle (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132) acessido ao website ProtScale localizado na World Wide Web a ([.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)) através do servidor de biologia molecular ExPasy.

Figura 7. Figuras 7(a)-(c): Perfil de resíduos de aminoácidos acessíveis percentual de PSCA v.1, v.3 e v.4, determinado através de análise de sequência por algoritmo de computador usando o método de Janin (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492) acessido ao website ProtScale localizado na World Wide Web a ([.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)) através do servidor de biologia molecular ExPasy.

Figura 8. Figuras 8(a)-(c): Perfil de Flexibilidade Média de Aminoácidos de PSCA v.1, v.3 e v.4, determinado através de análise de sequência por algoritmo de computador usando o método de Bhaskaran e Ponnuswamy (Bhaskaran R. e Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-

255) acessado ao website ProtScale localizado na World Wide Web a ([.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)) através do servidor de biologia molecular ExPasy.

Figura 9. Figuras 9(a)-(c): Perfil de Beta-Volta de aminoácidos de PSCA v.1, v.3 e v.4, determinado através de análise de sequência por algoritmo de computador usando o método de Deleage e Roux (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294) acessado ao website ProtScale localizado na World Wide Web a ([.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl](http://expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl)) através do servidor de biologia molecular ExPasy.

Figura 10. Composições de exão de variantes de transcrito de PSCA. As variantes PSCA v.2, v.3, v.4 e v.5 são variantes de transcrito da v.1. A variante v.2 começou a transcrição 47 pb além da extremidade 5' com relação à v.1. A variante v.3 tinha um exão 2 mais curto quando comparado à v.2. As variantes v.4 e v.5 tinham um primeiro exão alternativo. A variante 5 manteve o segundo intrão, quando comparado à v.4. A ordem dos exões potenciais sobre o genoma humano é mostrada na parte inferior. As caudas Poli A não são mostradas na Figura. Os finais dos exões são mostrados acima das caixas. Os números entre "()" sob as caixas correspondem àquelas da PSCA v.2. As extensões dos intrões e exões não são proporcionais.

Figura 11. Figura 11 (a): Alinhamento esquemático de variantes de proteína de PSCA. As variantes de proteína correspondem às variantes de nucleótido. As variantes de nucleótido PSCA v.2, v.7 a v.18 codificam a mesma proteína que a v.1. A variante v.5 codifica a mesma proteína que a v.4 e a proteína v.3 era parte da v.4. As variantes de nucleótido PSCA v.2, v.3, v.4 e v.5 eram variantes de transcrito da v.1, como é mostrado na Figura 10. O SNP em v.2 que não causou alteração de codão em v.2 causou uma alteração de codão em v.3, v.4 e v.5. Uma única diferença de aminoácido é indicada acima das caixas. As caixas pretas

representam a mesma sequência que a PSCA v.1. Os números sob a caixa correspondem à PSCA v.1. Figura 11(b): Alinhamento esquemático de variantes de proteína traduzidos a partir de variantes de PSCA v.4 de SNP. As variantes de proteína correspondem às variantes de nucleótido. As variantes de nucleótido PSCA v.23, v.28, v.29 e v.30 codificam a mesma proteína que a v.4. SNP em v.4, que resultou numa alteração de aminoácido em v.4 e também resultou numa alteração de aminoácido em v.5 e, se ocorria entre os aa 96- 189, também em v.3. Uma única diferença de aminoácido é indicada acima das caixas. As caixas pretas representam a mesma sequência que a PSCA v.4. Os números sob a caixa correspondem à PSCA v.4.

Figura 12. Figura 12(a): Alinhamento esquemático de variantes de PSCA v.2 de SNP. As variantes PSCA v.6 a v.18 são variantes com uma única diferença de nucleótido quando comparado à variante v.2. A variante v.6 alterou a ORF de 56-427 para 83-427. Embora essas variantes de SNP sejam mostradas separadamente, elas também poderiam ocorrer em quaisquer combinações e em quaisquer variantes de transcrito, tal como v.4, mostrada na Fig. 12, que contivessem os pares de base. Os números correspondem àqueles da PSCA v.2. A caixa preta mostra a mesma sequência que a PSCA v.2. SNPs são indicados acima da caixa. Figura 12(b): Alinhamento esquemático de variantes de PSCA v.4 de SNP. As variantes PSCA v.19 a v.30 são variantes com uma única diferença de nucleótido quando comparada à variante v.4 (ORF:424-993). Embora essas variantes de SNP sejam mostradas separadamente, elas também poderiam ocorrer em quaisquer combinações e em quaisquer variantes de transcrito que contivessem os pares de base, tal como v.5, mostrada na Fig. 10. Os números correspondem àqueles da PSCA v.4. A caixa preta mostra a mesma sequência que a PSCA v.4. SNPs são indicados acima da caixa.

Figura 13. Previsão de estrutura secundária e domínios transmembranares de variantes de proteína de PSCA.

Figuras 13A, 13B, 13C e 13D: A estrutura secundária da variante 1 de proteína de PSCA (SEQ ID NO:6), variante 3 (SEQ ID NO:10), variante 4 (SEQ ID NO:14) e variante 6 (SEQ ID NO:20) (Figuras A-D, respectivamente) foi prevista usando o método HNN - Hierarchical Neural Network (NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS, Março de 2000, Vol. 25, N° 3 [291]: 147-150 Combet C., Blanchet C., Geoutjon C. e Deléage G., http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), acessado do servidor de biologia molecular Expasy localizado na World Wide Web a (www.expasy.ch/tools/). Esse método prevê a presença e localização de filamentos com alfa hélices estendidas e enrolamentos aleatórios da sequência de proteína primária. O percentual de cada proteína numa determinada estrutura secundária é também listado.

Figuras 13E, 13G, 13I e 13K: Representação esquemática da probabilidade de existência de regiões transmembranares de variantes de PSCA 1,3,4 e 6, respectivamente, baseado no algoritmo TMpred de Hofmann e Stoffel, o qual utiliza TMBASE (K. Hofmann, W. Stoffel. TMBASE - A database of membrane spanning protein segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166, 1993). Figuras 13F, 13H, 13J e 13L: Representação esquemática da probabilidade da existência de regiões transmembranares de variante 1 de PSCA, baseado no algoritmo TMHMM de Sonnhammer, von Heijne e Krogh (Erik L.L. Sonnhammer, Gunnar von Heijne e Anders Krogh: A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences, em Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, páginas 175-182, Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff e C. Sensen Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998). Os algoritmos TMpred e TMHMM são acessados do servidor de biologia molecular Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/>).

Figura 14. Expressão de variantes de PSCA. Figura 14(A): Iniciadores foram projectados para diferenciar entre PSCA v.1/v.2/v.4, PSCA v.3 e PSCA v.5. PSCA v.1/v.2/v.4 levou a um produto de PCR de 425 pb, PSCA v.3 levou a um produto de PCR de 300 pb enquanto que PSCA v.5 levou a um produto de PCR de 910 pb de tamanho. Figura 14(B): ADNc de primeira cadeia foi preparado de bexiga normal, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago, reservatórios de cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro renal, cancro de cólon, cancro de pulmão, cancro de ovário, cancro de mama, metástase cancerígena e cancro de pâncreas. Normalização foi obtida através de PCR usando iniciadores para actina. PCR semiquantitativa, usando os iniciadores específicos a variante, foi realizada a 30 ciclos de amplificação. Os resultados mostram a expressão de PSCA v.5 principalmente em cancro de mama, metástase cancerígena e cancro de pâncreas e em menor nível em cancro de cólon e cancro de pulmão. O produto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado em cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro renal, cancro de cólon, cancro de pulmão, cancro de ovário, cancro de mama, metástase cancerígena e cancro de pâncreas. Dentre os tecidos normais, o produto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado somente em próstata, estômago e em menor nível em rim e pulmão enquanto que a PSCA v. 5 não foi detectada em qualquer tecido normal. O produto de PCR de PSCA v.3 não foi detectado em qualquer uma das amostras testadas.

Figura 15. Expressão de PSCA v.4 e PSCA v.5. Figura 15(A): Iniciadores foram projectados para diferenciar entre PSCA v.4 e PSCA v.5. PSCA v.4 levou a um produto de PCR de 460 pb enquanto que a PSCA v.5 levou a um produto de PCR de 945 pb de tamanho. Figura 15(B): ADNc de primeira cadeia foi preparado de bexiga normal, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético,

testículo, pâncreas, cólon, estômago, reservatórios de cancro de próstata, cancro de bexiga e reservatórios com multixenoenxertos (xenoenxertos de cancro de próstata, cancro renal e cancro de bexiga). Normalização foi obtida através de PCR usando iniciadores para actina. PCR semiquantitativa, usando os iniciadores específicos a variante foi realizada a 30 ciclos de amplificação. Os resultados mostram a expressão de PSCA v.4 em cancro de próstata, cancro de bexiga e reservatórios com multixenoenxertos, rim de próstata normais. PSCA v.5 foi detectada somente em próstata normal e cancro de bexiga.

Descrição Detalhada

Definições:

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos, notações e outros termos ou terminologia científica usados no presente documento destinam-se a ter os significados comumente compreendidos pelos peritos na especialidade à qual a presente invenção pertence. Em alguns casos, termos com significados comumente compreendidos são definidos no presente documento para clareza e/ou para pronta referência e a inclusão de tais definições no presente documento não deverá ser necessariamente construída para representar uma diferença substancial sobre aquilo que é geralmente compreendido na técnica. Muitas das técnicas e procedimentos descritos ou mencionados no presente documento são bem compreendidos e comumente utilizados usando metodologia convencional pelos peritos na especialidade, tais como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular amplamente utilizadas descritas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2^a edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Como for apropriado, procedimentos envolvendo a utilização de kits e reagentes comercialmente disponíveis são geralmente realizados de acordo com protocolos e/ou parâmetros

definidos pelo fabricante, a menos que de outro modo observado.

Os termos "cancro de próstata avançado", "cancro de próstata localmente avançado", "doença avançada" e "doença localmente avançada" significam cancros de próstata que se estenderam através da cápsula da próstata e devem ser entendidos como incluindo doença no estágio C, sob o sistema de estágios de doença C1 - C2 da *American Urological Association* (AUA) sob o sistema Whitmore-Jewett e doença no estágio T3 - T4 e N+ sob o sistema TNM (tumor, gânglio, metástase). Em geral, a cirurgia não é recomendada para pacientes com doença localmente avançada e esses pacientes têm resultados substancialmente menos favoráveis, comparado a pacientes tendo cancro de próstata clinicamente localizado (confinado a órgão). A doença localmente avançada é clinicamente identificada por evidência palpável de endurecimento além da borda lateral da próstata ou assimetria ou endurecimento acima da base da próstata. O cancro de próstata localmente avançado actualmente é diagnosticado patologicamente após prostectomia radical se o tumor invade ou penetra a cápsula prostática e estende-se para a margem cirúrgica ou invade as vesículas seminais.

"Alteração do padrão nativo de glicosilação" destina-se, para as finalidades no presente documento, a significar deleção de uma ou mais porções de hidrato de carbono encontradas em PSCA com sequência nativa (através de remoção do local de glicosilação subjacente ou através de eliminação da glicosilação através de meios químicos e/ou enzimáticos) e/ou adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes no PSCA de sequência nativa. Além disso, a frase inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, envolvendo uma alteração na natureza e proporções das várias porções de hidrato de carbono presentes.

O termo "análogo" refere-se a uma molécula a qual é estruturalmente similar ou partilha atributos similares ou correspondentes com outra molécula (por exemplo, uma proteína relacionada com PSCA). Por exemplo, um análogo da proteína de PSCA pode ser ligado especificamente através de um anticorpo ou célula T que se liga especificamente ao PSCA.

O termo "anticorpo" é usado no senso mais amplo. Portanto, um "anticorpo" pode ser anticorpos que ocorrem naturalmente ou feitos pelo homem, tais como monoclonais, produzidos através tecnologia convencional de hibridoma. Anticorpos anti-PSCA compreendem anticorpos monoclonais e policlonais, bem como fragmentos contendo o domínio de ligação a antígeno e/ou uma ou mais regiões de determinação de complementaridade desses anticorpos.

Um "fragmento de anticorpo" é definido como pelo menos uma porção da região variável da molécula de imunoglobulina que se liga a seu alvo, isto é, a região de ligação a antígeno. Numa forma de realização, ele abrange, especificamente, anticorpos anti-PSCA simples e clones dos mesmos (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e de neutralização) e composições de anticorpo anti-PSCA com especificidade poliepitópica.

O termo "sequências com codão otimizado" refere-se a sequências de nucleótidos que foram otimizadas para uma espécie hospedeira em particular através de substituição de quaisquer codões tendo uma frequência de utilização de menos do que cerca de 20 %. Sequências de nucleótidos que foram otimizadas para expressão numa determinada espécie hospedeira através de eliminação de sequências de poliadenilação prejudiciais, eliminação de sinais de divisão de exão/intrão, eliminação de repetições semelhantes a transposição e/ou otimização do teor de GC além da otimização de codão, são referidas no presente documento como uma "sequência com expressão intensificada".

Uma "biblioteca combinatória" é uma colecção de diversos compostos químicos gerados através de síntese química ou síntese biológica por meio de combinação de uma série de "blocos de construção" química, tais como reagentes. Por exemplo, uma biblioteca química combinatória linear, tal como uma biblioteca de polipéptido (por exemplo, muteína), é formada através de combinação de um conjunto de blocos de construção química denominados aminoácidos em cada forma possível para uma determinada extensão de composto (isto é, o número de aminoácidos num composto polipeptídico). Numerosos compostos químicos são sintetizados através de tal mistura combinatória de blocos de construção química (Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37 (9): 1233-1251 (1994)).

A preparação e rastreio de bibliotecas combinatórias são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Tais bibliotecas químicas combinatórias incluem, mas não estão limitadas a, bibliotecas de péptido (veja-se, por exemplo, Patente U.S. N° 5.010.175, Furka, *Pept. Prot. Res.* 37: 487-493 (1991), Houghton *et al.*, *Nature*, 354: 84-88 (1991)), peptóides (Publicação PCT No WO 91/19735), péptidos codificados (Publicação PCT WO 93/20242), biooligómeros aleatórios (Publicação PCT WO 92/00091), benzodiazepinas (Pat. U.S. N° 5.288.514), diversómeros, tais como hidantoínas, benzodiazepinas e dipéptidos (Hobbs *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568 (1992)), peptidomiméticos não peptídicos com uma armação de Beta-D-Glicose (Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217- 9218 (1992)), sintéticos orgânicos análogos de bibliotecas de pequenos compostos (Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho *et al.*, *Science* 261: 1303 (1993)) e/ou peptidil fosfonatos (Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)). Veja-se, de modo geral, Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.* 37: 1385

(1994), bibliotecas de ácido nucleico (veja-se, por exemplo, Stratagene, Corp.), bibliotecas de ácido nucleico peptídico (veja-se, por exemplo, Patente U.S. 5.539.083), bibliotecas de anticorpo (veja-se, por exemplo, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology* 14 (3): 309-314 (1996) e PCT/US96/10287), bibliotecas de hidrato de carbono (veja-se, por exemplo, Liang *et al.*, *Science* 274: 1520-1522 (1996) e Patente U.S. N° 5.593.853) e bibliotecas de pequenas moléculas orgânicas (veja-se, por exemplo, benzodiazepinas, Baum, *C&EN*, 18 de Janeiro, página 33 (1993); isoprenóides, Patente U.S. N° 5.569.588; tiazolidinonas e metatiazanonas, Patente U.S. N° 5.549.974; pirrolidinas, Patentes U.S. Nos. 5.525.735 e 5.519.134; compostos de morfolino, Patente U.S. N° 5.506.337; benzodiazepinas, Patente U.S. N° 5.288.514; e similares).

Dispositivos para a preparação de bibliotecas combinatórias estão comercialmente disponíveis (veja-se, por exemplo, 357 NIPS, 390 NIPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050, Plus, Millipore, Bedford, NIA). Uma série de sistemas robóticos bem conhecidos também foi desenvolvida para químicas em fase em solução. Esses sistemas incluem estações de trabalho automatizadas, tal como o aparelho de síntese automatizada desenvolvido pela Takeda Chemistry Industries, LTDA. (Osaka, Japão) e muitos sistemas robóticos que utilizam braços robóticos (Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; orca, Hewlett-Packard, Paio Alto, Calif.), os quais imitam operações sintéticas manuais realizadas por um químico. Qualquer um dos dispositivos acima é adequado para utilização com a presente invenção. A natureza e implementação de modificações a esses dispositivos (se houver) de modo que eles possam operar como é discutido no presente documento será evidente para os peritos na especialidade relevante. Além disso, numerosas bibliotecas

combinatórias estão, em si, comercialmente disponíveis (veja-se, por exemplo, ComGenex, Princeton, NJ; Asinex, Moscou, RU; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltda., Moscou, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD; etc.).

O termo "agente citotóxico" refere-se a uma substância que inibe ou impede a actividade de expressão de células, funcionamento de células e/ou causa destruição de células. O termo destina-se a incluir agentes quimioterapêuticos de isótopos radioactivos e toxinas, tais como toxinas de moléculas pequenas ou toxinas enzimaticamente activas de origem bacteriana, fúngica, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes das mesmas. Exemplos de agentes citotóxicos incluem, mas não estão limitados a, auristatinas, auromicinas, maitansinóides, Ítrio, bismuto, ricina, cadeia-A de ricina, combrestatina, duocarmicinas, dolostatinas, doxorubicina, daunorrubicina, taxol, cisplatina, brometo de etídio ccl065, etoposido de mitomicina, tenoposido, vincristina, vimblastina, colchicina, dihidroxi antracina diona, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina A, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inibidor de *Saponaia officinalis* e glicocorticóide e outros agentes quimioterapêuticos, bem como radioisótopos, tais como At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² ou ²¹³, P³² e isótopos radioactivos de Lu, incluindo Lu¹⁷⁷. Anticorpos podem ser também conjugados a uma enzima de activação de pró-fármaco anticancro capaz de conversão da pró-fármaco em sua forma activa.

O "produto de gene" é, algumas vezes, referido no presente documento como uma proteína ou ARNm. Por exemplo, um "produto de gene da invenção" é, algumas vezes, referido no presente documento como uma "sequência de aminoácidos de

cancro", "proteína de cancro", "proteína de um cancro listado no Quadro I", um "ARNm de cancro", "ARNm de um cancro listado no Quadro I", etc. Numa forma de realização, a proteína de cancro é codificada por um ácido nucleico da Figura 2. A proteína de cancro pode ser um fragmento ou, alternativamente, ser uma proteína de comprimento total ao fragmento codificado pelos ácidos nucleicos da Figura 2. Numa forma de realização, uma sequência de aminoácidos de cancro é usada para determinar a identidade ou similaridade de sequência. Em outra forma de realização, as sequências são variantes alélicas que ocorrem naturalmente da proteína codificada por um ácido nucleico da Figura 2. Em outra forma de realização, as sequências são variantes de sequência como é descrito adicionalmente no presente documento.

Ensaio de "rastreamento de elevado rendimento" com relação à presença, ausência, quantificação ou outras propriedades de ácidos nucleicos ou produtos de proteína em particular são bem conhecidos pelos peritos na especialidade. Similarmente, ensaios de ligação e ensaios de gene repórter são similarmente bem conhecidos. Assim, por exemplo, a Patente U.S. N° 5.559.410 descreve métodos de rastreamento de elevado rendimento para proteínas; a Patente U.S. N° 5.585.639 descreve métodos de rastreamento de elevado rendimento para ligação de ácido nucleico (isto é, em fileiras); enquanto que as Patentes U.S. Nos. 5.576.220 e 5.541.061 descrevem métodos de rastreamento de elevado rendimento para ligação de ligante/anticorpo.

Além disso, sistemas de rastreamento de elevado rendimento estão comercialmente disponíveis (veja-se, por exemplo, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA; etc.). Esses sistemas, tipicamente, automatizam procedimentos inteiros, incluindo todo

pipeteamento de amostra e reagente, distribuição de líquido, incubações sincronizadas e leituras finais da microlâmina em detector(es) apropriado(s) para o ensaio. Esses sistemas configuráveis proporcionam elevado rendimento e início rápido, bem como um elevado grau de flexibilidade e padronização. Os fabricantes de tais sistemas proporcionam protocolos detalhados para vários sistemas de elevado rendimento. Assim, por exemplo, a Zymark Corp. proporciona boletins técnicos descrevendo sistemas de rastreamento para a detecção da modulação da transcrição de gene, ligação a ligando e similares.

O termo "homólogo" refere-se a uma molécula a qual exibe homologia a outra molécula, por exemplo, tendo sequências de resíduos químicos que são os mesmos ou similares em posições correspondentes.

"Antigénio de leucócito humano" ou "HLA" é uma proteína do Principal Complexo de Histocompatibilidade (MHC) humano da classe I ou classe II (veja-se, por exemplo, Stites *et al.*, IMMUNOLOGY, 8^a Ed., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994)).

Destinam-se os termos "hibridar", "hibridação", "hibrida" e similares, usados no contexto de polinucleótidos, a referir-se a condições convencionais de hibridação, de preferência tais como hibridação em 50 % de formamida/6XSSC/0,1 % de SDS/100 ng/ml de ssDNA nas quais as temperaturas para hibridação estão acima de 37 graus C e as temperaturas para lavagem em 0,1XSSC/0,1 % de SDS estão acima de 55 graus C.

As frases "isolado" ou "biologicamente puro" referem-se ao material o qual é substancial ou essencialmente isento de componentes os quais normalmente acompanham o material conforme encontrado em seu estado nativo. Assim, péptidos isolados de acordo com a invenção, de preferência não contêm materiais normalmente associados aos péptidos em seu ambiente *in situ*. Por exemplo, um polinucleótido é

mencionado como sendo "isolado" quando ele é substancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que correspondem ou são complementares a outros genes que não os genes PSCA ou que codificam outros polipéptidos que não um produto do gene PSCA ou fragmentos do mesmo. Os peritos na especialidade podem utilizar prontamente procedimentos de isolamento de ácido nucleico para se obter um polinucleótido isolado de PSCA. Uma proteína é mencionada como sendo "isolada," por exemplo, quando métodos físicos, mecânicos ou químicos são utilizados para remover as proteínas de PSCA de constituintes celulares que estão normalmente associados à proteína. Os peritos podem utilizar prontamente métodos padrão de purificação para obter uma proteína de PSCA isolada. Alternativamente, uma proteína isolada pode ser preparada através de meios químicos.

O termo "mamífero" refere-se a qualquer organismo classificado como um mamífero, incluindo ratinhos, ratos, coelhos, cães, gatos, vacas, cavalos e seres humanos. Numa forma de realização da invenção, o mamífero é um ratinho. Em outra forma de realização da invenção, o mamífero é um ser humano.

Os termos "cancro de próstata metastático" e "doença metastática" significam cancros de próstata que se disseminaram para gânglios regionais ou a locais distantes e destinam-se a incluir doença no estágio D sob o sistema AUA e no estágio TxNxM+ sob o sistema TNM. Conforme é o caso com cancro de próstata localmente avançado, cirurgia geralmente não é indicada para pacientes com doença metastática e terapêutica hormonal (ablação de androgénio) é uma forma de realização de tratamento preferida. Pacientes com cancro de próstata metastático eventualmente desenvolvem um estado resistente a androgénio dentro de 12 a 18 meses de início de tratamento. Aproximadamente metade desses pacientes resistentes a androgénio morre dentro de 6

meses após desenvolver esse estado. O local mais comum para metástase do cancro de próstata é o osso. Metástases ósseas de cancro de próstata são frequentemente osteoblásticas ao invés de osteolíticas (isto é, resultando em formação líquida de osso). Metástases ósseas são encontradas mais frequentemente na espinha, seguido pelo fémur, pélvis, caixa torácica, crânio e úmero. Outros locais comuns para metástase incluem gânglios, pulmão, fígado e cérebro. O cancro de próstata metastático é, tipicamente, diagnosticado através de linfadenectomia pélvica laparoscópica ou aberta, explorações por radionuclídeo do corpo todo, radiografia do esqueleto e/ou biopsia de lesão óssea.

O termo "modulador" ou "composto de teste" ou "candidato a fármaco" ou equivalentes gramaticais, como é utilizado no presente documento, descrevem qualquer molécula, por exemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgânica pequena, polissacarídeo, polinucleótidos, etc., a ser testado com relação à capacidade de alterar, directa ou indirectamente, o fenótipo do cancro ou a expressão de uma sequência de cancro, por exemplo, uma sequência de ácido nucleico ou proteína, ou afectar uma sequência de cancro (por exemplo, sinalização de expressão do gene, interacção de proteína, etc.). Num aspecto, um modulador neutralizará o efeito de uma proteína de cancro da invenção. Por "neutralizar" entenda-se que a actividade de uma proteína é inibida ou bloqueada, junto com o consequente efeito sobre a célula. Em outro aspecto, um modulador neutralizará o efeito de um gene e sua proteína correspondente da invenção através de normalização dos níveis da referida proteína. Em formas de realização preferidas, moduladores alteram os perfis de expressão, ou perfil de expressão de ácidos nucleicos ou proteínas proporcionadas no presente documento, ou vias efectoras a jusante. Numa forma de realização, o modulador suprime um fenótipo de cancro, por

exemplo, a uma característica de um tecido normal. Em outra forma de realização, um modulador induziu a um fenótipo de cancro. Geralmente, uma pluralidade de misturas de ensaio é passada em paralelo com diferentes concentrações de agentes para se obter uma resposta diferencial às várias concentrações. Tipicamente, uma dessas concentrações serve como um controlo negativo, isto é, numa concentração zero ou abaixo do nível de detecção.

Moduladores, candidatos à fármaco ou compostos de teste abrangem numerosas classes químicas, embora, tipicamente, eles sejam moléculas orgânicas, de preferência pequenos compostos orgânicos, tendo um peso molecular de mais do que 100 e menos do que cerca de 2.500 Daltons. Pequenas moléculas preferidas têm menos do que 2000 ou menos do que 1500 ou menos do que 1000 ou menos do que 500 D. Agentes candidatos compreendem grupos funcionais necessários para interação estrutural com proteínas, particularmente ligação a hidrogénio e incluem, tipicamente, pelo menos um grupo amina, carbonilo, hidroxilo ou carboxilo, de preferência pelo menos dois dos grupos químicos funcionais. Os agentes candidatos frequentemente compreendem estruturas cíclicas ou heterocíclicas de carbono e/ou estruturas aromáticas ou poliaromáticas substituídas por um ou mais dos grupos funcionais acima. Moduladores também compreendem biomoléculas, tais como péptidos, sacarídeos, ácidos graxos, esteróides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estruturais ou combinações dos mesmos. Particularmente preferidos são péptidos. Uma classe de moduladores são péptidos, por exemplo, de cerca de cinco a cerca de 35 aminoácidos, com de cerca de cinco a cerca de 20 aminoácidos sendo preferido e de cerca de 7 a cerca de 15 sendo particularmente preferido. De preferência, a proteína modulatória de cancro é solúvel, inclui uma região não transmembranar e/ou tem uma Cys N-terminal para

auxiliar na solubilidade. Numa forma de realização, o C-término do fragmento é mantido como um ácido livre e o N-término é uma amina livre para auxiliar no acoplamento, isto é, à cisteína. Numa forma de realização, uma proteína de cancro da invenção é conjugada a um agente imunogénico, como é discutido no presente documento. Numa forma de realização, a proteína de cancro é conjugada a BSA. Os péptidos da invenção, por exemplo, de comprimentos preferidos, podem ser ligados uns aos outros ou a outros aminoácidos para criar um péptido/proteína mais longo. Os péptidos modulatórios podem ser digestões de proteínas que ocorrem naturalmente, conforme é esboçado acima, péptidos aleatórios ou péptidos aleatórios "desviados". Numa forma de realização preferida, moduladores baseados em péptido/proteína são anticorpos e fragmentos dos mesmos, como é definido no presente documento.

Moduladores de cancro também podem ser ácidos nucleicos. Agentes de modulação de ácido nucleico podem ser ácidos nucleicos que ocorrem naturalmente, ácidos nucleicos aleatórios ou ácidos nucleicos aleatórios "desviados". Por exemplo, digestões de genomas procariotas ou eucariotas podem ser usadas numa abordagem análoga àquela esboçada acima para proteínas.

O termo "anticorpo monoclonal" refere-se a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogénea, isto é, os anticorpos que compreendem a população são idênticos, excepto quanto a possíveis mutações que ocorrem naturalmente que estão presentes em quantidades mínimas.

Um "motivo", conforme em motivo biológico de uma proteína relacionada com PSCA, refere-se a qualquer padrão de aminoácidos que forma parte da sequência primária de uma proteína, que está associada a uma função em particular (por exemplo, interacção proteína-proteína, interacção proteína-ADN, etc.) ou modificação (por exemplo, que é

fosforilada, glicosilada ou amidada) ou localização (por exemplo, sequência secretora, sequência de localização nuclear, etc.) ou uma sequência que é correlacionada por ser imunogénica, quer humor ou celularmente. Um motivo pode ser contínuo ou capaz de ser alinhado a determinadas posições que são, geralmente, correlacionadas com uma determinada função ou propriedade. No contexto da motivos de HLA, "motivo" refere-se a um padrão de resíduos num péptido de comprimento definido, usualmente um péptido de cerca de 8 a cerca de 13 aminoácidos para um motivo de HLA da classe I e de cerca de 6 a cerca de 25 aminoácidos para um motivo de HLA da classe II, o qual é reconhecido por uma molécula de HLA em particular. Motivos de péptido para ligação de HLA são, tipicamente, diferentes para cada proteína codificada por cada alelo de HLA humano e diferem quanto ao padrão de resíduos âncora primários e secundários.

Um "excipiente farmacêutico" compreende um material, tal como um adjuvante, um veículo, agentes para ajuste de pH e tamponamento, agentes molhantes, conservantes e similares.

"Farmaceuticamente aceitável" refere-se a uma composição não tóxica e/ou inerte que é fisiologicamente compatível com seres humanos ou outros mamíferos.

O termo "polinucleótido" significa uma forma polimérica de nucleótidos de pelo menos 10 bases ou pares de base de comprimento, quer ribonucleótidos ou desoxinucleótidos, ou uma forma modificada de qual quer tipo de nucleótido e destina-se a incluir formas em cadeias simples e duplas de ADN e/ou ARN. Na técnica, esse termo é frequentemente usado intercambiavelmente com "oligonucleótidos". Um polinucleótido pode compreender uma sequência de nucleótidos descrita no presente documento em que timidina (T), como é mostrado, por exemplo, na Figura 2, pode também ser uracilo (U); essa definição refere-se às

diferenças entre as estruturas químicas de ADN e ARN, em particular a observação de que uma das quatro bases principais no ARN é uracilo (U) ao invés de timidina (T).

O termo "polipéptido" significa um polímero de pelo menos cerca de 4, 5, 6, 7 ou 8 aminoácidos. Ao longo da memória descritiva, designações padrão de três letras ou uma única letra para os aminoácidos são usadas. Na técnica, esse termo é frequentemente usado intercambiavelmente com "péptido" ou "proteína".

Um "resíduo âncora primário" de HLA é um aminoácido numa posição específica ao longo de uma sequência de péptido o qual é compreendido como proporcionando um ponto de contacto entre o péptido imunogénico e a molécula de HLA. Um a três, usualmente dois, resíduos âncora primários dentro de um péptido de comprimento definido geralmente definem um "motivo" para um péptido imunogénico. Esses resíduos são compreendidos como se adaptando em contacto íntimo com a ranhura de ligação peptídica de uma molécula de HLA, com suas cadeias laterais alojadas em bolsas específicas da ranhura de ligação. Numa forma de realização, por exemplo, os resíduos âncora primários para uma molécula da classe I de HLA estão localizados na posição 2 (a partir da posição amino terminal) e na posição carboxilo-terminal de um epítipo de péptido com 8, 9, 10, 11 ou 12 resíduos de acordo com a invenção. Alternativamente, em outra forma de realização, os resíduos âncora primários de um péptido que se ligam a uma molécula da classe II do HLA são espaçados com relação uns aos outros, ao invés de ao término de um péptido, onde o péptido tem geralmente pelo menos 9 aminoácidos de comprimento. Por exemplo, péptidos análogos podem ser criados através de alteração da presença ou ausência de resíduos em particular nas posições âncora primárias e/ou secundárias. Tais análogos são usados para modular a afinidade de ligação e/ou abrangência de população de um

péptido que compreende um motivo ou supermotivo de HLA em particular.

"Radioisótopos" incluem, mas não estão limitados, aos seguintes (utilizações exemplificativas não limitativas também são apresentadas):

****Exemplos de Isótopos Médicos:**

Isótopo	Descrição de uso
Actínio-225 (Ac-225)	Veja-se Tório-229 (Th-229)
Actínio-227 (Ac-227)	Precursor de Rádio-223 (Ra-223) o qual é um alfa emissor usado para tratar metástases no esqueleto resultantes de cancro (isto é, cancros de mama e de próstata) e radioimunoterapia de cancro
Bismuto-212 (Bi-212)	Veja-se Tório-228 (Th-228)
Bismuto-213 (Bi-213)	Veja-se Tório-229 (Th-229)
Cádmio-109 (Cd-109)	Detecção de cancro
Cobalto-60 (Co-60)	Fonte de radiação para radioterapia de cancro, para irradiadores de alimentos e para esterilização de suprimentos médicos
Cobre-64 (Cu-64)	Um emissor de positrão usado para terapêutica de cancro e formação de imagem SPECT.
Cobre-67 (Cu-67)	Beta/gama emissor usado em radioimunoterapia de cancro e estudos diagnósticos (isto é, cancros de mama e cólon e linfoma)
Disprósio-166 (Dy-166)	Radioimunoterapia de cancro
Érbio-169 (Er-169)	Tratamento de artrite reumatóide, particularmente para as pequenas articulações associadas aos dedos dos pés e mãos
Európio-152 (Eu-152)	Fonte de radiação para irradiação de alimentos e para a esterilização de suprimentos médicos
Európio-154 (Eu-154)	Fonte de radiação para irradiação de alimentos e para a esterilização de suprimentos médicos

- Gadolinio-153 (Gd-153) Detecção de osteoporose e dispositivos para assegurar qualidade médica nuclear
- Ouro-198 (Au-198) Implante e terapêutica intracavidade de cancros ovariano, de próstata e de cérebro
- Hólmio-166 (Ho-166) Tratamento de mieloma múltiplo em terapêutica direccionada ao esqueleto, radioimunoterapia de cancro, ablação da medula óssea e tratamento de artrite reumatóide
- Iodo-125 (I-125) (I-Detecção de osteoporose, formação de imagem diagnóstica, fármacos traçadores, tratamento de cancro do cérebro, radiomarcagem, formação de imagem de tumor, mapeamento de receptores no cérebro, terapêutica intersticial por radiação, braquiterapia para o tratamento de cancro de próstata, determinação da taxa de filtração glomerular (GFR), determinação do volume de plasma, detecção de trombose de veias profundas das pernas)
- Iodo-131 (I-131) (I-Avaliação de função da tiróide, detecção de doença da tiróide, tratamento de cancro da tiróide, bem como outras doenças da tiróide não-malignas (isto é, doença de Grave, bócio e hipertiroidismo), tratamento de leucemia, linfoma e outras formas de cancro (por exemplo, cancro de mama) usando radioimunoterapia)
- Irídio-192 (Ir-192) Braquiterapia, tratamento de tumores no cérebro e coluna espinal, tratamento de artérias bloqueadas (isto é, aterosclerose e reestenose) e implantes para tumores de mama e próstata
- Lutécio-177 (Lu-177) Radioimunoterapia de cancro e tratamento de artérias bloqueadas (isto é, aterosclerose e reestenose)
- Molibdénio-99 (Mo-99) Parente de Tecnécio-99m (Tc-99m) o qual é usado para formação de imagem do cérebro, fígado, pulmão, coração e outros órgãos. Actualmente, o Tc-99m é o radioisótopo mais amplamente usado para formação de imagem diagnóstica de vários cancros e doenças envolvendo o cérebro, coração, fígado, pulmão; também usadas em detecção de trombose de veias profundas das pernas.

Ósmio-194 (Os-194)	Radioimunoterapia de cancro
Paládio-103 (Pd-103)	Tratamento de cancro de próstata
Platina-195m (Pt-195m)	Estudos de biodistribuição e metabolismo de cisplatina, um fármaco quimioterápico
Fósforo-32 (P-32)	Tratamento de policitemia rubra vera (doença de células sanguíneas) e leucemia, diagnóstico/tratamento de cancro ósseo; tratamento de cancro de cólon, pancreático e de fígado; radiomarcção de ácidos nucleicos para pesquisa <i>in vitro</i> , diagnóstico de tumores superficiais, tratamento de artérias bloqueadas (isto é, aterosclerose e reestenose) e terapêutica intracavidade
Fósforo-33 (P-33)	Tratamento de leucemia, diagnóstico/tratamento de doença óssea, radiomarcção e tratamento de artérias bloqueadas (isto é, aterosclerose e reestenose)
Rádio-223 (Ra-223)	Veja-se Actínio-227 (Ac-227)
Rênio-186 (Re-186)	Alívio da dor em cancro ósseo, tratamento de artrite reumatóide e diagnóstico e tratamento de linfoma e cancros ósseo, de mama, cólon e fígado usando radioimunoterapia
Rênio-188 (Re-188)	Diagnóstico e tratamento de cancro usando radioimunoterapia, alívio da dor em cancro ósseo, tratamento de artrite reumatóide e tratamento de cancro de próstata
Ródio-105 (Rh-105)	Radioimunoterapia de cancro
Samário-145 (Sm-145)	Tratamento de cancro ocular
Samário-153 (Sm-153)	Radioimunoterapia de cancro e alívio da dor em cancro ósseo
Escândio-47 (Sc-47)	Radioimunoterapia de cancro e alívio da dor em cancro ósseo

- Selênio-75 Radio-traçador usado em estudos do cérebro, formação de
(Se-75) imagem do córtex adrenal através de gama-cintigrafia, localizações laterais de tumores que secretam esteróide, exploração pancreática, detecção de glândulas paratireóides hiperactivas, taxa de medida de perda de ácido biliar do reservatório endógeno
- Estrôncio-85 Detecção de cancro ósseo e explorações do cérebro
(Sr-85)
- Estrôncio-89 Alívio da dor de cancro ósseo, tratamento de mieloma
(Sr-89) múltiplo e terapêutica osteoblástica
- Tecnécio-99m Veja-se Molibdênio-99 (Mo-99)
(Tc-99m)
- Tório-228 Precursor de Bismuto-212 (Bi-212) o qual é um alfa emissor
(Th-228) usado para radioimunoterapia de cancro
- Tório-229 Precursor de Actínio-225 (Ac-225) e precursor de precursor
(Th-229) de Bismuto-213 (Bi-213) os quais são alfa emissores usados em radioimunoterapia de cancro
- Túlio-170 Fonte gama para fonte de energia de irradiadores de sangue
(Tm-170) para dispositivos médicos implantados
- Estanho-117m Imunoterapia de cancro e alívio da dor de cancro ósseo
(Sn-117m)
- Tungstênio- Precursor de Rênio-188 (Re-188) o qual é usado para
188 (W-188) diagnóstico/tratamento de cancro, alívio da dor de cancro ósseo, tratamento de artrite reumatóide e tratamento de artérias bloqueadas (isto é, aterosclerose e reestenose)
- Xenônio-127 Neuroformação de imagens de distúrbios no cérebro, estudos
(Xe-127) por SPECT em alta resolução, testes de função pulmonar e estudos de fluxo sanguíneo cerebral
- Itérbio-175 Radioimunoterapia de cancro
(Yb-175)
- Ítrio-90 (Y-Microsementes obtidas a partir de irradiação de Ítrio-89
90) (Y-89) para tratamento de cancro do fígado

Ítrio-91 (Y-91) (Y-91) Um marcador de gama-emissão para Ítrio-90 (Y-90) o qual é usado para radioimunoterapia de cancro (isto é, linfoma, cancros inoperáveis de mama, cólon, rim, pulmão, ovariano, próstata, pancreático e de fígado)

Por "aleatório" ou equivalentes gramaticais, conforme aplicado no presente documento a ácidos nucleicos e proteínas, entenda-se que cada ácido nucleico e péptido consiste essencialmente em nucleótidos e aminoácidos aleatórios, respectivamente. Esses péptidos aleatórios (ou ácidos nucleicos, discutidos no presente documento) podem incorporar quaisquer nucleótidos ou aminoácidos em qualquer posição. O processo sintético pode ser projectado para gerar proteínas ou ácidos nucleicos aleatórios, para permitir a formação de todas ou a maioria das combinações possíveis sobre a extensão de uma sequência, assim, formando uma biblioteca de agentes proteicos bioactivos candidatos aleatórios.

Numa forma de realização, uma biblioteca é "totalmente aleatória", sem nenhuma preferência ou constante de sequência em qualquer posição. Em outra forma de realização, a biblioteca é uma biblioteca "com tendência aleatória". Isto é, algumas posições dentro de uma sequência são mantidas constantes ou são seleccionadas a partir de um número limitado de possibilidades. Por exemplo, os nucleótidos ou resíduos de aminoácidos são aleatórios dentro de uma classe definida, por exemplo, de aminoácidos hidrofóbicos, resíduos hidrofílicos, resíduos com tendência estérica (pequenos ou grandes), com relação à criação de domínios de ligação de ácido nucleico, a criação de cisternas, para ligação cruzada, prolinas para domínios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas ou histidinas para locais de fosforilação, etc. ou purinas, etc.

Uma molécula de ADN ou ARN "recombinante" é uma molécula de ADN ou ARN que foi submetida à manipulação molecular *in vitro*.

Exemplos não limitativos de molécula pequenas incluem compostos que se ligam ou interagem com PSCA, ligantes incluindo hormonas, neuropéptidos, quimiocinas, odorantes, fosfolípidos e equivalentes funcionais dos mesmos que se ligam e, de preferência, inibem a função da proteína de PSCA. Tais moléculas pequenas não limitativas têm, de preferência, um peso molecular de menos do que cerca de 10 kDa, mais preferivelmente abaixo de cerca de 9, cerca de 8, cerca de 7, cerca de 6, cerca de 5 ou cerca de 4 kDa. Em determinados formas de realização, moléculas pequenas se associam fisicamente com, ou se ligam, à proteína de PSCA; não são encontradas ocorrendo naturalmente em vias metabólicas; e/ou são mais solúveis em soluções aquosas do que em não aquosas.

A "restringência" de reacções de hibridação é prontamente determinável pelos peritos na especialidade e geralmente é um cálculo empírico, dependendo da extensão da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. Em geral, sondas mais longas requerem maiores temperaturas para hibridação apropriada, enquanto que sondas mais curtas precisam de temperaturas menores. A hibridação geralmente depende da capacidade das sequências de ácido nucleico desnaturadas de se rehibridarem quando filamentos complementares estão presentes num ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência hibridável, maior a temperatura relativa que pode ser usada. Como resultado, segue que maiores temperaturas relativas tenderão a tornar as condições de reacção mais restritivas, enquanto que temperaturas menores o farão menos. Para detalhes e explicação adicional sobre restringência de reacções de hibridação veja-se Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condições restritivas" ou "condições de elevada restringência", como é definido no presente documento, são

identificadas por, mas não limitado, àquelas que: (1) utilizam uma baixa resistência iônica e elevada temperatura para lavagem, por exemplo, cloreto de sódio a 0,015M/citrato de sódio a 0,0015M/0,1 % de dodecil sulfato de sódio a 50 °C; (2) utilizam, durante hibridação, um agente de desnaturação, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50 % (v/v) com 0,1 % albumina de soro bovino/0,1 % de Ficoll/0,1 % de polivinilpirrolidona/tampão de fosfato de sódio a 50 mM num pH de 6,5 com cloreto de sódio a 750 mM, citrato de sódio a 75 mM a 42 °C; ou (3) utilizam formamida a 50 %, 5 x SSC (NaCl a 0,75 M, citrato de sódio a 0,075 M), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1 %, 5 x solução de Denhardt, ADN de esperma de salmão submetido a ultra-sons (50 µg/ml), 0,1 % de SDS e 10 % de sulfato de dextrano a 42 °C, com lavagens a 42°C em 0,2 x SSC (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50 % a 55 °C, seguido por uma lavagem em elevada restringência consistindo em 0,1 x SSC contendo EDTA a 55 °C. "Condições moderadamente restritivas" são descritas por, mas não limitadas, àquelas em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (por exemplo, temperatura, resistência iônica e % de SDS) menos restritivas do que aquelas descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente restritivas é incubação durante a noite a 37°C numa solução que compreende: formamida a 20 %, 5 x SSC (NaCl a 150 mM, citrato de trissódico a 15 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 7,6), 5 x solução de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano e 20 mg/mL de ADN de esperma de salmão desnaturado cortado, seguido por lavagem dos filtros em 1 x SSC em torno de 37-50°C. Os peritos na especialidade reconhecerão como ajustar a temperatura, resistência iônica, etc., conforme necessário, para

acomodar factores tais como a extensão da sonda e similares.

Como é utilizado no presente documento, "tratar" ou "terapêutico" e termos gramaticalmente relacionados, referem-se a qualquer melhora de qualquer consequência de uma doença, tal como sobrevivência prolongada, menos morbidez e/ou uma diminuição dos efeitos colaterais os quais são os subprodutos de uma forma de realização terapêutica alternativa; erradicação total da doença não é requerida.

Um "animal transgênico" (por exemplo, um ratinho ou rato) é um animal que tem células que contêm um transgene, transgene o qual foi introduzido no animal ou um ancestral do animal no estágio pré-natal, por exemplo, embriónico. Um "transgene" é um ADN que é integrado no genoma de uma célula a partir da qual um animal transgênico se desenvolve.

Como é utilizado no presente documento, uma "vacina" para resposta imune celular ou de HLA é uma composição que contém ou codifica um ou mais péptidos da invenção. Existem numerosas formas de realização de tais vacinas, tais como um coquetel de um ou mais péptidos individuais; um ou mais péptidos da invenção compreendidos por um péptido poliepitópico; ou ácidos nucleicos que codificam tais péptidos ou polipéptidos individuais, por exemplo, um minigene que codifica um péptido poliepitópico. O "um ou mais péptidos" pode incluir qualquer unidade inteira de 1-150 ou mais, por exemplo, pelo menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 1035, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 ou 150 ou mais péptidos da invenção. Os péptidos ou polipéptidos podem, opcionalmente, ser modificados, tal como através lipidação, adição de

sequências de endereçamento ou outras. Os péptidos de classe I de HLA da invenção podem estar misturados com, ou ligados a péptidos da classe II de HLA, para facilitar a activação de linfócitos T citotóxicos e linfócitos T auxiliares. Vacinas de HLA podem compreender também células que apresentam antigénio péptido-pulsadas, por exemplo, células dendríticas.

O termo "variante" refere-se a uma molécula que exhibe uma variação com relação a um tipo ou norma descrita, tal como uma proteína que tem um ou mais resíduos de aminoácidos diferentes na(s) posição(ões) correspondente(s) de uma proteína especificamente descrita (por exemplo, a proteína de PSCA mostrada na Figura 2 ou Figura 3). Um análogo é um exemplo de uma proteína variante. Isoformas splice e polimorfismos simples de nucleótido (SNPs) são outros exemplos de variantes.

As "proteínas relacionadas com PSCA" da invenção incluem aquelas especificamente identificadas no presente documento, bem como variantes alélicas, variantes com substituição conservativa, análogos e homólogos que podem ser isolados/gerados e caracterizados sem experimentação indevida seguindo os métodos esboçados no presente documento ou prontamente disponíveis na técnica. Proteínas de fusão que combinam partes de diferentes proteínas de PSCA ou fragmentos das mesmas, bem como proteínas de fusão de uma proteína de PSCA e um polipéptido heterólogo também estão incluídas. Tais proteínas de PSCA são colectivamente referidas como as proteínas relacionadas com PSCA, as proteínas da invenção ou PSCA. O termo "proteína relacionada com PSCA" refere-se a um fragmento de polipéptido ou uma sequência de proteína de PSCA de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 ou mais de 25 aminoácidos; ou pelo menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165,

170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500, 525, 550, 575 ou 576 ou mais aminoácidos.

Polinucleótidos de PSCA

Como foi indicado anteriormente no presente documento, os polinucleótidos de PSCA de interesse em relação com a presente invenção são o grupo que consiste em

- (a) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993;
- (b) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 521 é T;
- (c) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 578 é C;
- (d) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 649 é G;
- (e) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 653 é T;
- (f) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 721 é A;
- (g) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 781 é A;
- (h) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 788 é G;
- (i) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 989 é A;

e

(j) um polinucleótido completamente complementar a um polinucleótido de qualquer um de (a) a (i);

Estes correspondem-se com a variante de transcrito PSCA v.4 (veja-se Figura 2D), variantes de nucleótidos simples das mesmas como é identificado na Figura 2H e os complementos da mesma.

O gene de PSCA humano é mapeado pelo local cromossômico apresentado no Exemplo intitulado "Mapeamento Cromossômico de PSCA". Por exemplo, em virtude do fato do gene de PSCA mapear esse cromossoma, polinucleótidos que codificam diferentes regiões das proteínas de PSCA são usados para caracterizar anormalidades citogenéticas desse local cromossômico, tais como anormalidades que são identificadas como estando associadas a vários câncros. Em determinados genes, uma variedade de anormalidades cromossômicas, incluindo rearranjos, foi identificada como anormalidades citogenéticas frequentes numa série de diferentes câncros (veja-se, por exemplo, *Krajinovic et al.*, *Mutat. Res.* 382 (3-4): 81-83 (1998); *Johansson et al.*, *Blood* 86 (10): 3905-3914 (1995) e *Finger et al.*, *P.N.A.S.* 85 (23): 9158-9162 (1988)). Assim, polinucleótidos que codificam regiões específicas da proteínas de PSCA proporcionam novas ferramentas que podem ser usadas para delinear, com maior precisão do que anteriormente possível, anormalidades citogenéticas na região cromossômica que codifica PSCA que pode contribuir para o fenótipo maligno. Nesse contexto, esses polinucleótidos satisfazem uma necessidade na técnica por expansão da sensibilidade de rastreamento cromossômico de forma a identificar anormalidades cromossômicas mais subtis e menos comuns (veja-se, por exemplo, *Evans et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol* 171 (4): 1055- 1057(1994)).

Como é observado anteriormente, uma vez que foi mostrado que o PSCA é altamente expresso em cancro de próstata e outros câncros, os polinucleótidos de PSCA são

usados em métodos para avaliar o estado de produtos do gene de PSCA em tecidos normais versus cancerígenos. Tipicamente, polinucleótidos que codificam regiões específicas da proteínas de PSCA são usados para avaliar a presença de perturbações (tais como deleções, inserções, mutações por pontos ou alterações resultando numa perda de um antigénio, etc.) em regiões específicas do gene de PSCA, tais como regiões contendo um ou mais motivos. Ensaio exemplificativo incluem ensaios de RT-PCR, bem como análise de polimorfismo de conformação em cadeia simples (SSCP) (veja-se, por exemplo, Marrogi *et al.*, *J. Cutan. Pathol.* 26 (8): 369-378 (1999), ambos os quais utilizam polinucleótidos que codificam regiões específicas de uma proteína para examinar essas regiões dentro da proteína.

Iniciadores e Pares de iniciadores

Iniciadores e pares de iniciadores podem ser usados para amplificar polinucleótidos para a detecção de acordo com a invenção. Sondas para tal detecção podem ser marcadas com um marcador detectável, tal como, por exemplo, um radioisótopo, composto fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelante de metal ou enzima. Tais sondas e iniciadores são usados para detectar a presença de um polinucleótido de PSCA numa amostra e como um meio para detectar uma célula que expressa uma proteína de PSCA.

Exemplos de tais sondas incluem polipéptidos que compreendem toda ou parte da sequência de ADNc de PSCA humana mostrada na Figura 2. Exemplos de pares de iniciadores capazes de amplificar especificamente ARNm de PSCA são também descritos nos Exemplos. Como será entendido pelos peritos na especialidade, muitos iniciadores e sondas diferentes podem ser preparados com base nas sequências proporcionadas no presente documento e usados eficazmente para amplificar e/ou detectar um ARNm de PSCA.

Isolamento de Moléculas de Ácido Nucleico que Codificam PSCA

As sequências de ADNc de PSCA como foi descrito no presente documento permite o isolamento de outros polinucleótidos que codificam produto(s) do gene de PSCA, bem como o isolamento de polinucleótidos que codificam homólogos do produto do gene de PSCA, alternativamente isoformas splice, variantes alélicas e formas mutantes de um produto do gene de PSCA, bem como polinucleótidos que codificam análogos de proteínas relacionadas com PSCA. Vários métodos de clonagem molecular que podem ser utilizados para isolar ADNc de comprimento total que codificam um gene de PSCA são bem conhecidos (veja-se, por exemplo, Sambrook, J. *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2^a edição, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, Eds., Wiley e Sons, 1995). Por exemplo, metodologias de clonagem com o fago lambda podem ser convenientemente utilizadas, usando sistemas de clonagem comercialmente disponíveis (por exemplo, Lambda ZAP Express, Stratagene). Clones de fago que contêm ADNc do gene de PSCA podem ser identificados através por meio da sondagem com um ADNc de PSCA marcado ou um fragmento do mesmo. Por exemplo, numa forma de realização, um ADNc de PSCA (por exemplo, Figura 2) ou uma porção do mesmo pode ser sintetizado e usado como uma sonda para recuperar ADNc de sobreposição e de comprimento correspondendo a um gene de PSCA. Um gene de PSCA em si pode ser isolado por meio de rastreamento de bibliotecas genômicas de ADN, bibliotecas de cromossoma bacteriano artificial (BAC), bibliotecas de cromossoma de levedura artificial (YAC) e similares, com sondas ou iniciadores de ADN de PSCA.

Proteínas relacionadas com PSCA

Como foi indicado anteriormente no presente documento, as proteínas relacionadas com PSCA de interesse em relação

com a presente invenção são o grupo representado pelas sequências de SEQ ID NO: 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 e 28 (veja-se Figura 3C e Figuras 3E e 3L).

Podem ser geradas proteínas relacionadas com PSCA usando tecnologia de síntese peptídica convencional ou usando métodos de clivagem química bem conhecidos na especialidade. Como alternativa, podem ser usados métodos recombinantes para gerar moléculas de ácido nucleico que codificam uma proteína relacionada com PSCA.

Uma variedade de referências reflecte a técnica com relação à identificação e geração de epítomos numa proteína de interesse. Veja-se, por exemplo, o documento WO 97/33602 para 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; e 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); 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 e Alexander *et al.*, *Immunol. Res.* 1998 18(2): 79-92.

Utilizações de Proteínas relacionadas com PSCA

Uma vez que o PSCA é altamente expresso em cancro de próstata e outros cancros, proteínas relacionadas com PSCA são usadas, como indicado acima, em métodos que avaliam o estado de produtos do gene de PSCA em tecidos normais versus cancerígenos, desse modo, elucidando o fenótipo maligno. Tipicamente, polipéptidos de regiões específicas de uma proteína de PSCA são usados para avaliar a presença de perturbações (tais como deleções, inserções, mutações

por pontos, etc.) nessas regiões (tais como regiões que contêm um ou mais motivos). Ensaio exemplificativo utiliza anticorpos.

Fragmentos/subsequências de proteína de PSCA são particularmente úteis na geração e caracterização de anticorpos específicos ao domínio (por exemplo, anticorpos que reconhecem um epítipo extracelular ou intracelular de uma proteína de PSCA), para a identificação de agentes ou factores celulares que se ligam ao PSCA ou um domínio estrutural em particular do mesmo e em vários contextos terapêuticos e diagnósticos incluindo, mas não limitado, a ensaios diagnósticos, vacinas contra o cancro e métodos de preparação de tais vacinas.

As proteínas codificadas pelos genes de PSCA ou por análogos, homólogos ou fragmentos dos mesmos, têm uma variedade de utilizações incluindo, mas não limitado a, geração de anticorpos e em métodos para identificar ligandos e outros agentes e constituintes celulares que se ligam a um produto do gene de PSCA. Anticorpos estimulados contra uma proteína de PSCA ou fragmento da mesma são úteis em ensaios diagnósticos e prognósticos e metodologias de formação de imagem na gestão de cancros humanos caracterizados pela expressão da proteína de PSCA, tais como aqueles listados no Quadro I. Tais anticorpos podem ser expressos intracelularmente e usados em métodos de tratamento de pacientes com tais cancros. Ácidos nucleicos ou proteínas relacionadas com PSCA também são usados na geração de respostas de HLT ou CTL.

Vários ensaios imunológicos úteis para a detecção de proteínas de PSCA são usados incluindo, mas não limitado, a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes ligados a enzima (ELIFA), métodos imunocitoquímicos e similares. Anticorpos podem ser marcados e usados como reagentes de formação de imagem imunológica capazes de

detecção de células que expressam PSCA (por exemplo, em métodos de formação de imagem radiocintigráfica). Proteínas de PSCA também são particularmente úteis na geração de vacinas contra o cancro, como é descrito adicionalmente no presente documento.

Anticorpos contra o PSCA

Anticorpos de interesse em relação com a invenção ligam-se especificamente a PSCA v.4 de uma variante do mesmo como foi indicado acima e não se ligam (ou ligam-se fracamente) a péptidos ou proteínas que não são proteínas relacionadas com PSCA sob condições fisiológicas. Nesse contexto, exemplos de condições fisiológicas incluem: 1) solução salina tamponada com fosfato; 2) solução salina Tris- tamponada contendo Tris a 25 mM e NaCl a 150 mM; ou solução salina normal (NaCl a 0,9 %); 4) soro animal, tal como soro humano; ou 5) uma combinação de qualquer um de 1) a 4); essas reacções ocorrendo, de preferência, num pH de 7,5, alternativamente numa faixa de pH de 7,0 a 8,0 ou, alternativamente, na faixa de pH de 6,5 a 8,5; também, essas reacções ocorrem numa temperatura entre 4 °C a 37 °C.

Os anticorpos contra o PSCA da invenção são particularmente úteis em ensaios diagnósticos e prognósticos do cancro (veja-se, por exemplo, Quadro I) e em metodologias de formação de imagem.

Os ensaios imunológicos de acordo com a invenção podem compreender um ou mais anticorpos contra o PSCA capazes de reconhecimento e ligação a uma proteína relacionada com PSCA, como for apropriado. Esses ensaios são realizados dentro de vários formatos de ensaio imunológico bem conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado, a vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes ligados a enzima (ELISA), ensaios imunofluorescentes enzima- ligados (ELIFA) e similares.

Além disso, métodos de formação de imagem imunológica capazes de detectar cancro de próstata e outros cancros que

expressam PSCA também são proporcionados pela invenção incluindo, mas não limitado, a métodos de formação de imagem radiocintigráfica usando anticorpos marcados contra o PSCA. Tais ensaios são clinicamente úteis na detecção, monitorização e prognóstico de cancros que expressam PSCA, tal como cancro de próstata.

Anticorpos contra o PSCA também são usados em métodos para a purificação de uma proteína relacionada com PSCA e para isolamento de homólogos de PSCA e moléculas relacionadas. Por exemplo, um método de purificação de uma proteína relacionada com PSCA compreende a incubação de um anticorpo contra o PSCA, o qual tenha sido acoplado a uma matriz sólida, com um lisado ou outra solução contendo uma proteína relacionada com PSCA sob condições que permitem que o anticorpo contra o PSCA se ligue à proteína relacionada com PSCA; lavagem da matriz sólida para eliminar impurezas; e eluição da proteína relacionada com PSCA do anticorpo acoplado. Outras utilizações de anticorpos contra o PSCA de acordo com a invenção incluem geração de anticorpos anti-idiotípicos que imitam uma proteína de PSCA.

Vários métodos para a preparação de anticorpos são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos podem ser preparados através de imunização de um hospedeiro mamífero adequado usando uma proteína relacionada com PSCA, péptido ou fragmento, na forma isolada ou conjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, e Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Além disso, proteínas de fusão de PSCA também podem ser usadas, tal como uma proteína de fusão de PSCA-GST. Numa forma de realização em particular, uma proteína de fusão GST que compreende toda ou a maior parte da sequência de aminoácidos da Figura 2 ou Figura 3 é produzida, então, usada como um imunogénio para gerar anticorpos apropriados.

Em outra forma de realização, uma proteína relacionada com PSCA é sintetizada e usada como um imunogénio.

Além disso, métodos de imunização com ADN nu conhecidos na técnica são usados (com ou sem proteína relacionada com PSCA purificada ou células que expressam PSCA) para gerar uma resposta imune ao imunogénio codificado (para revisão veja-se Donnelly *et al.*, 1997, *Ann. Rev. Immunol.* 15: 617-648).

A sequência de aminoácidos de uma proteína de PSCA, como é mostrado na Figura 2 ou Figura 3, pode ser analisada para seleccionar regiões específicas da proteína de PSCA para geração de anticorpos. Por exemplo, análises de hidrofobicidade e hidrofiliicidade de uma sequência de aminoácidos de PSCA são usadas para identificar regiões hidrofílicas na estrutura do PSCA. Regiões de uma proteína de PSCA que mostram estrutura imunogénica, bem como outras regiões e domínios, podem ser prontamente identificados usando vários métodos conhecidos na técnica, tais como análises de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf. Perfis de hidrofiliicidade podem ser gerados usando o método de Hopp, T.P. e Woods, K.R., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 3824-3828. Perfis de hidropaticidade podem ser gerados usando o método de Kyte, J. e Doolittle, R.F., 1982, *J. Mol. Biol.* 157: 105-132. Perfis de Resíduos Acessíveis Percentuais (%) podem ser gerados usando o método de Janin J., 1979, *Nature* 277: 491-492. Perfis de Flexibilidade Média podem ser gerados usando os métodos de Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, *Int. J. Pept. Protein Res.* 32: 242-255. Perfis de Beta-volta podem ser gerados usando o método de Deleage, G., Roux B., 1987, *Protein Engineering* 1: 289-294. Assim, cada região identificada por qualquer um desses programas ou métodos está dentro do âmbito da presente invenção. Métodos para a geração de anticorpos contra o PSCA são ainda ilustrados por meio dos exemplos

proporcionados no presente documento. Métodos para a preparação de uma proteína ou polipéptido para utilização como um imunogénio são bem conhecidos na técnica. Também bem conhecidos na técnica são métodos para a preparação de conjugados imunogénicos de uma proteína com uma proteína de cancro, tal como BSA, KLH ou outra proteína veículo. Em alguns casos, conjugação directa usando, por exemplo, reagentes de carbodiimida, é usada; em outros casos, reagentes de ligação, tais como aqueles fornecidos pela Pierce Chemical Co., Rockford, IL, são eficazes. A administração de um imunogénio de PSCA é, frequentemente, conduzida através de injeção durante um período de tempo adequado e com a utilização de um adjuvante adequado, conforme é compreendido na técnica. Durante o esquema de imunização, as titulações de anticorpos podem ser tomadas para determinar a adequabilidade da formação de anticorpos.

Anticorpos monoclonais contra o PSCA podem ser produzidos através de vários meios bem conhecidos na técnica. Por exemplo, linhas de células imortalizadas que secretam um anticorpo monoclonal desejado são preparadas usando a tecnologia padrão de hibridoma de Kohler e Milstein ou modificações que imortalizam células B que produzem anticorpos, conforme é geralmente conhecido. Linhas de células imortalizadas que secretam os anticorpos desejados são seleccionadas através de imunoensaio no qual o antigénio é uma proteína relacionada com PSCA. Quando a cultura de células imortalizadas apropriadas é identificada, as células podem ser expandidas e anticorpos produzidos a partir de culturas *in vitro* ou de fluido de ascites.

Os anticorpos ou fragmentos da invenção também podem ser produzidos através de meios recombinantes. Regiões que se ligam especificamente às regiões desejadas de uma proteína de PSCA também podem ser produzidas no contexto de anticorpos quiméricos ou enxertados com uma região de

determinação de complementaridade (CDR) originários de múltiplas espécies. Anticorpos de PSCA humanizados ou humanos também podem ser produzidos e são preferidos para utilização em contextos terapêuticos. Métodos para a humanização de anticorpos de murino e outros não humanos através de substituição de uma ou mais das CDRs do anticorpo não humano por sequências de anticorpo humano correspondentes são bem conhecidos (veja-se, por exemplo, Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, *Nature* 332: 323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239: 1534-1536). Veja-se também Carter *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285 e Sims *et al.*, 1993, *J. Immunol.* 151: 2296.

Métodos para a produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos incluem métodos transgênicos e de apresentação de fago (para revisão veja-se Vaughan *et al.*, 1998, *Nature Biotechnology* 16: 535-539). Anticorpos monoclonais contra o PSCA totalmente humanos podem ser gerados usando tecnologias de clonagem utilizando grandes bibliotecas combinatórias de gene de Ig humana (isto é, apresentação de fago) (Griffiths e Hoogenboom, *Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries*. In: *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic e Therapeutic Applications in Man*, Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, páginas 45-64 (1993); Burton e Barbas, *Human Antibodies from combinatorial libraries*. *Id.*, páginas 65-82). Anticorpos monoclonais totalmente humanos também podem ser produzidos usando ratinhos transgênicos manipulados para conter o local do gene da imunoglobulina humana, conforme descrito no Pedido de Patente PCT W098/24893, Kucherlapati e Jakobovits *et al.*, publicado em 3 de Dezembro de 1997 (veja-se também Jakobovits, 1998, *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7(4): 607-614; Patentes U.S. 6.162.963 emitida em 19 de Dezembro de 2000; 6.150.584 emitida em 12 de Novembro de 2000; e 6.114.598

emitida em 5 de Setembro de 2000). Esse método evita a manipulação *in vitro* requerida com a tecnologia de apresentação de fago e produz eficazmente anticorpos humanos autênticos com elevada afinidade.

A reactividade de anticorpos contra o PSCA com uma proteína relacionada com PSCA pode ser estabelecida através de uma série de meios bem conhecidos, incluindo análises por Western blot, imunoprecipitação, ELISA e FACS usando, como for apropriado, proteínas relacionadas com PSCA, células que expressam PSCA ou extractos das mesmas. Um anticorpo contra o PSCA ou fragmento do mesmo pode ser marcado com um marcador detectável ou conjugado a uma segunda molécula. Marcadores detectáveis adequados incluem, mas não estão limitados, a um radioisótopo, um composto fluorescente, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um quelante de metal ou uma enzima. Ainda, anticorpos biespecíficos para dois ou mais epítomos de PSCA são gerados usando métodos geralmente conhecidos na técnica. Anticorpos homodiméricos também podem ser gerados através de técnicas de reticulação conhecidas na técnica (por exemplo, Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-2565).

Métodos para a Detecção de PSCA

O perfil de expressão do PSCA o torna um marcador diagnóstico para doença metastatizada. Consequentemente, o estado de produtos do gene de PSCA proporciona informação útil para a previsão de uma variedade de factores, incluindo susceptibilidade à doença em estágio avançado, taxa de progressão e/ou agressividade do tumor. Como foi discutido em detalhe no presente documento, o estado de produto do gene de PSCA em amostras do paciente pode ser analisado através de uma variedade de protocolos que são bem conhecidos na técnica, incluindo análise imunohistoquímica, a variedade de técnicas de Northern blotting, incluindo hibridação *in situ*, análise por RT-PCR (por exemplo, sobre amostras microdissecadas com captura a

laser), análise de Western blot e análise de arranjo de tecido.

Mais particularmente, a invenção proporciona ensaios para a detecção de polinucleótidos de PSCA numa amostra biológica, tais como soro, osso, próstata e outros tecidos, urina, sémen, preparações de células e similares. Polinucleótidos de PSCA detectáveis incluem, por exemplo, um gene de PSCA ou fragmento do mesmo, ARNm de PSCA, ARNm de PSCA variantes com união alternativas e moléculas de ADN ou ARN recombinantes que contêm um polinucleótido de PSCA. Uma série de métodos para amplificação e/ou detecção da presença de polinucleótidos de PSCA são bem conhecidos na técnica e podem ser utilizados na prática desse aspecto da invenção.

Numa forma de realização, um método para a detecção de um ARNm de PSCA numa amostra biológica compreende a produção de ADNc a partir da amostra através de transcrição invertida usando pelo menos um iniciador; amplificação do ADNc assim produzido usando um polinucleótido de PSCA como iniciadores de senso e antissenso para amplificar ADNc de PSCA nos mesmos; e detecção da presença do ADNc de PSCA amplificado. Opcionalmente, a sequência do ADNc de PSCA amplificado pode ser determinada.

Em outra forma de realização, um método de detecção de um gene de PSCA numa amostra biológica compreende primeiro isolamento do ADN genómico da amostra; amplificação do ADN genómico isolado usando polinucleótidos de PSCA como iniciadores de senso e antissenso; e detecção da presença do gene de PSCA amplificado. Qualquer variedade de combinações de sondas sense e antisense apropriada pode ser projectada a partir de uma sequência de nucleótidos de PSCA (veja-se, por exemplo, Figura 2) e usada para essa finalidade.

A invenção também proporciona ensaios para a detecção da presença de uma proteína de ADN num tecido ou outra

amostra biológica, tal como soro, sémen, osso, próstata, urina, preparações de células e similares. Métodos para a detecção de uma proteína relacionada com PSCA também são bem conhecidos e incluem, por exemplo, imunoprecipitação, análise imunohistoquímica, análise por Western blot, ensaios de ligação molecular, ELISA, ELIFA e similares. Por exemplo, um método de detecção da presença de uma proteína relacionada com PSCA numa amostra biológica compreende primeiro contacto da amostra com um anticorpo contra o PSCA, um fragmento reactivo a PSCA do mesmo ou uma proteína recombinante contendo uma região de ligação a antigénio de um anticorpo contra o PSCA; e, então, detecção da ligação da proteína relacionada com PSCA na amostra.

Métodos para a identificação de uma célula que expressa PSCA também estão dentro do âmbito da invenção. Numa forma de realização, um ensaio para a identificação de uma célula que expressa um gene de PSCA compreende a detecção da presença de ARNm de PSCA na célula. Métodos para a detecção de ARNm em células em particular são bem conhecidos e incluem, por exemplo, ensaios de hibridação usando sondas de ADN complementar (tal como hibridação *in situ* usando ribossondas marcadas, Northern blot e técnicas relacionadas) e vários ensaios de amplificação de ácido nucleico (tal como RT-PCR usando iniciadores complementares específicos para o PSCA e outros métodos de detecção do tipo amplificação tais como, por exemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA e similares). Alternativamente, um ensaio para identificação de uma célula que expressa um gene de PSCA compreende a detecção da presença de uma proteína relacionada com PSCA na célula ou secretada pela célula. Vários métodos para a detecção de proteínas são bem conhecidos na técnica e são utilizados para a detecção de proteínas relacionadas com PSCA e células que expressam proteínas relacionadas com PSCA.

Análise da expressão de PSCA também é útil como uma ferramenta para a identificação e avaliação de agentes que modulam a expressão de um gene de PSCA. Por exemplo, expressão de PSCA é regulada significativamente positivamente em cancro de próstata e é expressa em cancros dos tecidos listados no Quadro I. A identificação de uma molécula ou agente biológico que inibe a expressão ou sobre-expressão do PSCA em células cancerígenas é de valor terapêutico. Por exemplo, tal agente pode ser identificado através de utilização de uma rastreio que quantifica a expressão do PSCA através de RT-PCR, hibridação de ácido nucleico ou ligação de anticorpo.

Métodos para a monitorização do Estado de Genes Relacionados com PSCA e Seus Produtos

A oncogénese é conhecida por ser um processo com múltiplas etapas onde o desenvolvimento celular torna-se progressivamente desregulado e as células progridem de um estado fisiológico normal para estados pré-cancerígenos e, então, cancerígenos (veja-se, por exemplo, Alers *et al.*, *Lab Invest.* 77(5): 437-438 (1997) e Isaacs *et al.*, *Cancer Surv.* 23: 19-32 (1995)). Nesse contexto, o exame de uma amostra biológica com relação à evidência de desenvolvimento celular desregulado (tal como expressão anormal de PSCA em cancros) permite a detecção precoce de tal fisiologia anormal, antes que um estado patológico, tal como cancro, tenha progredido para um estágio no qual as opções terapêuticas são mais limitadas e/ou o prognóstico é pior. Em tais exames, o estado do PSCA numa amostra biológica de interesse pode ser comparado, por exemplo, ao estado do PSCA numa amostra normal correspondente (por exemplo, uma amostra desse indivíduo ou, alternativamente, outro indivíduo que não está afectado pela patologia). Uma alteração no estado do PSCA na amostra biológica (quando comparado à amostra normal) proporciona evidência de desenvolvimento celular desregulado. Além da utilização de

uma amostra biológica que não é afectada por uma patologia como uma amostra normal, pode-se também usar um valor normativo predeterminado, tal como um nível normal predeterminado de expressão de ARNm (veja-se, por exemplo, Grever *et al.*, J. Comp. Neurol., 9 de Dezembro de 1996; 376(2): 306-14 e Patente U.S. N° 5.837.501) para comparar o estado do PSCA numa amostra.

O termo "estado", nesse contexto, é usado de acordo com seu significado aceite na técnica e refere-se à condição ou estado de um gene e seus produtos. Tipicamente, os peritos na especialidade usam uma série de parâmetros para avaliar a condição ou estado de um gene e seus produtos. Esses incluem, mas não estão limitados, à localização dos produtos do gene expresso (incluindo localização de células que expressam PSCA), bem como o nível e actividade biológica de produtos do gene expresso (tal como ARNm, polinucleótidos e polipéptidos de PSCA). Tipicamente, uma alteração no estado de PSCA compreende uma alteração na localização do PSCA e/ou células que expressam PSCA e/ou um aumento no ARNm e/ou expressão de proteína de PSCA.

O estado de PSCA numa amostra pode ser analisado através de uma série de meios bem conhecidos na técnica incluindo, sem limitação, análise imunohistoquímica, hibridação *in situ*, análise por RT-PCR sobre amostras microdissecadas por captura a laser, análises por Western blot e análise de arranjo de tecido. Protocolos típicos para a avaliação do estado de um gene e produtos do gene e PSCA são encontrados, por exemplo, em Ausubel *et al.* eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unidades 2 (Northern Blotting), 4 (Southern Blotting), 15 (Imunoblotting) e 18 (Análise por PCR). Assim, o estado de PSCA numa amostra biológica é avaliado através de vários métodos utilizados pelos peritos na especialidade incluindo, mas não limitado a, análise de Southern genómica

(para examinar, por exemplo, alterações nas sequências de polinucleótido ou níveis de expressão de ARNm de PSCA) e análise de Western e/ou imunohistoquímica (para examinar, por exemplo, alterações em sequências de polipéptido, alterações na localização de polipéptidos dentro de uma amostra, alterações nos níveis de expressão de proteínas de PSCA e/ou associações de proteínas de PSCA com parceiros de ligação a polipéptidos). Polinucleótidos de PSCA detectáveis incluem, por exemplo, um gene de PSCA ou fragmentos do mesmo, ARNm de PSCA, variantes com união alternativas, ARNm de PSCA e moléculas de ADN ou ARN recombinantes contendo um polinucleótido de PSCA.

O perfil de expressão do PSCA o torna um marcador diagnóstico para doença local e/ou metastatizada e proporciona informação sobre o desenvolvimento ou potencial oncogénico de uma amostra biológica. Em particular, o estado do PSCA proporciona informação útil para a previsão da susceptibilidade a estados da doença e/ou, progressão e/ou agressividade do tumor. A invenção proporciona métodos e ensaios para a determinação do estado de PSCA e diagnóstico de cancros que expressam PSCA, tais como cancros dos tecidos listados no Quadro I. Por exemplo, em virtude do fato do ARNm de PSCA ser altamente expresso em próstata e outros cancros com relação ao tecido normal, ensaios que avaliam os níveis de transcritos de ARNm ou proteína de PSCA numa amostra biológica podem ser usados para diagnosticar uma doença associada à desregulação do PSCA e podem proporcionar informação diagnóstica útil na definição de opções terapêuticas apropriadas.

O estado de expressão do PSCA proporciona informação incluindo a presença, estágio e localização de células displásicas, pré-cancerígenas e cancerígenas, previsão da susceptibilidade a vários estágios de doença em particular para medição da agressividade do tumor. Além disso, o perfil de expressão o torna útil como um reagente de

formação de imagem para doença metastatizada. Consequentemente, um aspecto da invenção é dirigido a vários métodos prognósticos e diagnósticos moleculares para exame do estado de PSCA em amostras biológicas, tais como aqueles indivíduos que estão a sofrer de ou suspeitos de sofrer de uma patologia caracterizada por desenvolvimento celular desregulado, tal como cancro.

Como foi descrito anteriormente, o estado do PSCA numa amostra biológica pode ser examinado através de uma série de procedimentos bem conhecidos na técnica. Por exemplo, o estado do PSCA numa amostra biológica tomada de um local específico com relação à ausência ou presença de células que expressam PSCA (por exemplo, aquelas que expressam ARNm ou proteínas de PSCA). Esse exame pode proporcionar evidência de desenvolvimento celular desregulado, por exemplo, quando células que expressam o PSCA são encontradas numa amostra biológica que normalmente não contém tais células (tal como um gânglio linfático), em virtude do fato de tais alterações no estado do PSCA numa amostra biológica serem, frequentemente, associadas ao desenvolvimento celular desregulado. Especificamente, um indicador de desenvolvimento celular desregulado é a metástase de células cancerígenas de um órgão de origem (tal como a próstata) a uma área diferente do corpo (tal como um gânglio linfático). Nesse contexto, evidência de desenvolvimento celular desregulado é importante, por exemplo, em virtude de metástases de gânglio linfático ocultas poderem ser detectadas numa proporção substancial de pacientes com cancro de próstata e tais metástases estarem associadas com agentes prognósticos conhecidos de progressão de doença (veja-se, por exemplo, Murphy *et al.*, *Prostate* 42(4): 315-317 (2000); Su *et al.*, *Semin. Surg. Oncol.* 18(1): 17-28 (2000) e Freeman *et al.*, *J Urol.*, Agosto de 1995, 154(2 Pt 1): 474-8).

Num aspecto, a invenção proporciona métodos para a monitorização de produtos do gene de PSCA através de determinação do estado de produtos do gene de PSCA expressos por células de um indivíduo que se suspeita ter uma doença associada ao desenvolvimento celular desregulado (tal como hiperplasia ou cancro) e, então, comparação do estado assim determinado ao estado de produtos do gene de PSCA numa amostra normal correspondente. A presença de produtos do gene de PSCA anormais na amostra de teste com relação à amostra normal proporciona uma indicação da presença de desenvolvimento celular desregulado dentro das células do indivíduo.

Mais geralmente como foi indicado antes no presente documento, a invenção proporciona ensaios úteis na determinação da presença de cancro num indivíduo, que compreende a detecção de um aumento significativo no ARNm de PSCA ou expressão de proteína numa célula de teste ou amostra de tecido com relação aos níveis de expressão na célula ou tecido normal correspondentes. A presença de ARNm de PSCA pode, por exemplo, ser avaliada em tecidos incluindo, mas não limitado, àqueles listados no Quadro I. A presença de expressão significativa de PSCA em qualquer um desses tecidos é útil para indicar a emergência, presença e/ou gravidade de um cancro, uma vez que os tecidos normais correspondentes não expressam ARNm de PSCA ou expressam o mesmo em níveis menores.

Numa forma de realização relacionada, o estado de PSCA é determinado a nível de proteína ao invés da nível de ácido nucleico. Por exemplo, tal método compreende a determinação do nível de proteína de PSCA expresso por células numa amostra de tecido de teste e comparação do nível assim determinado com o nível de PSCA expresso numa amostra normal correspondente. Numa forma de realização, a presença de proteína de PSCA é avaliada, por exemplo, usando métodos imunohistoquímicos. Anticorpos contra o PSCA

ou parceiros de ligação capazes de detecção de expressão da proteína de PSCA são usados numa variedade de formatos de ensaio bem conhecidos na técnica para essa finalidade.

Adicionalmente, pode-se examinar o estado de metilação de um gene de PSCA numa amostra biológica. Desmetilação e/ou hipermetilação anormal em ilhotas de CpG em regiões reguladoras 5' do gene frequentemente ocorrem em células imortalizadas e transformadas e podem resultar em expressão alterada de vários genes. Por exemplo, hipermetilação por promotor de glutatíon S-transferase da classe-pi (uma proteína expressa em próstata normal, mas não expressa em >90 % dos carcinomas de próstata) parece silenciar permanentemente a transcrição desse gene e é a alteração genómica mais frequentemente detectada em carcinomas de próstata (De Marzo *et al.*, *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985-1992 (1999)). Além disso, essa alteração está presente em pelo menos 70 % dos casos de neoplasia intra-epitelial prostática de elevado grau (PIN) (Brooks *et al.*, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, 7: 531-536). Em outro exemplo, a expressão do gene específico a tumor LAGE I (o qual não é expresso em próstata normal, mas é expresso em 25-50 % dos cancros de próstata) é induzida por desoxiazacitidina em células linfoblastóides, sugerindo que a expressão tumoral é em virtude de desmetilação (Lethe *et al.*, *Int. J. Cancer* 76(6): 903-908 (1998)). Uma variedade de ensaios para exame do estado de metilação de um gene são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, pode-se utilizar, em abordagens de hibridação de Southern enzimas de restrição sensíveis a metilação que não podem clivar sequências que contêm locais de CpG metilados para avaliar o estado de metilação de ilhotas de CpG. Além disso, MSP (PCR metilação-específica) pode, proporcionar rapidamente o perfil do estado de metilação de todos os locais de CpG presentes numa ilha de CpG de um determinado gene. Esse procedimento envolve modificação inicial de ADN por

bissulfito de sódio (o qual converterá todas as citocinas não metiladas em uracilo), seguido por amplificação usando iniciadores específicos para ADN metilado versus não metilado. Protocolos envolvendo a interferência por metilação também podem ser encontrados, por exemplo, em *Current Protocols In Molecular Biology*, Unidade 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995.

Amplificação de gene é um método adicional para a avaliação do estado de PSCA. A amplificação de gene é medida numa amostra directamente, por exemplo, através de Southern blotting ou Northern blotting convencional para quantificar a transcrição de ARNm (Thomas, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201-5205), dot blotting (análise de ADN) ou hibridação *in situ*, usando uma sonda apropriadamente marcada, com base nas sequências proporcionadas no presente documento. Alternativamente, anticorpos são utilizados que reconhecem duplas específicas, incluindo duplas de ADN, duplas de ARN e duplas híbridas de ADN-ARN ou duplas de ADN-proteína. Os anticorpos, por sua vez, são marcados e o ensaio realizado onde a dupla é ligada a uma superfície de modo que, quando de formação da dupla sobre a superfície, a presença de anticorpo ligado à dupla pode ser detectada.

Tecido de biopsia ou sangue periférico pode ser convenientemente avaliado com relação à presença de células cancerígenas usando, por exemplo, análise por Northern blot, dot blot ou RT-PCR para detectar a expressão de PSCA. A presença de ARNm de PSCA amplificável por RT-PCR proporciona uma indicação da presença de cancro. Ensaio de RT-PCR são bem conhecidos na técnica. Ensaio de detecção de células tumorais por RT-PCR em sangue periférico estão sendo actualmente usados no diagnóstico e tratamento de uma série de tumores sólidos humanos. No campo de cancro de próstata, esses incluem ensaios por RT-PCR para a detecção de células que expressam PSA e PSM (Verkaik *et al.*, 1997,

Urol. Res. 25: 373-384; Ghossein et al., 1995, J. Clin. Oncol. 13: 1195-2000; Hes- ton et al., 1995, Clin. Chem. 41:1687-1688).

Um outro aspecto da invenção é uma avaliação da susceptibilidade que um indivíduo tem de desenvolver cancro. Numa forma de realização, um método para a previsão da susceptibilidade ao cancro compreende a detecção de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA numa amostra de tecido, sua presença indicando a susceptibilidade ao cancro, em que o grau de expressão de ARNm de PSCA se correlaciona com o grau de susceptibilidade. Numa forma de realização específica, a presença de PSCA em tecido de próstata ou outro é examinada, com a presença de PSCA na amostra proporcionando uma indicação de susceptibilidade ao cancro de próstata (ou a emergência ou existência de um tumor de próstata). Similarmente, pode-se avaliar a integridade de sequências de nucleótido e aminoácidos de PSCA de forma a identificar perturbações na estrutura dessas moléculas, tais como inserções, deleções, substituições e similares. A presença de uma ou mais perturbações em produtos do gene de PSCA na amostra é uma indicação de susceptibilidade ao cancro (ou a emergência ou existência de um tumor).

A invenção também compreende métodos para a medição da agressividade do tumor. Numa forma de realização, um método para medição da agressividade de um tumor compreende a determinação do nível de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA expressa por células tumorais, comparação do nível assim determinado com o nível de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA expressa num tecido normal correspondente tomado do mesmo indivíduo ou de uma amostra de referência de tecido normal, em que o grau de expressão de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA na amostra de tumor com relação à amostra normal indica o grau de agressividade. Numa forma de realização específica, a agressividade de um tumor é avaliada através de determinação do ponto até o qual o PSCA é expresso em

células tumorais, com maiores níveis de expressão indicando tumores mais agressivos. Outra forma de realização é a avaliação da integridade de sequências de nucleótido e aminoácido de PSCA numa amostra biológica, de forma a identificar perturbações na estrutura dessas moléculas, tais como inserções, deleções, substituições e similares. A presença de uma ou mais perturbações indica tumores mais agressivos.

Outra forma de realização da invenção é dirigida a métodos para a observação da progressão de uma malignidade num indivíduo com o tempo. Numa forma de realização, métodos para a observação da progressão de uma malignidade num indivíduo com o tempo compreendem a determinação do nível de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA expresso por células numa amostra do tumor, comparação do nível assim determinado com o nível de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA expresso numa amostra de tecido equivalente tomada do mesmo indivíduo num momento diferente, em que o grau de expressão de ARNm de PSCA ou proteína de PSCA na amostra de tumor com o tempo proporciona informação sobre a progressão do cancro. Numa forma de realização específica, a progressão de um cancro é avaliada através de determinação de expressão do PSCA em células tumorais com o tempo, onde expressão aumentada com o tempo indica uma progressão do cancro. Também, pode-se avaliar a integridade de sequências de nucleótido e aminoácido de PSCA numa amostra biológica de forma a identificar perturbações na estrutura dessas moléculas, tais como inserções, deleções, substituições e similares, onde a presença de uma ou mais perturbações indica uma progressão do cancro.

As abordagens diagnósticas acima podem ser combinadas com qualquer um de uma ampla variedade de protocolos prognósticos e diagnósticos conhecidos na técnica. Por exemplo, outra forma de realização da invenção é dirigida a métodos para a observação de uma coincidência entre a

expressão de gene de PSCA e produtos de gene de PSCA (ou perturbações no gene de PSCA e produtos do gene de PSCA) e um factor que está associado à malignidade, como um meio para diagnóstico e prognóstico do estado de uma amostra de tecido. Uma ampla variedade de factores associados à malignidade podem ser utilizados, tal como a expressão de genes associados à malignidade (por exemplo, expressão de PSA, PSCA e PSM para cancro de próstata, etc.), bem como observações citológicas (veja-se, por exemplo, 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). Métodos para a observação de uma coincidência entre a expressão do gene de PSCA e produtos do gene de PSCA (ou perturbações no gene de PSCA e produtos do gene de PSCA) e outro factor que está associado à malignidade são úteis, por exemplo, porque a presença de um conjunto de factores específicos que coincidem com a doença proporciona informação crucial para diagnóstico e prognóstico do estado de uma amostra de tecido.

Numa forma de realização, métodos para a observação de uma coincidência entre a expressão do gene de PSCA e produtos do gene de PSCA (ou perturbações no gene de PSCA e produtos do gene de PSCA) e outro factor associado à malignidade requerem detecção da sobre-expressão de ARNm ou proteína de PSCA numa amostra de tecido, detecção da sobre-expressão de ARNm ou proteína de PSA numa amostra de tecido (ou expressão de PSCA ou PSM). Numa forma de realização específica, a expressão de ARNm de PSCA e PSA em tecido de próstata é examinada, onde a coincidência de sobre-expressão de ARNm de PSCA e PSCA na amostra indica a existência de cancro de próstata, susceptibilidade ao cancro de próstata ou a emergência ou estado de um tumor de próstata.

Métodos para a detecção e quantificação da expressão de ARNm ou proteína de PSCA são descritos no presente documento e tecnologias padrão de detecção e quantificação de proteína e ácido nucleico são bem conhecidas na técnica. Métodos padrão para a detecção e quantificação de ARNm de PSCA incluem hibridação *in situ* usando ribossondas de PSCA marcadas, Northern blot e técnicas relacionadas usando sondas de polinucleótido de PSCA, análise por RT-PCR usando iniciadores específicos para o PSCA e outros métodos de detecção do tipo amplificação tais como, por exemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA e similares. Numa forma de realização específica, RT-PCR semiquantitativa é usada para detectar e quantificar expressão de ARNm de PSCA. Qualquer variedade de iniciadores capazes de amplificação de PSCA podem ser usados para essa finalidade incluindo, mas não limitado a, vários conjuntos de iniciadores especificamente descritos no presente documento. Numa forma de realização específica, anticorpos policlonais ou monoclonais especificamente reactivos à proteína de PSCA do tipo silvestre podem ser usados num ensaio imunohistoquímico de tecido de biopsia.

Formas de realização Diagnóstica e Prognóstica de PSCA

Como foi revelado no presente documento, polinucleótidos de PSCA, polipéptidos e anticorpos anti-polipéptido são usados em ensaios diagnósticos, prognósticos e terapêuticos bem conhecidos que examinam condições associadas ao crescimento celular desregulado, tal como cancro, em particular os cancros listados no Quadro I (veja-se, por exemplo, seu padrão específico de expressão tecidual, bem como sua sobre-expressão em determinados cancros, conforme descrito, por exemplo, no Exemplo intitulado "Análise de expressão de PSCA em tecidos normais e amostras de pacientes").

O PSCA pode ser análogo a um antigénio associado a próstata PSA, o marcador arquétipo que foi usado pelos

médicos durante anos para identificar e monitorizar a presença de cancro de próstata (veja-se, por exemplo, Merrill *et al.*, *J. Urol.* 163(2): 503-5120 (2000); Polascik *et al.*, *J. Urol.* Aug; 162(2): 293-306 (1999) e Fortier *et al.*, *J. Nat. Cancro Inst.* 91(19): 1635- 1640(1999)). Uma variedade de outros marcadores diagnósticos também é usada em contextos similares, incluindo p53 e K-ras (veja-se, por exemplo, Tulchinsky *et al.*, *Int J Mol Med*, Julho de 1999, 4(1): 99-102 e Minimoto *et al.*, *Cancer Detect Prev* 2000; 24(1): 1-12). Portanto, a presente descrição de polinucleótidos e polipéptidos de PSCA (bem como sondas de polinucleótido de PSCA e anticorpos anti-PSCA usadas para identificar a presença dessas moléculas) e suas propriedades permitem que os peritos na especialidade utilizem essas moléculas em métodos que são análogos àqueles usados, por exemplo, numa variedade de ensaios diagnósticos destinados a examinar condições associadas ao cancro.

Formas de realização típicas de métodos de diagnóstico os quais utilizam os polinucleótidos de PSCA, polipéptidos, células T reactivas e anticorpos são análogos àqueles métodos de ensaios diagnósticos bem estabelecidos, os quais utilizam, por exemplo, polinucleótidos de PSA, polipéptidos, células T reactivas e anticorpos. Por exemplo, assim como polinucleótidos de PSA são usados como sondas (por exemplo, em análise de Northern, veja-se, por exemplo, Sharief *et al.*, *Biochem. Mol. Biol. Int.* 33(3): 567- 74(1994)) e iniciadores (por exemplo, em análise por PCR, veja-se, por exemplo, Okegawa *et al.*, *J. Urol.* 163(4): 1189-1190 (2000)) para observar a presença e/ou o nível de ARNm de PSA em métodos de monitorização de sobre-expressão de PSA ou a metástase de cancros de próstata, os polinucleótidos de PSCA descritos no presente documento podem ser utilizados da mesma forma para detectar sobre-expressão de PSCA ou a metástase de cancro de próstata e

outros que expressam esse gene. Alternativamente, assim como polipéptidos de PSA são usados para gerar anticorpos específicos para o PSA os quais podem, então, ser usados para observar a presença e/ou o nível de proteínas de PSA em métodos para monitorizar sobre-expressão de proteína PSA (veja-se, por exemplo, Stephan *et al.* Urology 55(4): 560-3 (2000)) ou a metástase de células de próstata (veja-se, por exemplo, Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-7 (1996)), os polipéptidos de PSCA descritos no presente documento podem ser utilizados para gerar anticorpos para utilização na detecção de sobre-expressão de PSCA ou a metástase de células de próstata e células de outros cancros que expressam esse gene.

Especificamente, em virtude do fato de tais metástases envolverem o movimento de células cancerígenas de um órgão de origem (tal como o pulmão ou glândula prostática, etc.) a uma área diferente do corpo (tal como um gânglio linfático), ensaios os quais examinam uma amostra biológica com relação à presença de células que expressam polinucleótidos e/ou polipéptidos de PSCA podem ser usados para proporcionar evidência de metástase. Por exemplo, quando se verifica que uma amostra biológica de tecido que normalmente não contém células que expressam PSCA (gânglio linfático) contém células que expressam PSCA, tal como a expressão de PSCA observada em LAPC4 e LAPC9, xenoenxertos isolados de gânglio linfático e metástases ósseas, respectivamente, essa descoberta é indicativa de metástase.

Alternativamente, polinucleótidos e/ou polipéptidos de PSCA podem ser usados para proporcionar evidência de cancro, por exemplo, quando se verifica que células numa amostra biológica que normalmente não expressam PSCA ou expressam PSCA num nível diferente expressam PSCA ou têm uma expressão aumentada de PSCA (veja-se, por exemplo, a expressão de PSCA em cancros listados no Quadro I e em amostras de paciente, etc., mostradas nas Figuras em

anexo). Em tais ensaios, os técnicos podem ainda desejar gerar evidência suplementar de metástase através de testagem da amostra biológica com relação à presença de um segundo marcador limitado ao tecido (além do PSCA), tal como PSA, PSCA, etc. (veja-se, por exemplo, Alanen *et al.*, *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)).

A utilização de imunohistoquímica para identificar a presença de um polipéptido de PSCA dentro de uma secção tecidular pode indicar um estado alterado de determinadas células dentro desse tecido. É bem compreendido na técnica que a capacidade de um anticorpo de localizar a um polipéptido que é expresso em células cancerígenas é uma forma de diagnosticar a presença de uma doença, estágio de doença, progressão e/ou agressividade de tumor. Tal anticorpo também pode detectar uma distribuição alterada do polipéptido dentro das células cancerígenas, quando comparado ao tecido não-maligno correspondente.

O polipéptido e composições imunogénicas de PSCA também são muito úteis em vista dos fenómenos de localização alterada de proteína subcelular em estados da doença. A alteração de células do estado normal para doentio causa alterações na morfologia celular e, frequentemente, está associada a alterações na localização/distribuição de proteína subcelular. Por exemplo, proteínas da membrana celular que são expressas de uma maneira polarizada em células normais podem ser alteradas numa doença, resultando em distribuição da proteína de uma maneira não polar sobre toda a superfície celular.

O fenómeno de localização alterada de proteína subcelular num estado doentio foi demonstrado com expressão de proteína MUC1 e Her2 através da utilização de meios imunohistoquímicos. Células epiteliais normais têm uma distribuição apical típica de MUC1, além de alguma localização supranuclear da glicoproteína, enquanto que

lesões malignas frequentemente demonstram um padrão de coloração 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)). Além disso, o epitélio normal de mama é negativo para a proteína Her2 ou exibe apenas uma distribuição basolateral, enquanto que células malignas podem expressar a proteína sobre toda a superfície celular (De Potter *et al.*, *International Journal of Cancer*, 44; 969-974 (1989); McCormick *et al.*, 117; 935-943 (2002)). Alternativamente, a distribuição da proteína pode ser alterada de uma localização apenas na superfície para incluir expressão citoplasmática difusa no estado doentio. Tal exemplo pode ser observado com MUC1 (Diaz *et al.*, *The Breast Journal*, 7: 40-45 (2001)).

Alteração na localização/distribuição de uma proteína na célula, conforme detectado através de métodos imunohistoquímicos, podem também proporcionar informação valiosa referente ao favorecimento de determinadas formas de realização de tratamento. Esse último ponto é ilustrado por uma situação onde uma proteína pode ser intracelular num tecido normal, mas estar na superfície celular em células malignas; a localização na superfície celular torna as células favoravelmente passíveis de regimes de diagnóstico e tratamento baseados em anticorpo. Quando tal alteração de localização de proteína ocorre para o PSCA, a proteína de PSCA e respostas imunes relacionadas à mesma são muito úteis. Consequentemente, a capacidade de determinar se alteração de localização da proteína subcelular ocorreu para 24P4C12 tornam a proteína de PSCA e respostas imunes relacionadas à mesma muito úteis. A utilização de composições de PSCA permite que os peritos na especialidade tomem importantes decisões diagnósticas e terapêuticas.

Reagentes imunohistoquímicos específicos ao PSCA são também úteis para detectar metástases de tumores expressando PSCA quando o proporcional aparece em tecidos onde o PSCA não é normalmente produzido.

Assim como fragmentos de polinucleótido e variantes de polinucleótido de PSCA são utilizados pelos peritos na especialidade para utilização em métodos de monitorização de PSA, fragmentos de polinucleótido e variantes de polinucleótido de PSCA são usados de uma maneira análoga. Em particular, polinucleótidos de PSA típicos usados em métodos de monitorização de PSA são sondas ou iniciadores os quais consistem em fragmentos da sequência de ADNc de PSA. Ilustrando isso, iniciadores usados para amplificar por PCR um polinucleótido de PSA devem incluir menos do que a sequência de PSA toda para funcionar na reacção em cadeia de polimerase. No contexto de tais reacções de PCR, os peritos na especialidade geralmente criam uma variedade de diferentes fragmentos de polinucleótido que podem ser usados como iniciadores de forma a amplificar diferentes partes de um polinucleótido de interesse ou otimizar reacções de amplificação (veja-se, por exemplo, Caetano-Anolles, G. *Biotechniques* 25(3): 472-476, 478-480 (1998); Robertson *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 98: 121-154 (1998)). Uma ilustração adicional da utilização de tais fragmentos é proporcionada no Exemplo intitulado "Análise de expressão de PSCA em tecidos normais e amostras de pacientes", onde um fragmento de polinucleótido de PSCA é usado como uma sonda para mostrar a expressão de ARN de PSCA em células cancerígenas. Além disso, sequências variantes de polinucleótido são, tipicamente, usadas como iniciadores e sondas para os ARNm correspondentes em análises de PCR e Northern blot (veja-se, por exemplo, Sawai *et al.*, *Fetal Diagn. Ther.*, Nov-Dez de 1996, 11(6): 407-13 e *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unidade 2, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995)). Fragmentos de

polinucleótido e variantes são úteis nesse contexto, onde eles são capazes de se ligar a uma sequência de polinucleótido alvo (por exemplo, um polinucleótido de PSCA mostrado na Figura 2 ou variante do mesmo) sob condições de elevada restringência.

Além disso, polipéptidos de PSA os quais contêm um epítipo que pode ser reconhecido por um anticorpo ou célula T que se liga especificamente a esse epítipo são usados em métodos de monitorização de PSA. Fragmentos de polipéptido de PSCA e análogos ou variantes de polipéptido também podem ser usados de uma maneira análoga. Essa prática de utilização de fragmentos de polipéptido ou variantes de polipéptido para gerar anticorpos (tais como anticorpos anti-PSCA ou células T) é típica na técnica, com uma ampla variedade de sistemas, tais como proteínas de fusão, sendo usados pelos peritos na especialidade (veja-se, por exemplo, *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unidade 16, Frederick M. Ausubel et al. eds., 1995). Nesse contexto, cada epítipo funciona para proporcionar a arquitectura com a qual um anticorpo ou célula T é reactiva. Tipicamente, os peritos na especialidade criam uma variedade de diferentes fragmentos de polipéptido que podem ser usados de forma a gerar respostas imunes específicas para diferentes partes de um polipéptido de interesse (veja-se, por exemplo, Patente U.S. N° 5.840.501 e Patente U.S. N° 5.939.533). Por exemplo, pode ser preferível utilizar um polipéptido que compreende um dos motivos biológicos de PSCA discutidos no presente documento ou uma subsequência que porta motivo a qual é prontamente identificada pelos peritos na especialidade com base em motivos disponíveis na técnica. Fragmentos, variantes ou análogos de polipéptido são, tipicamente, úteis nesse contexto, à medida que eles compreendam um epítipo capaz de geração de um anticorpo ou célula T específica para uma

sequência de polipéptido alvo (por exemplo, um polipéptido de PSCA mostrado na Figura 3).

Como é mostrado no presente documento, os polinucleótidos e polipéptidos de PSCA (bem como as sondas de polinucleótido de PSCA e anticorpos anti- PSCA ou células T usadas para identificar a presença dessas moléculas) exibem propriedades específicas que os torna úteis em diagnóstico de cancro, tais como aqueles listados no Quadro I. Ensaios diagnósticos que medem a presença de produtos do gene de PSCA, de forma a avaliar a presença ou início de uma condição doentia descrita no presente documento, tal como cancro de próstata, são usados para identificar pacientes para medidas preventivas ou monitorização adicional, conforme tem sido feito com sucesso com PSA. Além disso, esses materiais satisfazem uma necessidade na técnica por moléculas tendo características similares ou complementares ao PSA em situações onde, por exemplo, um diagnóstico definitivo de metástase de origem prostática não pode ser feito com base num teste para o PSA apenas (veja-se, por exemplo, Alanen *et al.*, *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233-237 (1996)) e, conseqüentemente, materiais tais como polinucleótidos e polipéptidos de PSCA (bem como as sondas de polinucleótido de PSCA e anticorpos anti- PSCA usados para identificar a presença dessas moléculas) precisam ser utilizados para confirmar uma metástase de origem prostática.

Finalmente, além da sua utilização em ensaios diagnósticos, os polinucleótidos de PSCA descritos no presente documento têm uma série de outras utilidades, tal como a sua utilização na identificação de anormalidades cromossômicas associadas oncogénicas na região cromossômica à qual o gene de PSCA se mapeia (veja-se o Exemplo intitulado "Mapeamento Cromossômico de PSCA" a seguir). Além disso, além da sua utilização em ensaios diagnósticos, as proteínas relacionadas com PSCA e

polinucleótido descritos no presente documento têm outras utilidades, tal como a sua utilização na análise forense de tecidos de origem desconhecida (veja-se, por exemplo, Takahama K Forensic Sci Int; 28 de Junho de 1996; 80(1-2): 63-9).

Kits

Para levar a cabo um método de diagnóstico da invenção, um kit pode ser proporcionado. Tais kits podem compreender um veículo, embalagem ou recipiente que é compartimentalizado para receber um ou mais recipientes, tais como frascos, tubos e similares, cada um dos recipientes que compreendem um dos elementos distintos a serem usados com o método, junto com um rótulo ou folheto informativo que compreende instruções para utilização, tal como a utilização descrita no presente documento. Por exemplo, o recipiente pode compreender uma sonda que é ou pode ser detectavelmente marcada. Tal sonda pode ser um anticorpo ou polinucleótido específico para uma proteína ou um gene ou mensagem da invenção, respectivamente. Onde o método utiliza hibridação de ácido nucleico para detectar o ácido nucleico alvo, o kit pode também ter recipientes que contêm nucleótidos(s) para amplificação da sequência de ácido nucleico alvo. Kits podem compreender um recipiente que compreende um repórter, tal como uma proteína de ligação à biotina, tal como avidina ou estreptavidina, ligado a uma molécula repórter, tal como um marcador enzimático, fluorescente ou radioisótopo; tal repórter pode ser usado, por exemplo, com um ácido nucleico ou anticorpo. O kit pode incluir toda ou parte de uma sequência de aminoácidos da Figura 2 ou Figura 3 ou uma molécula de ácido nucleico que codifica tais sequências de aminoácidos.

Um kit compreenderá, tipicamente, o recipiente descrito acima e um ou mais de outros recipientes associados ao mesmo que compreendem materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do consumidor, incluindo

tampões, diluentes, rótulos de tubos que listam os conteúdos e/ou instruções para utilização e folhetos informativos com instruções para utilização.

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos ilustram a invenção na medida que se refere a PSCA v.4 e métodos de diagnóstico como se reivindicam agora.

Exemplo 1: Isolamento Gerado por SSH de fragmento de ADNc do Gene de PSCA

Intencionalmente Omitido.

Exemplo 2: Isolamento de ADNc que codifica PSCA de Comprimento Total

Intencionalmente Omitido.

Exemplo 3: Mapeamento Cromossómico de PSCA

Intencionalmente Omitido.

Exemplo 4

Análise de Expressão de Variantes de PSCA em Tecidos Normais e Amostras de Paciente

Anteriormente, o PSCA, no presente documento referido como PSCA v.1, foi identificado como um antigénio expresso em cancro de próstata. Sua expressão foi detectada em mais de 80 % dos cancros de próstata primários e na maioria das metástases de próstata. Também foi mostrado que ele é expresso em cancro de bexiga, cancro de ovário e cancro pancreático; esses cancros são listados no Quadro I. Através de análise por imunohistoquímica, foi mostrado que o PSCA é sobre-expresso sobre a superfície celular a maioria dos carcinomas transitórios uroteliais e em 60 % dos adenocarcinomas pancreáticos primários. Dados de expressão do PSCA foram relatados em publicações de patente (PCT/US98/04664, PCT/US/28883, PCT/US00/19967) e em artigos revistos (Saffran *et al.*, Proc Natl Acad Sci U.S.A., 27 de Fevereiro de 2001; 98(5): 2658-2663; Amara *et al.*, Cancer Res., 15 de Junho de 2001; 61(12): 4660-65; Reiter *et al.*, Proc Natl Acad Sci U.S.A., 17 de Fevereiro de 1998; 95(4):

1735-40; Argani *et al.*, *Cancer Res.*, 1 de Junho de 2001; 61(11): 4320-24).

A expressão específica de diferentes variantes de PSCA foi estudada em amostras de pacientes normais e com cancro (Figura 14 e Figura 15). Iniciadores foram projectados para diferenciar entre PSCA v.1/v.2/v.4, PSCA v.3 e PSCA v.5. PSCA v.1/v.2/v.4 levou a um produto de PCR de 425 pb, PSCA v.3 levou a um produto de PCR de 300 pb, enquanto que PSCA v.5 levou a um produto de PCR de 910 pb de tamanho (Figura 14A).

ADNc de primeira cadeia foi preparado a partir de bexiga, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago normais, agrupamentos de cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro renal, cancro de cólon, cancro de pulmão, cancro de ovário, cancro de mama, metástase cancerígena e cancro de pâncreas (Figura 14B). Normalização foi realizada através de PCR usando iniciadores para actina. PCR semiquantitativa, usando iniciadores específicos a variante, foi realizada a 30 ciclos de amplificação.

Os resultados mostram a expressão de PSCA v.5 principalmente em cancro de mama, metástase cancerígena e cancro de pâncreas e, em menor nível, em cancro de cólon e cancro de pulmão. O produto de PCR PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado em cancro de próstata, cancro de bexiga, cancro renal, cancro de cólon, cancro de pulmão, cancro de ovário, cancro de mama, metástase cancerígena e cancro de pâncreas. Dentre tecidos normais, produto de PCR PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado somente em próstata, estômago e, em menor nível, em rim e pulmão, enquanto que PSCA v. 5 não foi detectado em qualquer tecido normal. O produto de PCR PSCA v.3 não foi detectado em qualquer uma das amostras testadas.

Iniciadores foram projectados para diferenciar entre PSCA v.4 e PSCA v.5 (Figura 15A). PSCA v.4 levou a um

produto de PCR de 460 pb, enquanto que PSCA v.5 levou a um produto de PCR de 945 pb de tamanho.

ADNc de primeira cadeia foi preparado a partir de bexiga, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago normais, agrupamentos de cancro de próstata, cancro de bexiga e agrupamentos com multi-xenoenxertos (xenoenxertos de cancro de próstata, cancro renal e cancro de bexiga) (Figura 15B). Normalização foi realizada através de PCR usando iniciadores para actina. PCR semiquantitativa, usando iniciadores específicos a variante, foi realizada a 30 ciclos de amplificação.

Os resultados mostram a expressão de PSCA v.4 em cancro de próstata, cancro de bexiga e agrupamentos com multi-xenoenxertos, rim normal e próstata. PSCA v.5 foi detectado somente em próstata normal e cancro de bexiga.

A expressão limitada de variantes de PSCA em tecidos normais e a expressão detectada em amostras de pacientes com cancro indicam que variantes de PSCA são alvos terapêuticos, prognósticos, de laboratório, profiláticos e diagnósticos para cancros humanos.

Exemplo 5: Variantes de Transcrito de PSCA

Como é utilizado no presente documento, o termo variante inclui variantes de transcrito e polimorfismos de um único nucleótido (SNP). Variantes de transcrito são variantes de ARNm maduro do mesmo gene as quais surgem através de transcrição alternativa ou união alternativa. Transcritos alternativos são transcritos do mesmo gene, mas começam a transcrição em pontos diferentes. Variantes com união são variantes de ARNm unidas diferentemente a partir do mesmo transcrito. Em eucariotas, quando um gene com exões múltiplos é transcrito a partir de ADN genómico, o ARN inicial é unido para produzir ARNm funcional, o qual tem apenas exões e é usado para tradução numa sequência de aminoácidos. Consequentemente, um determinado gene pode ter

zero a muitos transcritos alternativos e cada transcrito pode ter zero a muitas variantes com união. Cada variante de transcrito tem um único exão e pode ter diferentes porções de codificação e/ou não codificação (extremidade 5' ou 3'), com relação ao transcrito original. Variantes de transcrito podem codificar as mesmas, similares ou diferentes proteínas, tais proteínas tendo a mesma ou uma função similar ou uma função diferente. As proteínas variantes podem ser expressas no mesmo tecido ao mesmo tempo, num tecido diferente ao mesmo tempo ou no mesmo tecido em diferentes momentos ou num tecido diferente num momento diferente. Proteínas codificadas por uma variante de transcrito podem ter localizações subcelulares ou extracelulares similares ou diferentes (por exemplo, secretadas versus intracelulares).

Variantes de transcrito são identificadas através de uma variedade de métodos aceites na técnica. Por exemplo, transcritos alternativos e variantes com união são identificados através clonagem do comprimento total ou através de utilização de transcrito com comprimento total e sequências EST. Primeiro, todas as EST humanas foram agrupadas em grupos os quais mostram identidade directa ou indirecta umas com as outras. Segundo, EST no mesmo grupo foram adicionalmente agrupadas em subgrupos e montadas numa sequência de consenso. A sequência do gene original é comparada à(s) sequência(s) de consenso ou outras sequências de comprimento total. Cada sequência de consenso é uma variante splice potencial para esse gene. Várias formas de realização de confirmação são conhecidas na técnica, tais como identificação da variante através de análise de Northern, clonagem de comprimento ou através de utilização de bibliotecas de sonda, etc. Mesmo quando é identificada uma variante que ainda não é um clone de comprimento total, essa porção da variante é muito útil como uma ferramenta de pesquisa, por exemplo, para a

geração de antígeno ou para clonagem adicional da variante splice de comprimento total variante, usando métodos conhecidos na técnica.

Além disso, programas de computador estão disponíveis na técnica os quais identificam variantes de transcrito baseado em sequências genômicas. Programas de identificação de variantes de transcrito à base de genoma incluem FgenesH (A. Salamov e V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic ADN", *Genome Research.*, Abril de 2000; 10(4): 516-22); Grail ([URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm](http://compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm)) e GenScan ([URL genes.mit.edu/GENSCAN.html](http://genes.mit.edu/GENSCAN.html)). Para uma discussão geral de protocolos de identificação de variante splice veja-se, por exemplo, Southan, C., A genomic perspective on human proteases, *FEBS Lett.*, 8 de Junho de 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 U.S.A.*, 7 de Novembro de 2000; 97(23): 12690-3.

Para confirmar adicionalmente os parâmetros da variante de transcrito, uma variedade de métodos está disponível na técnica, tais como clonagem de comprimento total, validação proteômica, validação à base de PCR e validação por 5' RACE, etc. (veja-se, por exemplo, Proteomic Validation: Brennan, S.O. et al., Albumin banks península: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, *Biochem Biophys Acta.*, 17 de Agosto de 1999; 1433(1-2): 321-6; Ferranti P et al., Differential splicing of pre-messenger ARN produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, *Eur J Biochem.*, 1 de Outubro de 1997; 249(1): 1-7. Para validação à base de PCR: Wellmann S et al., Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology, *Clin Chem.*, abril de 2001; 47(4): 654-60; Jia,

H.P. *et al.*, Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, *Gene.*, 24 de Janeiro de 2001; 263(1-2): 211-8. Para validação à base de PCR e por 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 de Agosto de 1997; 1353(2): 191-8).

Conhece-se na técnica que regiões genómicas são moduladas em cancros. Quando a região genómica à qual um gene se mapeia é modulada num cancro em particular, os transcritos alternativos ou variantes com união do gene são modulados também. É divulgado no presente documento que o PSCA tem um perfil de expressão em particular relacionado ao cancro (veja-se, por exemplo, Quadro I). Transcritos alternativos e variantes com união de PSCA também estão envolvidos em cancros, por exemplo, num ou mais desses tecidos e em determinados tecidos adicionais também. As variantes, assim, servem como marcadores/antigénios associados a tumor.

Usando o gene de PSCA de comprimento total junto com sequências EST, quatro variantes de transcrito adicionais foram identificadas, designadas como PSCA v.2, v.3, v.4 e v.5. Os limites dos exões no transcrito original, PSCA v.1, foram mostrados no Quadro IV. Estruturas esquemáticas das sequências de ácido nucleico da variante de transcrito são mostradas na Figura 10. Na Figura 10, as barras com o mesmo padrão gráfico representam trechos de material genético contínuo, por exemplo, as barras pretas designam sequências genómicas encontradas na variante 1.

Os quadros V(a) - (d) até VII(a) - (d) são apresentados numa base variante-por-variante. Os quadros V(a) - (d) mostram as sequências de nucleótidos das variantes de transcrito. Os quadros VI(a) - (d) mostram o alinhamento das variantes de transcrito com a sequência de ácido nucleico de PSCA v.1 (para v.2 somente) ou com PSCA

v.2 (para todas as outras variantes). Os quadros VII(a) - (d) apresentam a tradução de aminoácidos das variantes de transcrito para a orientação da grelha de leitura identificada. Os quadros VIII(a) - (d) mostram alinhamentos da sequência de aminoácidos codificada pela variante splice com aquela da PSCA v.1.

Exemplo 6: Polimorfismos de um Único Nucleótido de PSCA

Polimorfismo de um Único Nucleótido (SNP) é uma variação de um único par de base numa sequência de nucleótidos num local específico. Em qualquer determinado ponto do genoma, existem quatro possíveis pares de base de nucleótido: A/T, C/G, G/C e T/A. Como é utilizado no presente documento, um alelo é uma de uma série de formas alternativas de um determinado gene, que difere quanto à sequência de ADN e afecta um produto (ARN e/ou proteína).

Um SNP que ocorre sobre um ADNC é denominado um cSNP. Esse cSNP pode trocar aminoácidos da proteína codificada pelo gene e, assim, alterar a função da proteína. Alguns SNPs causam doenças hereditárias; outros contribuem para variações quantitativas no fenótipo e reacções a factores ambientais, incluindo dieta e fármacos entre os indivíduos. Portanto, a existência de um SNP e/ou combinações de alelos (denominadas haplótipos) tem muitas aplicações úteis, tais como diagnóstico de doenças hereditárias, determinação de reacções à fármacos e dosagens, identificação de genes responsáveis por doenças e análise da relação genética entre indivíduos (P. Nowotny, J. M. Kwon e A. M. Goate, "SNP analysis to dissect human traits", *Curr. Opin. Neurobiol.*, Outubro de 2001; 11(5): 637-641; M. Pirmohamed e B. K. Park, "Genetic susceptibility to adverse drug reactions", *Trends Pharmacol. Sci.*, Junho de 2001; 22(6): 298-305; J. H. Riley, C. J. Allan, E. Lai e A. Roses, "The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes", *Pharmacogenomics.*, Fevereiro de 2000; 1(1): 39-47; R. Judson, J. C. Stephens e A.

Windemuth, "The predictive power of haplotypes in clinical response", *Pharmacogenomics.*, Fevereiro de 2000; 1 (1): 15-26).

SNPs são identificados através uma variedade de métodos aceites na técnica (P. Bean, "The promising voyage of SNP target discovery", *Am. Clin. Lab.*, Outubro-Novembro de 2001; 20(9): 18-20; K. M. Weiss, "In search of human variation", *Genome Res.*, Julho de 1998; 8(7): 691-697; M. M. She, "Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies", *Clin. Chem.*, Fevereiro de 2001; 47(2): 164-172). Por exemplo, SNPs são identificados através de sequenciamento de fragmentos de ADN que mostram polimorfismo através de métodos gel-baseados, tais como polimorfismo por extensão de fragmento de restrição (RFLP) e electroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE). Eles são também descobertos através de sequenciamento directo de uma amostra de ADN agrupado de diferentes indivíduos ou através de comparação de sequências de diferentes amostras de ADN. Com o rápido acúmulo de dados de sequência em bancos de dados públicos e privados, pode-se também descobrir SNPs através de comparação de sequências usando programas de computador (Z. Gu, L. Hillier e P. Y. Kwok, "Single nucleotides polymorphism hunting in cyberspace", *Hum. Mutat.* 1998; 12(4): 221-225). SNPs podem ser verificados e o genótipo ou haplótipo de um indivíduo pode ser determinado através de uma variedade de métodos, incluindo sequenciamento directo e microarranjos de elevado rendimento (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 e A. Duesterhoeft, "High-throughput SNP genotyping with the Masscode system," *Mol. Diagn.*, Dezembro de 2000; 5(4): 329-340).

Usando os métodos descritos acima, treze SNPs foram identificados no transcrito para PSCA v.2. A variante 2 foi usada, ao invés, por exemplo, da variante 1, uma vez que ela tem menos bases ambíguas do que a variante 1. Conseqüentemente, SNPs foram identificados na PSCA v.2, nas posições 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) e 978 (c/g). Os transcritos ou proteínas com alelos alternativos foram designados como variante de PSCA v.6 a v.18, como é mostrado no Quadro IX e Figura 12a.

A alteração de nucleótido em v.6 alterou o codão de iniciação da v.1 e, assim, a tradução não pôde ser iniciada até o próximo ATG (AUG em ARNm), resultando numa proteína 9 AA mais curta do que a proteína da v.1 (Figura 11a). As alterações de nucleótido para v.7 e v.8 eram silenciosas a nível de proteína.

Doze desses 13 SNPs também estavam presentes na variante 4, conforme apresentado na Figura 12b e Quadro LVI. As 12 variantes de SNP com relação à PSCA v. 4 são designadas PSCA v. 19 a v.30. As variantes 19 a 27 codificam aminoácidos alternativos (Figura 11b e Quadro IX).

O Quadro IX também mostra as alterações de aminoácidos da sequência de proteína. Esses SNP, embora mostrados individualmente no presente documento, podem ocorrer em diferentes combinações e em qualquer uma das variantes de transcrito que contém o local do SNP.

Exemplo 7: Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Procariotas

Para expressar o PSCA recombinante e as variantes de PSCA em células procariotas, as sequências de ADNc de PSCA e variante de PSCA de comprimento total ou parcial são clonadas em qualquer um de uma variedade de vectores de expressão conhecidos na técnica. Uma ou mais das regiões de

variantes de PSCA a seguir são expressas: a sequência de comprimento total apresentada nas Figuras 2 e 3 ou qualquer 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 ou mais aminoácidos contínuos de PSCA, variantes ou análogos dos mesmos.

A. Construções de transcrição e tradução *in vitro*:

pCRII: Para gerar sondas de ARN senso e antissenso ao PSCA para investigações de ARN *in situ*, construções pCRII (Invitrogen, Carlsbad CA) são geradas as quais codificam todo ou fragmentos do ADNc de PSCA. O vector pCRII tem promotores Sp6 e T7 flanqueando a inserção para accionar a transcrição de ARN de PSCA para utilização como sondas em experiências de hibridação de ARN *in situ*. Essas sondas são usadas para analisar a expressão de PSCA em células e tecidos a nível de ARN. ARN de PSCA transcrito representando a região de codificação de aminoácidos de ADNc do gene de PSCA é usado em sistemas de tradução *in vitro*, tal como o Sistema Retículo-Lisado Acoplado TnT® (Promega, Corp., Madison, WI) para sintetizar a proteína de PSCA.

B. Construções Bacterianas:

Construções pGEX: Para gerar proteínas de PSCA recombinantes em bactérias que são fusionadas à proteína glutatíon S-transferase (GST), toda ou partes da sequência de codificação de ADNc de PSCA são clonadas na família pGEX de vectores de fusão-GST (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Essas construções permitem a expressão controlada de sequências de proteína de PSCA recombinante com GST fusionadas no amino- término e seis epítomos de histidina (6X His) no carboxilo-término. As etiquetas GST e 6X His permitem a purificação da proteína de fusão recombinante a partir de bactérias induzidas com a matriz de afinidade apropriada e permitem o reconhecimento da proteína de fusão com anticorpos anti-GST e anti- His. A cauda 6X His é gerada através da adição de 6 codões de

histidina ao iniciador de clonagem na extremidade 3', por exemplo, da grelha de leitura aberta (ORF). Um local de clivagem proteolítica, tal como o local de reconhecimento PreScission® no pGEX-6P-1, pode ser utilizado, de modo que ele permite a clivagem da etiqueta GST da proteína relacionada com PSCA. O gene de resistência à ampicilina e a origem pBR322 permitem a rastreio e manutenção dos plasmídeos pGEX em *E. coli*.

Construções pMAL: Para gerar, em bactérias, proteínas de PSCA recombinantes que são fusionadas à proteína de ligação à maltose (MBP), toda ou partes da sequência de codificação de ADnc de proteína de PSCA são fusionadas ao gene MBP através de clonagem nos vetores pMAL-c2X e pMAL-p2X (New England Biolabs, Beverly, MA). Essas construções permitem a expressão controlada de sequências de proteína de PSCA recombinante com MBP fusionadas no amino-término e uma etiqueta de epítipo 6X His no carboxilo-término. Os marcadores MBP e 6X His permitem a purificação da proteína recombinante de bactérias induzidas com a matriz de afinidade apropriada e permitem o reconhecimento da proteína de fusão com anticorpos anti-MBP e anti-His. O marcador de epítipo 6X His é gerado através da adição de 6 codões de histidina ao iniciador de clonagem 3'. Um local de reconhecimento de Factor Xa permite a clivagem do marcador pMAL do PSCA. Os vetores pMAL-c2X e pMAL-p2X são otimizados para expressar a proteína recombinante no citoplasma ou periplasma, respectivamente. A expressão no periplasma intensifica a duplicação de proteínas com ligações de dissulfeto.

Construções pET: Para expressar o PSCA em células bacterianas, toda ou partes da sequência de codificação de ADnc de proteína de PSCA são clonadas na família de vetores pET (Novagen, Madison, WI). Esses vetores permitem a expressão hermeticamente controlada de proteína de PSCA recombinante em bactérias com e sem fusão às

proteínas que intensificam a solubilidade, tais como NusA e tio-redoxina (Trx) e marcador de epítipo, tais como 6X His e S-Tag® que auxiliam a purificação e detecção da proteína recombinante. Por exemplo, construções são feitas utilizando o sistema de fusão pET NusA 43.1, de modo que regiões da proteína de PSCA são expressas como fusões amino-terminais ao NusA.

C. Construções de Levedura:

Construções pESC: Para expressar o PSCA na espécie de levedura *Saccharomyces cerevisiae* para a geração de proteína recombinante e estudos funcionais, toda ou partes da sequência de codificação de ADNc de proteína de PSCA são clonadas na família de vetores pESC, cada um dos quais contém 1 de 4 marcadores seleccionáveis, HIS3, TRP1, LEU2 e URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). Esses vetores permitem a expressão controlada do mesmo plasmídeo de até 2 genes diferentes ou sequências clonadas contendo as etiquetas de epítipo Flag® ou Myc na mesma célula de levedura. Esse sistema é útil para confirmar interações proteína-proteína de PSCA. Além disso, a expressão em levedura proporciona modificações pós-traducionais similares, tais como glicosilações e fosforilações, que são encontradas quando expressas em células eucariotas.

Construções pESP: Para expressar PSCA na espécie de levedura *Saccharomyces pombe*, toda ou partes da sequência de codificação de ADNc de proteína de PSCA são clonadas na família de vetores pESP. Esses vetores permitem a expressão controlada em alto nível da sequência de proteína de PSCA que é fusionada no amino término ou no carboxilo término à GST, o que auxilia na purificação da proteína recombinante. Uma etiqueta de epítipo Flag® permite a detecção da proteína recombinante com anticorpo anti-Flag®.

Exemplo 8: Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas Superiores

Intencionalmente Omitido.

Exemplo 9: Perfis de Antigenicidade e Estrutura Secundária

A Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C e Figura 9A-C representam graficamente cinco perfis de aminoácidos de variantes de PSCA 1, 3 e 4, cada avaliação disponível através de acesso ao website da ProtScale (URL www.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) no servidor de biologia molecular ExPasy.

Esses perfis: Figura 5, Hidrofilicidade, (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828); Figura 6, Hidropaticidade, (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157: 105-132); Figura 7, Resíduos Acessíveis Percentuais (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); Figura 8, Flexibilidade Média, (Bhaskaran R. e Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); Figura 9, Beta-volta (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294); e opcionalmente outros disponíveis na técnica, tais como no website da ProtScale, foram usados para identificar regiões antigénicas de cada uma das proteínas variantes de PSCA. Cada um dos perfis de aminoácido acima de variantes de PSCA foi gerado usando os seguintes parâmetros da ProtScale para análise: 1) um tamanho de janela de 9; 2) peso das bordas de janela de 100 % comparado ao centro da janela; e 3) valores de perfis de aminoácidos normalizados para oscilar entre 0 e 1.

Os perfis de Hidrofilicidade (Figura 5), Hidropaticidade (Figura 6) e Resíduos Acessíveis Percentuais (Figura 7) foram usados para determinar trechos de aminoácidos hidrofílicos (isto é, valores maiores do que 0,5 sobre o perfil de Hidrofilicidade e Resíduos Acessíveis Percentuais e valores de menos do que 0,5 sobre o perfil de Hidropaticidade). É provável que tais regiões sejam expostas ao ambiente aquoso presente sobre a superfície da proteína e, assim, estão disponíveis para reconhecimento imune, tal como por anticorpos.

Os perfis de Flexibilidade Média (Figura 8) e Beta-volta (Figura 9) determinam trechos de aminoácidos (isto é, valores maiores do que 0,5 sobre o perfil de Beta-volta e o perfil de Flexibilidade Média) que não estão limitados a estruturas secundárias, tais como beta folhas e alfa hélices. Também é provável que tais regiões estejam expostas sobre a proteína e, assim, acessíveis ao reconhecimento imune, tal como por anticorpos.

As sequências antigénicas das proteínas variantes de PSCA indicadas, por exemplo, pelos perfis apresentados nas Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C e/ou Figura 9A-C, são usadas para preparar imunogénios, quer de péptidos ou ácidos nucleicos que codificam os mesmos, para gerar anticorpos anti-PSCA terapêuticos e diagnósticos. O imunogénio pode ser qualquer 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 ou mais de 50 aminoácidos contínuos ou os ácidos nucleicos correspondentes que codificam os mesmos, das variantes de proteína de PSCA listadas nas Figuras 2 e 3, das quais os perfis de aminoácidos são mostrados na Figura 9, ou podem ser inferidas em virtude do fato da variante conter uma sequência que é a mesma que a variante representada na Figura 9. Em particular, os imunogénios peptídicos da invenção podem compreender uma região de péptido de pelo menos 5 aminoácidos das Figuras 2 e 3 em qualquer aumento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 nos perfis de Hidrofilicidade da Figura 5; uma região de péptido de pelo menos 5 aminoácidos das Figuras 2 e 3 em qualquer aumento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor menor do que 0,5 no Perfil de Hidropaticidade da Figura 6; uma região de péptido de pelo menos 5 aminoácidos das Figuras 2 e 3 em qualquer aumento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 nos perfis de Resíduos

Acessíveis Percentuais da Figura 7; uma região de péptido de pelo menos 5 aminoácidos das Figuras 2 e 3 em qualquer aumento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 nos perfis de Flexibilidade Média da Figura 8; e uma região de péptido de pelo menos 5 aminoácidos das Figuras 2 e 3 em qualquer aumento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 no Perfil de Beta-Volta da Figuras 9. Os imunogénios peptídicos da invenção podem também compreender ácidos nucleicos que codificam qualquer um dos precedentes.

Todos os imunogénios, péptidos ou ácidos nucleicos da invenção podem ser concretizados na forma de dose unitária humana ou estarem compreendidos numa composição que inclui um excipiente farmacêutico compatível com a fisiologia humana.

A estrutura secundária de variantes 1, 3, 4 e 6 de proteína de PSCA, isto é, a presença e localização prevista de alfa hélices, filamentos estendidos e espirais aleatórios, é prevista a partir das sequências de aminoácidos primárias usando o método HNN - Hierarchical Neural Nedoisrk (NPS@: Nedoisrk Protein Sequence Analysis TIBS, Março de 2000, Vol. 25, N° 3 [291]: 147-150 Combet C., Blanchet C., Geourjon C. e Deléage G., http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), acedido a partir do servidor de biologia molecular ExPasy (<http://www.expasy.ch/tools/>). A análise indica que a variante 1 de PSCA é composta de 30,89 % de alfa hélice, 21,95 % de filamentos estendidos e 47,15 % de espirais aleatórias (Figura 13A). A variante 3 de proteína de PSCA é composta de 14,89 % de alfa hélice, 8,51 % de filamentos estendidos e 76,60 % de espirais aleatórias (Figura 13B). A variante 4 de proteína de PSCA é composta de 9,52 % de alfa hélice, 8,99 % de filamentos estendidos e 81,48 % de

espirais aleatórias (Figura 13C). A variante 6 de proteína de PSCA é composta de 24,56 % de alfa hélice, 21,93 % de filamentos estendidos e 53,51 % de espirais aleatórias (Figura 13D).

Análise com relação à presença potencial de domínios transmembranares nas proteínas variantes de PSCA foi realizada usando uma variedade de algoritmos de previsão transmembranares acedidos a partir do servidor de biologia molecular (<http://www.expasy.ch/tools/>). Mostrados graficamente nas Figuras 13E, G, I e K estão os resultados de análises de variantes 1, 3, 4 e 6, respectivamente, usando o programa Tmpred. Mostrados graficamente nas Figuras 13F, H, J e L estão os resultados de análises de variantes 1, 3, 4 e 6, respectivamente usando o programa TMHIVIM. As proteínas variante 1 e variante 6 de PSCA provavelmente codificam proteínas ligadas a GPI. As variantes 3 e 4 provavelmente codificam proteínas solúveis, uma vez que elas não contêm previsões significativas para domínios transmembranares.

Exemplo 10: Geração de Anticorpos Policlonais contra o PSCA

Anticorpos policlonais podem ser estimulados num mamífero, por exemplo, através de uma ou mais injeções de um agente de imunização e, se for desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante serão injectados no mamífero através de injeções subcutâneas ou intraperitoneais múltiplas. Além de imunização com uma variante de proteína de PSCA de comprimento total, algoritmos de computador são utilizados no projecto de imunogénios que, baseado em análises de sequência de aminoácido, contêm características de serem antigénicos e estarem disponíveis para reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (veja-se o Exemplo intitulado "Perfis de Antigenicidade e Estruturas Secundárias"). Será previsto que tais regiões são hidrofílicas, flexíveis em conformações de beta-volta e estejam expostas sobre a

superfície da proteína (veja-se, por exemplo, Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-C, ou Figura 9A-C para perfis de aminoácidos que indicam tais regiões da variante 1 de proteína de PSCA).

Por exemplo, proteínas de fusão bacterianas recombinantes ou péptidos contendo regiões hidrofílicas, flexíveis, em beta-volta de variantes de proteína de PSCA são usadas como antígenos para gerar anticorpos policlonais em coelhos brancos New Zealand ou anticorpos monoclonais conforme descrito no Exemplo 11. Por exemplo, na variante 1 de PSCA, tais regiões incluem, mas não estão limitadas, os aminoácidos 28-56 e aminoácidos 66-94. Para a variante 3, tais regiões incluem, mas não estão limitadas, aos aminoácidos 7-39 e aminoácidos 70-94. Para a variante 4, tais regiões incluem, mas não estão limitadas, aos aminoácidos 6-18, aminoácidos 27-39, aminoácidos 103-133 e 177-189. Para a variante 6, tais regiões incluem, mas não estão limitadas, aos aminoácidos 19-35 e aminoácidos 57-85. É útil conjugar o agente de imunização a uma proteína conhecida por ser imunogênica no mamífero que está sendo imunizado. Exemplos de tais proteínas imunogênicas incluem, mas não estão limitados a, hemocianina da lapa californiana (KLH), albumina de soro, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Numa forma de realização, um péptido que codifica os aminoácidos 103-133 da variante 4 de PSCA é conjugado à KLH e usado para imunizar um coelho. Alternativamente, o agente de imunização pode incluir toda ou partes das proteínas variantes de PSCA, análogos ou proteínas de fusão das mesmas. Por exemplo, as sequências de aminoácido das variantes de PSCA podem ser fusionadas usando técnicas de ADN recombinante a qualquer uma de uma variedade de parceiros de proteína de fusão que são bem conhecidos na técnica, tais como proteínas de fusão glutatíon-S-transferase (GST) e proteína marcada com HIS. Numa forma de realização, os aminoácidos 18-98 da sequência

da variante 1 de PSCA sequência foram fusionados à GST usando técnicas recombinantes no vector de expressão pGEX, expressos, purificados e usados para imunizar coelhos e ratinhos para gerar anticorpos policlonais e monoclonais, respectivamente. Tais proteínas de fusão são purificadas de bactérias induzidas usando a matriz de afinidade apropriada.

Outras proteínas de fusão bacterianas recombinantes que podem ser utilizadas incluem proteína de ligação à maltose, LacZ, tioredoxina, NusA ou uma região constante de imunoglobulina (veja-se a secção intitulada "Produção de PSCA em Sistemas Procariotas" e *Current Protocols in Molecular Biology*, Volume 2, Unidade 16, Frederick M. Ausubul *et al.* eds., 1995; Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N. e Ledbetter, L. (1991) *J. Exp. Med.* 174, 561-566).

Além de proteínas de fusão derivadas de bactérias, antigénios de proteína expressos em mamífero também são usados. Esses antigénios são expressos a partir de vectores de expressão em mamífero, tais como os vectores Tag5 e Fc-Fusion (veja-se a secção intitulada "Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas") e retêm modificações pós-traducionais, tais como glicosilações encontradas na proteína nativa. Numa forma de realização, o ADNc da variante 1 de PSCA, menos o péptido líder N-terminal e âncora GPI C-terminal foi clonado no vector de secreção em mamíferos Tag5 e expresso em células 293T. A proteína recombinante foi purificada através de cromatografia em quelante de metal a partir de sobrenadantes de cultura tecidual de células 293T que expressam estavelmente o vector recombinante. A proteína de PSCA Tag5-purificada foi, então, usada como imunogénio.

Durante o protocolo de imunização, é útil misturar ou emulsificar o antigénio em adjuvantes que intensificam a resposta imune do animal hospedeiro. Exemplos de adjuvantes

incluem, mas não estão limitados a, adjuvante completo de Freund (CFA) e adjuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, trehalose de dicorinomicolato sintética).

Num protocolo típico, coelhos são inicialmente imunizados subcutaneamente com até 200 ng, tipicamente 100-200 µg, de proteína de fusão ou péptido conjugado à KLH misturados em adjuvante completo de Freund (CFA). Os coelhos são, então, injectados subcutaneamente a cada duas semanas com até 200 ng, tipicamente 100-200 µg, do imunogénio em adjuvante incompleto de Freund (IFA). Sangue para teste é colhido a aproximadamente 7-10 dias após cada imunização e usado para monitorizar a titulação de anti-soro através de ELISA.

Para testar a reactividade e especificidade do soro imune, tal como soro de coelho derivado de imunização com uma proteína de fusão-GST de variante 3 ou 4 de PSCA, o respectivo ADNc da variante de PSCA de comprimento total é clonado no vector de expressão pCDNA 3.1 myc-his (Invitrogen, veja-se o Exemplo intitulado "Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas"). Após transfecção das construções em células 293T, lisados de células são submetidos à sonda com o soro antivariante e com anticorpo anti-His (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) para determinar a reactividade específica à proteína variante desnaturada usando a técnica de Western blot. Além disso, o soro imune é testado através de microscopia por fluorescência, citometria de fluxo e imunoprecipitação contra células 293T e outras expressando variante de PSCA recombinante para determinar o reconhecimento específico da proteína nativa. As técnicas de Western blot, imunoprecipitação, microscopia por fluorescência e citometria de fluxo usando células que expressam endogenamente o PSCA são também realizadas para testar a reactividade e especificidade.

Anti-soros de coelhos imunizados com proteínas de fusão variantes de PSCA, tais como proteínas de fusão à GST e MBP, são purificados através de depleção de anticorpos reactivos à sequência do parceiro de fusão através de passagem sobre uma coluna de afinidade contendo o parceiro de fusão, quer sozinho ou no contexto de uma proteína de fusão irrelevante. Por exemplo, anti-soro derivado de uma proteína de fusão variante 1 de PS- CA-GST é primeiro purificado através de passagem sobre uma coluna de proteína GST covalentemente acoplada a uma matriz AffiGel (BioRad, Hercules, Calif.). O anti-soro é, então, purificado por afinidade através de passagem sobre uma coluna composta de uma proteína de fusão de PSCA- MBP covalentemente acoplada a uma matriz Affigel. O soro é, então, ainda purificado através de cromatografia por afinidade em proteína G para isolar a fracção de IgG. Soro de outros antigénios His-marcados e péptidos de coelhos imunizados, bem como soro sem o parceiro de fusão são purificados por afinidade através de passagem sobre uma matriz de coluna composta do imunogénio de proteína original ou péptido livre.

Exemplo 11: Geração de Anticorpos Monoclonais de PSCA (mAbs)

Numa forma de realização, mAbs terapêuticos às variantes de PSCA compreendem aqueles que reagem com epítomos específicos para cada proteína variante ou específicos às sequências em comum entre as variantes que romperiam ou modulariam a função biológica das variantes de PSCA, por exemplo, aquelas que romperiam a interacção com ligantes e parceiros de ligação. Imunogénios para a geração de tais mAbs incluem aqueles projectados para codificar ou conter a sequência toda da variante de proteína de PSCA, regiões das variantes de proteína de PSCA previstas por serem antigénicas através de análise por computador a partir de uma sequência de aminoácidos (veja-se, por exemplo, Figura 5A-C, Figura 6A-C, Figura 7A-C, Figura 8A-

C, ou Figura 9A-C e o Exemplo intitulado "Perfis de Antigenicidade"). Imunogénios incluem péptidos, proteínas bacterianas recombinantes e proteínas Tag 5 expressas em mamífero e proteínas de fusão IgG-FC humanas e de murino. Além disso, células manipuladas para expressar altos níveis da respectiva variante de PSCA, tais como a variante 4 de PSCA- 293T ou pré-células B de murino variante 4 de PSCA-300.19, são usadas para imunizar ratinhos.

Para gerar mAbs a uma variante de PSCA, ratinhos são primeiro imunizados intraperitonealmente (IP) com, tipicamente, 10-50 µg de imunogénio de proteína ou 10^7 células que expressam PSCA misturadas em adjuvante completo de Freund. Os ratinhos são, então, subsequentemente imunizados IP a cada 2-4 semanas com, tipicamente, 10-50 µg de imunogénio de proteína ou 10^7 células misturadas em adjuvante incompleto de Freund. Alternativamente, adjuvante MPL-TDM é usado em imunizações. Além das estratégias de imunização baseadas em proteínas e células acima, um protocolo de imunização baseado em ADN é utilizado no qual um vector de expressão em mamífero que codifica uma sequência de variante de PSCA é usado para imunizar ratinhos através de injeção directa do ADN de plasmídeo. Por exemplo, o ADNc completo da variante 4 de PSCA é clonado no vector de secreção em mamífero Tag5 e o vector recombinante e, então, será usado como imunogénio. Em outro exemplo, os mesmos aminoácidos são clonados num vector de secreção Fc-Fusão no qual a sequência da variante 4 de PSCA é fusionada no amino-término a uma sequência líder IgK e no carboxilo-término a uma sequência de codificação da região Fc de IgG humana ou de murino. Esse vector recombinante é, então, usado como imunogénio. Os protocolos de imunização com plasmídeo são usados em combinação com proteínas purificadas expressas a partir do mesmo vector e com células que expressam a respectiva variante de PSCA.

Durante o protocolo de imunização, sangue para teste é colhido 7-10 dias após as injeções para monitorizar a titulação e especificidade da resposta imune. Uma vez que a reactividade e especificidade são obtidas conforme determinado através de análises por ELISA, Western blotting, imunoprecipitação, microscopia por fluorescência e citometria de fluxo, geração de fusão e hibridoma é, então, realizada com procedimentos estabelecidos bem conhecidos na técnica (veja-se, por exemplo, Harlow e Lane, 1988).

Numa forma de realização para a geração de anticorpos monoclonais de PSCA, uma GST-fusão dos aminoácidos 1-189 que codificam o antigénio de variante 4 é expressa e, então, purificada a partir de células 293T estavelmente transfectadas. Ratinhos Balb C são inicialmente imunizados intraperitonealmente com 25 µg da GST- variante 4 de proteína de PSCA misturados em adjuvante completo de Freund. Os ratinhos são subsequentemente imunizados a cada duas semanas com 25 µg do antigénio misturado em adjuvante incompleto de Freund durante um total de três imunizações. ELISA usando o antigénio de fusão-GST e um produto da clivagem a partir do qual a porção GST é removida determinam a titulação do soro de ratinhos imunizados. A reactividade e especificidade do soro à variante 4 de proteína de PSCA de comprimento total são monitoradas através de Western blotting, imunoprecipitação e citometria de fluxo usando células 293T transfectadas com um vector de expressão que codifica o ADNc da variante 1 de PSCA (veja-se, por exemplo, o Exemplo intitulado "Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas"). Outras células que expressam variante 4 de PSCA recombinante ou células que expressam endogenamente a variante 4 de PSCA são também usadas. Ratinhos mostrando a reactividade mais forte são separados e fornecida uma injeção final de antigénio Tag5 em PBS e, então, sacrificados quatro dias depois. Os baços

dos ratinhos sacrificados são colhidos e fusionados a células de mieloma SPO/2 usando procedimentos padrão (Harlow e Lane, 1988). Os sobrenadantes de cavidades de desenvolvimento HAT-seleccionados são seleccionados através ELISA, Western blot, imunoprecipitação, microscopia por fluorescência e citometria de fluxo para identificar clones que produzem anticorpo específico contra PSCA.

Para gerar anticorpos monoclonais que são específicos para a variante 4 de proteína de PSCA, imunogénios são projectados para codificar uma sequência única a essa variante. Por exemplo, um péptido que codifica os aminoácidos 6-18 da variante 4 de PSCA é sintetizado, conjugados à KLH e usado como imunogénio. Sobrenadantes de hibridoma são, então, seleccionados sobre o antigénio peptídico e, então, adicionalmente seleccionados sobre células que expressam a variante 4 de proteína de PSCA e seleccionados sobre células que expressam as outras variantes de PSCA para derivar anticorpos monoclonais variante 4-específicos.

A afinidade de ligação do anticorpo monoclonal à variante de PSCA é determinada usando tecnologias padrão. Medições da afinidade quantificam a resistência do anticorpo à ligação ao epítopo e são usadas para ajudar a definir quais anticorpos monoclonais à variante de PSCA são preferidos para utilização diagnóstico ou terapêutico, conforme apreciado pelos peritos na especialidade. O sistema BIAcore (Uppsala, Suécia) é um método preferido para determinação da afinidade de ligação. O sistema BIAcore usa ressonância de plasmão em superfície (SPR, Welford K. 1991, *Opt. Quant. Elect.* 23: 1; Morton e Myszka, 1998, *Methods in Enzymology* 295: 268) para monitorizar interacções moleculares em tempo real. Análise por BIAcore gera, convenientemente, constantes de taxa de associação, constantes de taxa de dissociação, constantes de dissociação em equilíbrio e constantes de afinidade.

Exemplo 12: Polinucleótidos Complementares

Sequências complementares às sequências de codificação de PSCA ou qualquer parte das mesmas são usadas para detectar, diminuir ou inibir a expressão de PSCA que ocorre naturalmente. Embora a utilização de oligonucleótidos que compreendem de cerca de 15 a 30 pares de base seja descrito, essencialmente o mesmo procedimento é usado com fragmentos de sequências menores ou maiores. Oligonucleótidos apropriados são projectados usando, por exemplo, o software OLIGO 4.06 (National Biosciences) e a sequência de codificação de PSCA. Para inibir a transcrição, um oligonucleótido complementar é projectado a partir da sequência 5' única e usado para impedir a ligação de promotor a uma sequência de codificação. Para inibir a tradução, um oligonucleótido complementar é projectado para impedir ligação ribossómica a um transcrito que codifica PSCA.

Exemplo 13: Purificação de PSCA que Ocorre Naturalmente ou Recombinante Usando Anticorpos Específicos contra PSCA

PSCA que ocorre naturalmente ou recombinante é substancialmente purificado através cromatografia por imunoafinidade usando anticorpos específicos para PSCA. Uma coluna de imunoafinidade é construída através de acoplamento covalente de anticorpo anti-PSCA a uma resina cromatográfica activada, tal como SEPHAROSE CNBr-activada (Amersham Pharmacia Biotech). Após o acoplamento, a resina é bloqueada e lavada de acordo com as instruções do fabricante.

Meios que contêm PSCA são passados sobre a coluna de imunoafinidade e a coluna é lavada sob condições que permitem a absorção preferencial de PSCA (por exemplo, tampões com elevada resistência iónica na presença de detergente). A coluna é eluída sob condições que rompem a ligação anticorpo/PSCA (por exemplo, um tampão com pH de 2 a um pH de 3 ou uma elevada concentração de um agente

caotrópico, tal como um ião de ureia ou tiocianato) e GCR.P é colhida.

Exemplo 14: Ensaio *in vivo* para Promoção do Crescimento de Tumor por PSCA v.4

O efeito da proteína de PSCA v.4 sobre o desenvolvimento de células tumorais é avaliado *in vivo* através de avaliação do desenvolvimento de tumor e desenvolvimento de células que expressam ou carecem de PSCA v.4. Por exemplo, ratinhos SCID são injectados subcutaneamente sobre cada flanco com 1×10^6 de linhas de células cancerígenas 3T3, de próstata (por exemplo, células PC3), de bexiga (por exemplo, células UM- UC3) ou de pâncreas (por exemplo, células PANC1) contendo o vector vazio tkNeo ou PSCA v.4. Pelo menos duas estratégias podem ser usadas: (1) Expressão constitutiva de PSCA v.4 sob regulação de um promotor, tal como um promotor constitutivo obtido a partir dos genomas de vírus tais como poliovírus, vírus da caxumba (UK 2.211.504 publicada em 5 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), papiloma vírus bovino, vírus do sarcoma em aves, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite-B e Vírus de símio 40 (SV40), ou de promotores heterólogos de mamífero, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras e (2) Expressão regulada sob o controlo de um sistema de vector induzível, tal como ecdisona, tetraciclina, etc., contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de células hospedeiras. O volume do tumor é, então, monitorado através de medição do calibre no caso de tumores palpáveis e acompanhando ao longo do tempo para determinar se células que expressam PSCA v.4 se desenvolvem numa taxa mais rápida e se tumores produzidos por células que expressam PSCA v.4 demonstram características de agressividade alterada (por

exemplo, metástase intensificada, vascularização, responsividade reduzida a fármacos quimioterapêuticos).

Adicionalmente, ratinhos podem ser implantados com 1×10^5 das mesmas células ortotopicamente para determinar se a PSCA v.4 tem um efeito sobre o desenvolvimento local no pâncreas e se a PSCA v.4 afecta a capacidade das células de formar metástases especificamente em gânglios linfáticos e osso (Miki T *et al.*, *Oncol Res.* 2001; 12: 209; Fu X *et al.*, *Int. J Cancer.* 1991, 49: 938). O efeito da PSCA v.4 sobre a formação e desenvolvimento de tumor ósseo pode ser avaliado através injeção de células tumorais intratibialmente.

O ensaio é também útil para determinar o efeito inibitório da PSCA v.4 em composições terapêuticas candidatas tal como, por exemplo, intracórpore de PSCA v.4, moléculas antissenso de PSCA v.4 e ribozimas.

Exemplo 15: Inibição Mediada por Anticorpo Monoclonal contra PSCA v.4 de Tumores *In Vivo*

A expressão significativa de PSCA v.4 em tecidos cancerígenos, junto com sua expressão limitada em tecidos normais torna o PSCA v.4 um bom alvo para terapêutica com anticórpore. Similarmente, o PSCA v.4 é um alvo para imunoterapia baseada em células T. Assim, a eficácia terapêutica de mAbs anti-PSCA v.4 em modelos em ratinhos de xenoenxerto de cancro humano, incluindo próstata, bexiga e pâncreas (por exemplo, células PANC1) e outros cancros - PSCA v.4 listados no Quadro 1, é avaliada através de utilização de linhas de células recombinantes, tais como PC3-PSCA v.4, UM-UC3-PSCA v.4, PANC1-PSCA v.4 e 3T3-PSCA v.4 (veja-se, por exemplo, Kaighn, M.E. *et al.*, *Invest Urol*, 1979. 17(1): 16-23), bem como modelos de xenoenxerto humano (Saffran *et al.* *PNAS* 1999, 10: 1073-1078).

A eficácia de anticorpo sobre o crescimento do tumor e formação metástase é estudada, por exemplo, em modelos de xenoenxerto de cancro ortotópico de ovário, pâncreas ou sangue. Os anticórpore podem ser não conjugados, conforme

discutido nesse Exemplo ou podem ser conjugados a uma forma de realização terapêutica, conforme apreciado na técnica. mAbs anti- PSCA v.4 inibem a formação de tumores em xenoenxertos de ratinho. mAbs anti-PSCA v.4 também retardaram o desenvolvimento de tumores ortotópicos estabelecidos e prolongaram a sobrevivência de ratinhos abrigando tumor. Esses resultados indicam a utilidade de mAbs anti-PSCA v.4 no tratamento de vários tumores sólidos e locais em estágios avançados. (Veja-se, por exemplo, Saffran, D. et al., PNAS 10: 1073-1078 ou world wide web URL nas.org/cgi/doi/10,1073/pnas.051624698).

A administração dos mAbs anti-PSCA v.4 levou ao retardo do crescimento ortotópico do tumor e inibição de metástase em locais distantes, resultando em prolongamento significativo da sobrevivência de ratinhos abrigando tumor. Esses estudos indicam a PSCA v.4 como um alvo atraente para imunoterapia e demonstram o potencial terapêutico de mAbs anti-PSCA v.4 para o tratamento de cancro local e metastático. Esse exemplo indica que anticorpos monoclonais PSCA v.4 não conjugados são eficazes para inibir o desenvolvimento de xenoenxertos de tumor pancreático, ovariano e linfomas humanos desenvolvidos em ratinhos SCID; conseqüentemente uma combinação de tais anticorpos monoclonais eficazes também é eficaz.

Inibição de tumor usando mAbs contra PSCA v.4 não conjugados múltiplos

Materiais e Métodos

Anticorpos monoclonais contra PSCA v.4:

Anticorpos monoclonais são estimulados contra PSCA v.4 conforme descrito no Exemplo intitulado "Geração de anticorpos monoclonais contra PSCA v.4 (mAbs)". Os anticorpos são caracterizados através ELISA, Western blot, FACS e imunoprecipitação com relação à sua capacidade de se ligar ao PSCA v.4. Os dados de mapeamento de epítipo para os mAbs anti- PSCA v.4, conforme determinado através de

ELISA e análise de Western, reconhecem epítomos sobre a proteína de PSCA v.4. Análise imunohistoquímica de tecidos e células cancerígenas com esses anticorpos é realizada.

Os anticorpos monoclonais são purificados a partir de ascites ou sobrenadantes de cultura tecidual de hibridoma através de cromatografia em Proteína-G Sepharose, submetidos à diálise contra PBS, filtrados estéreis e armazenados a -20°C . As determinações de proteína são realizadas através de um ensaio de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Um anticorpo monoclonal terapêutico ou um coquetel que compreende uma mistura de anticorpos monoclonais individuais é preparada e usada para o tratamento de ratinhos que receberam injeções subcutâneas ou ortotópicas de xenoenxertos de tumor PC3, UM-UC3, CaKi e A427.

Linhas de células e xenoenxertos

O xenoenxerto LAPC-9, o qual expressa um receptor de androgénio do tipo silvestre e produz antigénio específico a próstata (PSA), é passado para ratinhos imunodeficientes combinados ICR-grave (SCID) machos de 6 a 8 semanas de idade (Taconic Farms) através de implante s.c. no tronco (Craft, N. *et al.*, 1999, Cancer Res. 59: 5030-5036). Os xenoenxertos de rim AGS-K3 e AGS-K6 são também passados através de implantes subcutâneos para ratinhos SCID de 6 a 8 semanas de idade. Suspensões com células simples de células tumorais são preparadas, conforme descrito em Craft *et al.*.

As linhas de células cancerígenas PC3, UM-UC3 e PANC1, bem como a linha de fibroblasto NIH 3T3 (Colecção Americana de Culturas Celulares). A linha de células de carcinoma de próstata PC3 é mantida em RPMI suplementado com L-glutamina e 10 % de FBS e as linhas de carcinoma de bexiga e pâncreas, UM-UC3 e PANC1, respectivamente, são mantidas em DMEM suplementado com L-glutamina e 10 % de FBS. Populações de células PC3-PSCA v.4, UM-UC3-PSCA v.4, PANC1-PSCA v.4 e

3T3-PSCA v.4 são geradas através de transferência de gene retroviral, conforme descrito em Hubert, R.S. *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci USA, 1999; 96 (25): 14523.

Modelos de Xenoenxerto em Ratinho

Tumores subcutâneos (s.c.) são gerados através de injeção de 2×10^6 células cancerígenas misturadas numa diluição a 1:1 com Matrigel (Collaborative Research) no flanco direito de ratinhos machos SCID. Para testar a eficácia do anticorpo sobre a formação de tumor, essas injeções de anticorpo são iniciadas no mesmo dia que as injeções de células tumorais. Como um controlo, os ratinhos são injectados com IgG de ratinho purificada (ICN) ou PBS; ou um anticorpo monoclonal purificado que reconhece um antigénio irrelevante não expresso em células humanas. Em estudos preliminares, nenhuma diferença é encontrada entre a IgG de ratinho ou PBS sobre o crescimento do tumor. Os tamanhos do tumor são determinados através de medições do calibre e o volume do tumor é calculado como comprimento x largura x altura. Os ratinhos com tumores subcutâneos maiores do que 1,5 cm de diâmetro são sacrificados.

Injeções ortotópicas são realizadas sob anestesia através de utilização de cetamina/xilazina. Para estudos ortotópicos da próstata, uma incisão é feita através dos músculos abdominais para expor a bexiga e vesículas seminais, as quais são, então, distribuídas através de incisão para expor a próstata dorsal. Células LAPC-9 (5×10^5) misturadas com Matrigel são injectadas em cada lóbulo dorsal num volume de 10 μ l. Para monitorizar o crescimento do tumor, o sangue de ratinhos é colhido numa base semanal para determinação dos níveis de PSA. Para o modelo ortotópico do pâncreas, uma incisão é feita através dos músculos abdominais para expor os tecidos mamários e uma única suspensão de células de cancro do pâncreas é injectada no tecido mamário. Para o modelo ortotópico da bexiga, tecido de cancro de bexiga AGS-B1 é aderido sobre a

parede da bexiga. Após implante do tumor, os ratinhos são segregados em grupos para os tratamentos apropriados, com mAbs anti-PSCA v.4 ou de controlo sendo injectados i.p. Para monitorizar o crescimento do tumor, os ratinhos são apalpadados e o sangue é colhido numa base semanal para medir os níveis de hCG.

mAbs anti-PSCA v.4 Inibem o Desenvolvimento de Tumores de Cancro em Xenoenxerto Que Expressam PSCA v.4

O efeito de mAbs anti-PSCA v.4 sobre a formação de tumor é testado usando uma linha de células (por exemplo, PC3, UM-UC3, PANC1 e 3T3) e modelos ortotópicos de tumor derivado do paciente. Quando comparado ao modelo de tumor s.c., o modelo ortotópico, o qual requer injeção de células tumorais directamente nos órgãos do ratinho resulta num crescimento local do tumor, desenvolvimento de metástase em locais distais, deterioração da saúde do ratinho e subsequente morte (Saffran, D. *et al.*, PNAS supra). As características tornam o modelo ortotópico mais representativo da progressão da doença humana e nos permite acompanhar o efeito terapêutico de mAbs sobre critérios de avaliação clinicamente relevantes.

Uma vantagem principal de modelos de cancro ortotópicos é a capacidade de estudar o desenvolvimento de metástases. A formação de metástase em ratinhos abrigando tumores ortotópicos estabelecidos é estudada através de análise por IHC sobre seções pulmonares usando um anticorpo contra uma proteína da superfície celular específico a tumor, tal como anti-CK20 para cancro de próstata (Lin S *et al.*, Cancro Detectar Prev. 2001; 25: 202).

Outra vantagem de modelos de cancro em xenoenxerto é a capacidade de estudar a neovascularização e angiogénese. O crescimento do tumor é parcialmente dependente do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos. Embora o sistema de capilares e diclorometano de uma rede sanguínea seja de origem do hospedeiro, o início e arquitectura da

neovasculatura é regulada pelo tumor em xenoenxerto (Davidoff AM *et al.*, Clin Cancer Res. 2001; 7: 2870; Solesvik O *et al.*, Eur. J Cancro Clin Oncol. 1984, 20: 1295). O efeito de anticorpos e moléculas pequenas sobre a neovascularização é estudado de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, tais como através de análise por IHC de tecidos tumorais e seu microambiente circundante.

A ratinhos abrigando tumores ortotópicos estabelecidos são administradas injeções de 1000 pg de mAb anti-PSCA v.4 ou PBS durante um período de 4 semanas. Os ratinhos em ambos os grupos são deixados estabelecer uma elevada carga de tumor, para assegurar uma alta frequência de formação de metástase nos pulmões dos ratinhos. Os ratinhos são, então, mortos e suas bexigas, fígados, ossos e pulmões são analisados com relação à presença de células tumorais através de análise por IHC. Esses estudos demonstram uma eficácia antitumoral ampla de anticorpos anti-PSCA v.4 sobre o início e progressão de cancro de próstata em modelos de xenoenxerto em ratinhos. Anticorpos anti-PSCA v,4 inibem a formação de tumores, bem como retardam o desenvolvimento de tumores já estabelecido e prolongam a sobrevivência de ratinhos tratados. Além disso, mAbs anti-PSCA v.4 demonstram um efeito inibitório dramático sobre a disseminação do tumor de próstata local para locais distais mesmo na presença de uma grande carga de tumor. Assim, mAbs anti- PSCA v.4 são eficazes sobre os principais critérios de avaliação clinicamente relevantes (crescimento do tumor), prolongando a sobrevivência e saúde.

Exemplo 16: Utilização Terapêutica e de Diagnóstico de Anticorpos Anti-PSCA em Seres Humanos

Anticorpos monoclonais anti-PSCA são segura e eficazmente usados para fins diagnósticos, profiláticos, prognósticos e/ou terapêuticos em seres humanos. Análise por Western blot e imunohistoquímica de tecidos cancerígenos e xenoenxertos cancerígenos com mAb anti-PSCA

mostrou forte coloração extensiva no carcinoma, mas níveis significativamente menores ou indetectáveis em tecidos normais. A detecção de PSCA em carcinoma e em doença metastática demonstra a utilidade do mAb como um indicador diagnóstico e/ou prognóstico. Anticorpos anti-PSCA são, portanto, usados em aplicações diagnósticas, tais como imunohistoquímica de amostras de biopsia de rim para detectar cancro em pacientes.

Conforme determinado através de citometria de fluxo, mAb anti- PSCA se ligam especificamente a células de carcinoma. Assim, anticorpos anti-PSCA são usados em aplicações diagnósticas de formação de imagem de um corpo todo, tais como radioimunocintigrafia e radioimunoterapia (veja-se, por exemplo, Potamianos S. et al., *Anticancer Res* 20 (2A): 925-948 (2000)) para a detecção de cancros localizados e metastáticos que exibem expressão de PSCA. A protecção ou liberação de um domínio extracelular de PSCA no meio extracelular, tal como aquela observada para fosfodiesterase B10 alcalina (Meerson, N. R., *Hepatology* 27: 563-568 (1998)), permite a detecção diagnóstica de PSCA por anticorpos anti-PSCA no soro e/ou amostras de urina de pacientes.

Anticorpos anti-PSCA que se ligam especificamente ao PSCA são usados em aplicações terapêuticas para o tratamento de cancros que expressam PSCA. São usados anticorpos anti-PSCA como uma modalidade não conjugada e como forma conjugada em que os anticorpos se ligam a uma ou diversas modalidades terapêuticas ou de formação de imagens bem conhecidas na técnica, tais como pró-fármacos, enzimas ou radioisótopos. Em estudos pré-clínicos, ensaiam-se anticorpos anti-PSCA conjugados e não conjugados com respeito a eficácia de prevenção tumoral e inibição de crescimento nos modelos de xenotransplante de cancro de ratinho SCID, por exemplo, modelos de cancro de rim AGS-K3 e AGS-K6 (veja-se, por exemplo, o Exemplo titulado

“Inibição mediada por anticorpo monoclonal contra PSCA de tumores de bexiga e pulmão *in vivo*”). São usados anticorpos anti-PSCA conjugados e não conjugados como uma modalidade terapêutica em ensaios clínicos humanos em separado ou em combinação com outros tratamentos como é descrito nos seguintes Exemplos.

Exemplo 17: Ensaio clínico Humano: Formação de Imagem Diagnóstica com Anticorpo Anti-PSCA

Um ensaio clínico humano é conduzido referente à utilização de anticorpos anti-PSCA como um agente de formação de imagem diagnóstica. O protocolo é projectado de uma maneira substancialmente similar àquela descrita na técnica, tal como em Divgi *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 83: 97-104 (1991). Verificou-se que os anticorpos são seguros e eficazes quando usados como uma modalidade diagnóstica.

Exemplo 18: Comparação de Homologia de PSCA v.4 a Sequências Conhecidas:

O gene da PSCA v.4 codifica uma proteína de 189 aa. A proteína de PSCA v.4 humana exhibe um alto grau de homologia ao antigénio de células estaminais da próstata humana (gi 27482160), exibindo 98 % de identidade à PSCA v.4 a nível de proteína (Figura 4). O homólogo de PSCA v.4 de ratinho não foi identificado.

A proteína de PSCA v.4 tem diversas variantes (Figura 11). Essas incluem 8 SNPs e uma variante com divisão, referida como PSCA v.3. A proteína de PSCA v.3 abrange a porção C-terminal da PSCA v.4 e corresponde aos aa 94-189 dessa variante. Análise por bioinformática usando programas de previsão de topologia indicam que a PSCA v.4 é uma proteína solúvel sem domínios transmembranares (Quadro III).

Análise de motivos revelou a presença de dois motivos funcionais de proteína na proteína de PSCA v.4 (Quadro III), isto é, um motivo de caderina e um domínio de granulina foram identificados. Caderinas pertencem a uma

família de moléculas de adesão celular cálcio-dependentes. Elas são proteínas transmembranares simples contendo domínios semelhantes à imunoglobulina e estão envolvidas em adesão e rastreo celular (Shan *et al.*, *Biophys Chem* 1999, 82: 157). Por exemplo, as caderinas medeiam a adesão celular específica a tecido de linfócitos à superfície de células epiteliais. Mostrou-se que as caderinas funcionam na morfogênese tecidual, adesão celular, diferenciação celular, migração celular e metástase de tumor (Yap AS, Kovacs EM. *J Biol Chem* 2003, 160: 11; Vestweber D. *Curr Opin Cell Biol* 2002, 14: 587; Bloom *et al.*, *Mol Biol Cell* 1999, 10: 1521; Brodt P. *Cancro Met Rev* 1991, 10: 23). As granulinas ou epitelinas são factores do crescimento originalmente purificados de meios condicionados a célula, que mostram intensificar a proliferação celular (Xu, S. Q. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 20078). As granulinas são expressas em níveis elevados em vários cancros, incluindo gliomas e cancro renal (Liau L *et al.*, *Cancer Res.* 60: 1353, Donald, C. D *et al.*, *Anticancer Res.* 21: 3739).

Os motivos encontrados em PSCA v.4 indicam que o PSCA v.4 pode participar no crescimento e progressão de tumor através de regulação da proliferação celular, adesão celular, comunicação celular, invasão e metástase.

Consequentemente, quando o PSCA v.4 funciona como um regulador do estabelecimento de tumor, crescimento do tumor, invasão de tumor, sobrevivência ou sinalização celular, o PSCA v.4 é usado para fins terapêuticos, diagnósticos, prognósticos e/ou preventivos. Além disso, quando uma molécula, tal como uma variante com divisão ou PSCA v.4 de SNP é expresso em tecidos cancerígenos, tais como aqueles listados no Quadro I, eles são usados para fins terapêuticos, diagnósticos, prognósticos e/ou preventivos.

Exemplo 19: Regulação de Transcrição

A localização mitocondrial do PSCA v.4 acoplado à presença de domínios de caderina dentro de sua sequência indica que o PSCA v.4 modula a regulação transcricional de genes eucariotas. A regulação de expressão do gene é confirmada, por exemplo, através de estudo da expressão do gene em células que expressam ou carecendo de PSCA v.4. Para essa finalidade, dois tipos de experiências são realizadas.

No primeiro conjunto de experiências, ARN de células originais e expressando PSCA v.4 é extraído e hibridado a conjuntos de genes comercialmente disponíveis (Clontech) (Smid-Koopman, E. et al., Br J Cancer 2000. 83: 246). Células em repouso, bem como células tratadas com FBS, androgénio ou factores do crescimento são comparadas. Genes diferencialmente expressos são identificados de acordo com procedimentos conhecidos na técnica. Os genes diferencialmente expressos são, então, mapeados em vias biológicas (Chen, K. et al., Thyroid 2001; 11: 41).

No segundo conjunto de experiências, a activação de vias transcricionais específicas é avaliada usando construções repórteres de luciferase comercialmente disponíveis (Stratagene), incluindo: NFkB-luc, SRE-luc, ELK1-luc, ARE-luc, p53-luc e CRE-luc. Esses repórteres transcricionais contêm locais de ligação de consenso para factores de transcrição conhecidos que repousam a jusante de vias de transdução de sinal bem caracterizadas e representam uma boa ferramenta para determinar a activação de vias e rastrear moduladores de activação de vias positivos e negativos.

Assim, o PSCA v.4 exerce um papel em regulação genética e é usado como um alvo para fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos.

Exemplo 20: Identificação e Confirmação de Vias Potenciais de Transdução de Sinal

Muitas proteínas de mamífero foram relatadas como interagindo com moléculas de sinalização e participando na regulação de vias de sinalização (J Neurochem. 2001; 76: 217-223). Moléculas de caderina foram associados à sinalização de Cdc42 e Rho (Kouklis J Biol Chem. 2003, 278: 16230). Usando técnicas de imunoprecipitação e Western blotting, são identificadas proteínas que se associam ao PSCA v.4 e medeiam eventos de sinalização. Várias vias conhecidas por exercer um papel na biologia do cancro podem ser reguladas pelo PSCA v.4, incluindo vias de fosfolípido, tais como PI3K, AKT, etc., vias de adesão e migração, incluindo FAK, Rho, Rac-1, catenina, etc., bem como cascatas mitogénicas/de sobrevivência, tais como ERK, p38, etc, (Growth Cellular Differ. 2000, 11: 279; J Biol Chem. 1999, 274: 801; Oncogene. 2000, 19: 3003, J. Cell Biol. 1997, 138: 913). De forma a determinar se a expressão de PSCA v.4 é suficiente para regular vias de sinalização específicas não de outro modo activas em células cancerígenas em repouso, o efeito da PSCA v.4 sobre a activação da cascata de sinalização é investigada nas linhas de células cancerígenas PA-1, Panei e Daudi. Células cancerígenas expressando estavelmente PSCA v.4 ou neo são estimuladas com factor do crescimento, FBS ou outras moléculas de activação. Lisados de células inteiras são analisados através de Western blotting.

Para confirmar que o PSCA v.4 activa, directa ou indirectamente, vias de transdução de sinal conhecidas" em células, ensaios baseados no repórter transcricional luciferase (luc) são realizados em células que expressam genes individuais. Esses repórteres transcricionais contêm locais de ligação de consenso para factores de transcrição conhecidos que repousam a jusante de vias de transdução de sinal bem caracterizadas. Os repórteres e exemplos desses factores de transcrição associados, vias de transdução de sinal e estímulos de activação são listados abaixo.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-cinase/SAPK;
desenvolvimento/apoptose/estresse
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK;
desenvolvimento/diferenciação
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC;
desenvolvimento/apoptose/estresse
4. ARE-luc, receptor de androgénio; esteróides/MAPK;
desenvolvimento/diferenciação/apoptose
5. p53-luc, p53; SAPK;
desenvolvimento/diferenciação/apoptose
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38;
desenvolvimento/apoptose/estresse
7. TCF-luc, TCF/Lef; -catenina, adesão/invasão

Efeitos mediados por gene podem ser ensaiados em células mostrando expressão de ARNm. Plasmídeos repórteres de luciferase podem ser introduzidos através de transfecção mediada por lípido (TFX-50, Promega). A actividade de luciferase, um indicador de actividade transcricional relativa, é medida através de incubação de extractos de células com substrato de luciferina e a luminescência da reacção é monitorada num luminómetro.

Vias de sinalização activadas pelo PSCA v.4 são mapeadas e usadas para a identificação e validação de alvos terapêuticos. Quando o PSCA v.4 está envolvido em sinalização celular, ele é usado como alvo para fins diagnósticos, prognóstico, preventivos e/ou terapêuticos.

Exemplo 21: Envolvimento em Progressão de tumor

Baseado no papel de motivos de granulina e caderina no desenvolvimento celular, adesão e interações de proteína, o gene PSCA v.4 pode contribuir para o desenvolvimento, adesão, invasão e transformação de células cancerígenas. O papel da PSCA v.4 em crescimento do tumor é confirmado numa variedade de linhas de células primárias e transfectadas, incluindo linhas de células de próstata, bem como células NIH 3T3 manipuladas para expressar estavelmente o PSCA v.4.

Células originais que carecem de PSCA v.4 e células que expressam PSCA v.4 são avaliadas com relação ao desenvolvimento celular usando um ensaio de proliferação bem documentado (Fraser SP, Grimes JA, Djamgoz MB., *Prostate* 2000; 44: 61, Johnson DE, Ochieng J, Evans SL., *Anticancer Drugs* 1996, 7: 288).

Para confirmar o papel do PSCA v.4 no processo de transformação, seu efeito em ensaios de formação de colônia é investigado. Células NIH-3T3 originais que carecem de PSCA v.4 são comparadas a células NIH- 3T3 expressando PSCA v.4, usando um ensaio de ágar macio sob condições restritivas e mais permissivas (Song Z. *et al.*, *Cancer Res.* 2000; 60: 6730).

Para confirmar o papel da PSCA v.4 em invasão e metástase de células cancerígenas, um ensaio bem estabelecido é usado, por exemplo, um ensaio Transwell Insert System (Becton Dickinson) (*Cancer Res.* 1999; 59: 6010). Células de controle, incluindo linhas de células de próstata, pâncreas e rim carecendo de PSCA v.4 são comparadas a células que expressam PSCA v.4. As células são carregadas com o corante fluorescente, calceína, e colocadas em cavidade superior do inserto transcavidade revestido com um análogo de membrana de base. A invasão é determinada pela fluorescência de células na câmara inferior com relação à fluorescência da população de células toda.

O PSCA v.4 também pode exercer um papel no ciclo e apoptose celular. Células originais e células que expressam PSCA v.4 são comparadas com relação a diferenças na regulação do ciclo celular usando um ensaio BrdU bem estabelecido (Abdel-Malek ZA. *J Cell Physiol.* 1988, 136: 247). Em resumo, células desenvolvidas sob condições ótimas (muito soro) e limitativas (pouco soro) são marcadas com BrdU e coradas com Ab anti-BrdU e iodeto de propídio. As células são analisadas com relação à entrada

nas fases G1, S e G2M do ciclo celular. Alternativamente, o efeito do estresse sobre a apoptose é avaliado em células originais de controlo e células que expressam PSCA v.4, incluindo células de tumor de próstata e normais. Células manipuladas e originais são tratadas com vários agentes quimioterapêuticos, tais como etoposido, taxol, etc. e inibidores de síntese de proteína, tal como cicloheximida. As células são coradas com V-FITC anexina e a morte celular é medida através de análise por FACS. A modulação de morte celular pelo PSCA v.4 pode exercer um papel crítico na regulação da progressão de tumor e carga do tumor.

Quando o PSCA v.4 exerce um papel no desenvolvimento, transformação, invasão ou apoptose celular, ele é usado como um alvo para fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos.

Exemplo 22: Envolvimento em Angiogénese

A angiogénese ou formação de novos vasos sanguíneos capilares é necessária para o crescimento do tumor (Hanahan D, Folkman J. Cell 1996, 86: 353; Folkman J. Endocrinology, 1998 139: 441). Vários ensaios foram desenvolvidos para medir a angiogénese *in vitro* e *in vivo*, tais como os ensaios de cultura tecidual de formação de tubo de células endoteliais e proliferação de células endoteliais. Usando esses ensaios, bem como neo-vascularização *in vitro*, o papel do PSCA v.4 em intensificação ou inibição de angiogénese é confirmado.

Por exemplo, células endoteliais manipuladas para expressar PSCA v.4 são avaliadas usando ensaios de formação e proliferação em tubo. O efeito da PSCA v.4 é também confirmado em modelos com animais *in vivo*. Por exemplo, células que expressam ou carecendo de PSCA v.4 são implantadas subcutaneamente em ratinhos imunocomprometidos. A migração e angiogénese de células endoteliais são avaliadas 5-15 dias depois usando técnicas de imunohistoquímica. O PSCA v.4 afecta a angiogénese e é

usado como um alvo para fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos.

Exemplo 23: Envolvimento em Interações Proteína-Proteína

Mostrou-se que motivos de caderina medeiam a interacção com outras proteínas. Usando técnicas de imunoprecipitação, bem como sistemas com dois híbridos de levedura, são identificadas proteínas que associam com o PSCA v.4. Imunoprecipitados de células que expressam PSCA v.4 e células carecendo de PSCA v.4 são comparadas com relação a associações proteína-proteína específicas.

Estudos são realizados para confirmar a extensão da associação de PSCA v.4 com moléculas efectoras, tais como proteínas nucleares, factores de transcrição, cinases, fosfatos, etc. Estudos comparando células PSCA v.4 positivas e PSCA v.4 negativas, bem como estudos comparando células não estimuladas/em repouso e células tratadas com activadores de células epiteliais, tais como citocinas, factores do crescimento, androgénios e anti-integrina Ab revelam interacções únicas.

Além disso, interacções proteína-proteína são confirmadas usando metodologia com dois híbridos de levedura (Curr Opin Chem Biol. 1999, 3: 64). Um vector trazendo uma biblioteca de proteínas fusionadas ao domínio de activação de um factor de transcrição é introduzido em levedura expressando uma proteína de fusão de ADN de PSCA v.4-domínio de ligação e uma estrutura repórter. A interacção proteína-proteína é detectada pela actividade colorimétrica do repórter. A associação específica com moléculas efectoras e factores de transcrição orienta aqueles habilitados quanto ao modo de acção da PSCA v.4 e, assim, identifica alvos terapêuticos, prognósticos, preventivos e/ou diagnósticos para cancro. Esse e ensaios similares são também usados para identificar e seleccionar moléculas pequenas que interagem com o PSCA v.4.

Assim, descobriu-se que o PSCA v.4 se associa a proteínas e moléculas pequenas. Consequentemente, o PSCA v.4 e essas proteínas e moléculas pequenas são usadas para fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos.

Exemplo 24: Envolvimento de PSCA v.4 em comunicação célula-célula

A comunicação célula-célula é essencial na manutenção de integridade de órgãos e homeostase, ambos os quais se tornam desregulados durante formação e progressão de tumor. Baseado na presença de um motivo de caderina em PSCA v.4, um motivo conhecido por estar envolvido em interação celular e adesão célula-célula, o PSCA v.4 pode regular comunicação celular. Comunicações intercelulares podem ser medidas usando dois tipos de ensaios (J. Biol. Chem. 2000, 275: 25207). No primeiro ensaio, células carregadas com um corante fluorescente são incubadas na presença de células recipientes não marcadas e as populações de células são examinadas sob um microscópio fluorescente. Esse ensaio qualitativo mede a troca de corante entre células adjacentes. No segundo sistema de ensaio, populações de células doadoras e recipientes são tratadas conforme acima e medições quantitativas da população de células recipientes são realizadas através de análise por FACS. Usando esses dois sistemas de ensaio, células que expressam PSCA v.4 são comparadas a controles que não expressam PSCA v.4 e descobriu-se que o PSCA v.4 intensifica as comunicações celulares. Moléculas pequenas e/ou anticorpos que modulam a comunicação célula-célula mediada por PSCA v.4 são usadas como produtos terapêuticos para cânceros que expressam PSCA v.4. Quando o PSCA v.4 funciona em comunicação célula-célula e transporte de moléculas pequenas, ele é usado como um alvo ou marcador para fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos.

Ao longo do presente pedido, vários conteúdos de dados de website, publicações, pedidos de patente e patentes são mencionados. (Websites são mencionados por seu endereço de Uniform Resource Locator, ou URL, na World Wide Web). Além disso, o presente pedido refere-se ao N° de Série U.S. 09/359.326, depositado em 20 de Julho de 1999; N° de Série U.S. 09/308.503, depositado em 25 de Maio de 1999; N° de Série U.S. 09/251.835, depositado em 17 de Fevereiro de 1999; N° de Série U.S. 09/203.939, depositado em 2 de Dezembro de 1998; N° de Série U.S. 09/038.261, depositado em 10 de Março de 1998; N° de Série U.S. 08/814,279, depositado em 10 de Março de 1997; N° de Série U.S. 60/071.141 depositado em 12 de Janeiro de 1998; N° de Série U.S. 60/ 074.675, depositado em 13 de Fevereiro de 1998; U.S. N° de Série 60/124.658, depositado em 16 de Março 1999; N° de Série U.S. 60/120.536 depositado em 17 de Fevereiro de 1999; e 60/113.230 depositado em 21 de Dezembro de 1998.

QUADROS:

QUADRO I: Tecidos que Expressam PSCA:

a. Tecido Malignos

Próstata

Pâncreas

Bexiga

Rim

Cólon

Pulmão

Ovário

Mama

b. Tecidos Normais

Quadro II: Abreviaturas de Aminoácidos

UMA LETRA	TRÊS	NOME COMPLETO
F	Phe	fenilalanina

UMA LETRA	TRÊS	NOME COMPLETO
L	Leu	leucina
S	Ser	serina
E	Tyr	tirosina
C	Cys	cisteína
W	Trp	triptofano
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 glutâmico
G	Gly	Glicina

Quadro III: Características da Proteínas de PSCA v. 420

PSCA v.4	Programa Bioinformático	URL	Resultado
ORF	ORF finder		570 pb
Comprimento da Proteína			189 aa
Região Transmembranar	TM Pred	<a href="http://www.ch.em
bnet.org/">http://www.ch.em bnet.org/	sem TM
	HMMTop	<a href="http://www.enzim
.hu/
hmmtop/">http://www.enzim .hu/ hmmtop/	sem TM
	Sosui	<a href="http://www.genom
e.ad.jp/
SOSui/">http://www.genom e.ad.jp/ SOSui/	solúvel
	TMHMM	<a href="http://www.cbs.d
tu.dk/">http://www.cbs.d tu.dk/	sem TM

PSCA v.4	Programa Bioinformático	URL	Resultado
		services/TMHMM http://www.cbs.dtu.dk/ services/SignalP	ninguno
Péptido Sinal	Signal P	http://www.expasy.ch/tools/	PI 8,87
pI	pI/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	20,3 kDa
Peso molecular	pI/MW tool	http://psort.nibb.ac.jp/	90 % mitocôndria
Localização	PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/	78 % mitocôndria
	PSORT II	http://www.sanger.ac.uk/ Pfam/	sem motivo
Motivos	Pfam	http://www.biochem.ucl.ac.uk/	identificação de caderina
	Prints	http://www.blocks.s.fhere.org/	Granulina
	Blocks		
PSCAv.1	Programa Bioinformático	URL	Resultado
ORF	ORF finder		372 pb
Comprimento da Proteína			123 aa
Região Transmembrana	TM Pred	http://www.ch.embl.net/ http://www.enzim.hu/	I TM, aa 99-118
	HMMTop	http://www.genome.ad.jp/	ITM, aa 103-121
	Sosui		proteína de membrana aa 100-122

PSCA v.4	Programa Bioinformático	URL	Resultado
		SOSui/ http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM	sem TM
Péptido Sinal	Signal P	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/	sim, aa 1-15
pI	pI/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	pI 5,01
Peso Molecular	pI/MW tool	http://www.expasy.ch/tools/	12,9 kDa
Localização	PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/ 91	%Membrana plasma
	PSORT II	http://psort.nibb.ac.jp/ 34 %	membrana plasmática, 34 % extracelular
Motivos	Pfam	http://www.sanger.ac.uk/Pfam/	uPAR, Ly-6
	Prints	http://www.biochem.ucl.ac.uk/	sem motivo
	Blocks	http://www.blocks.fhere.org/	Ly-6

Quadro IV: Limites dos exões de PSCA v.1 transcrito

Número de Exão	Início	Fim	Comprimento
1	10	69	60
2	70	177	108

Número de Exão	Início	Fim	Comprimento
3	178	985	808

Quadro V(a). Sequência de nucleótidos de variante de transcrito de PSCA v.2 (SEQ ID NO: 1)

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcaggtgg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgct ggaccgcgcg catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgcgtgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgtg caacgccagc ggggcccatg ccctgcagcc 360
ggctgccgcc atccttgccg tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccgcgcca 420
gctatagget ctggggggcc ccgctgcage ccacactggg tgtggtgccc caggcctctg 480
tgccactcct cacacacccg gcccagtggg agcctgtcct ggttcctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtcccca ccctgaccct cccatggccc 600
tctccaggac tcccaccggg cagatcggct ctattgacac agatccgect gcagatggcc 660
ctccaaccc tctctgctgc tgtttccatg gcccagcatt ctccaccctt aacctgtgct 720
tcaggcacct cttccccagc gaagccttcc ctgccaccc catctatgac ttgagccagg 780
tctggtccgt ggtgtcccc gcacccagca ggggacaggc actcaggagg gcccggtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaaggggcc aggcctcaca ttcgtggggc 960
tcctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020

```

Quadro VI(a). Alinhamento de sequência de nucleótidos de PSCA v.2 (SEQ ID NO: 2) e PSCA v.1 (SEQ ID NO: 3)

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

v.2	416	ggccagctataggctctggggggccccgctgcagcccacactgggtgtgg	465
v.1	378	ggccagctataggctctggggggccccgctgcagcccacactgggtgtgg	427
v.2	466	tgccccaggcctctgtgccactcctcaca-cacccggcccagtgggagcc	514
		
v.1	428	tgccccaggcctttgtgccactcctcacagaacctggcccagtgggagcc	477
v.2	515	tgtcctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtctgaccatgtatgtct	564
		
v.1	478	tgtcctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtttgaccatgtatgttt	527
v.2	565	gcgcccctgtcccc--accctgaccctcccat-ggcctctccaggact	611
		
v.1	528	gcaccccttttccccnaacctgaccttcccatgggccttttccaggatt	577
v.2	612	cccacccggcagatcggctctattgacacagatccgcctgcagatggccc	661
		
v.1	578	cccacccggcagatcagttttagtgacacagatccgcctgcagatggccc	627
v.2	662	ctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccaccctta	711
		
v.1	628	ctccaaccctttctgttgctgtttccatggcccagcattttccaccctta	677
v.2	712	accctgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttccctgcccacccc	761
		
v.1	678	accctgtgttcaggcacttcttccccaggaagccttccctgcccacccc	727
v.2	762	atctatgacttgagccaggtctggtccgtggtgtccccgcaccagcag	811
		
v.1	728	atctatgaattgagccaggttggtccgtggtgtccccgcaccagcag	777
v.2	812	gggacaggcactcaggagggcccggtaaaggctgagatgaagtggactga	861
		
v.1	778	gggacaggcaatcaggagggcccagtaaaggctgagatgaagtggactga	827
v.2	862	gtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtctccagaga	911
		
v.1	828	gtagaactggaggacaagagttgacgtgagttcctgggagtttccagaga	877
v.2	912	tggggcctggaggcctggaggaaggggccaggcctcacattcgtggggct	961
		
v.1	878	tggggcctggaggcctggaggaaggggccaggcctcacatttgtggggct	927
v.2	962	ccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttg	1011
		
v.1	928	ccc-gaatggcagcctgagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttg	976
v.2	1012	gataagcca	1020
v.1	977	gataagcca	985

Quadro VII(a). Sequências peptídicas de proteína codificada por PSCA v.2 (SEQ ID NO: 4)

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

Quadro VIII(a). Alinhamento de sequência de aminoácidos de PSCA v.2 (SEQ ID NO: 5) e PSCA v.1 (SEQ ID NO: 6)

v.2	1	MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWT	50
v.1	1	MKAVLLALLMAGLALQPGTALLCYSCKAQVSNEDCLQVENCTQLGEQCWT	50
v.2	51	ARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSQDYVVGKKNITCCDTDLCNASGAHAL	100
v.1	51	ARIRAVGLLTVISKGCSLNCVDDSQDYVVGKKNITCCDTDLCNASGAHAL	100
v.2	101	QPAAAILALLPALGLLLWGP	123
v.1	101	QPAAAILALLPALGLLLWGP	123

Quadro V(b). Sequência de nucleótidos de variante de transcrito de PSCA v.3 (SEQ ID NO: 7)

tttgaggcca	tataaagtca	cctgaggccc	tctccaccac	agcccaccag	tgaccatgaa	60
ggctgtgctg	cttgccctgt	tgatggcagg	cttggccctg	cagccaggca	ctgccctgct	120
gtgctactcc	tgcaaagccc	aggcgcagtt	ggcctcctga	ccgtcatcag	caaaggctgc	180
agcttgaact	gcgtggatga	ctcacaggac	tactacgtgg	gcaagaagaa	catcacgtgc	240
tgtgacaccg	acttgtgcac	tcggcctgct	gctctgggga	cccggccagc	tataggctct	300
ggggggcccc	gctgcagccc	acactgggtg	tgggtgcccc	ggcctctgtg	ccactcctca	360
cacaccgggc	ccagtgggag	cctgtcctgg	ttcctgaggc	acatcctaac	gcaagtctga	420
ccatgtatgt	ctgcgccccct	gtccccacc	ctgaccctcc	catggccctc	tccaggactc	480
ccaccgggca	gatcggtctt	attgacacag	atccgctgct	agatggcccc	tccaaccctc	540
tctgctgctg	tttccatggc	ccagcattct	ccacccttaa	ccctgtgctc	aggcacctct	600
tccccagga	agccttccct	gcccacccca	tctatgactt	gagccaggtc	tgggtccgtgg	660
tgtccccgc	accagcagg	ggacaggcac	tcaggagggc	ccggtaaagg	ctgagatgaa	720
gtggactgag	tagaactgga	ggacaggagt	cgacgtgagt	tcttgggagt	ctccagagat	780
ggggcctgga	ggcctggagg	aaggggccag	gcctcacatt	cgtggggctc	cctgaatggc	840
agcctcagca	cagcgtaggc	ccttaataaa	cacctgttgg	ataagcca		888

Quadro VI(b). Alinhamento de sequência de nucleótidos de PSCA v.2 (SEQ ID NO: 8) e PSCA v.3 (SEQ ID NO: 9)

v.2	1	tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccag	50
v.3	1	tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccag	50
v.2	51	tgaccatgaaggctgtgctgcttgccctggtgatggcaggcttggccctg	100
v.3	51	tgaccatgaaggctgtgctgcttgccctggtgatggcaggcttggccctg	100
v.2	101	cagccaggcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtagcaa	150
v.3	101	cagccaggcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccag-----	142

v.2	151	cgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgct	200
v.3	143	-----	142
v.2	201	ggaccgcgcgcatccgcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggc	250
v.3	143	-----gcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggc	177
v.2	251	tgcagcttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaa	300
v.3	178	tgcagcttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaa	227
v.2	301	gaacatcacgtgctgtgacaccgacttgtgcaacgccagcggggcccatg	350
v.3	228	gaacatcacgtgctgtgacaccgacttg-----	255
v.2	351	ccctgcagccggctgccgccatccttgcgctgctccctgcactcggcctg	400
v.3	256	-----tgcaactcggcctg	268
v.2	401	ctgctctggggacccggccagctataggctctgggggccccgctgcagc	450
v.3	269	ctgctctggggacccggccagctataggctctgggggccccgctgcagc	318
v.2	451	ccacactgggtgtggtgccccaggcctctgtgccactcctcacacaccg	500
v.3	319	ccacactgggtgtggtgccccaggcctctgtgccactcctcacacaccg	368
v.2	501	gcccagtgaggcctgtcctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtct	550
v.3	369	gcccagtgaggcctgtcctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtct	418
v.2	551	gaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc	600
v.3	419	gaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc	468
v.2	601	tctccaggactcccaccggcagatcggctctattgacacagatccgcct	650
v.3	469	tctccaggactcccaccggcagatcggctctattgacacagatccgcct	518
v.2	651	gcagatggcccctccaaccctctctgctgctggttccatggcccagcatt	700
v.3	519	gcagatggcccctccaaccctctctgctgctggttccatggcccagcatt	568
v.2	701	ctccacccttaaccctgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttcc	750
v.3	569	ctccacccttaaccctgtgctcaggcacctcttccccaggaagccttcc	618
v.2	751	ctgcccaccccatctatgacttgagccaggctcgggtccgtggtgctcccc	800
v.3	619	ctgcccaccccatctatgacttgagccaggctcgggtccgtggtgctcccc	668
v.2	801	gcacccagcaggggacaggcactcaggagggccccggtaaaggctgagatg	850
v.3	669	gcacccagcaggggacaggcactcaggagggccccggtaaaggctgagatg	718

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

Quadro VII(b). Sequências peptídicas de proteína codificada por PSCA v.3 (SEQ ID NO: 10)

MYVCAPVPH	DPPMALSRT	TRQIGSIDTD	PPADGPSNPL	CCCFHGPAFS	TLNPVLRHLF	60
PQEAFPAHPI	YDLSQVWSVV	SPAPSRGQAL	RRAR			94

Quadro VIII(b). Alinhamento de sequências de aminoácidos PSCA v.2 e PSCA v.3.

SEM HOMOLOGIA SIGNIFICATIVA

Quadro V(c). Sequência de nucleótidos da variante de transcrito de PSCA v.4 (SEQ ID NO: 11)

gacagtgaac	cctgcgctga	aggcgttggg	gctcctgcag	ttctggggca	gccacaggcg	60
cccagggttt	cgtgccgatc	agcccaggac	ggctctcccg	gtgcagtttc	tgatgcgggg	120
agggcagtg	tgcttccgg	tcaccaggac	cagtgtcag	cccgcctgct	tgaccccctt	180
acttagctgg	ggccaatcc	ataccaatt	tagatgattc	agacgatggg	atgtgaaact	240
tttgaactgg	gtgcgactta	agcactgccc	tgctgtgcta	ctcctgcaaa	gccaggtga	300
gcaacgagga	ctgcctgcag	gtggagaact	gcaccagct	gggggagcag	tgctggaccg	360
cgcgcatccg	cgcagttggc	ctcctgaccg	tcatcagcaa	aggctgcagc	ttgaaactgcg	420
tggatgactc	acaggactac	tacgtgggca	agaagaacat	cacgtgctgt	gacaccgact	480
tgtgcaacgc	cagcggggcc	catgccctgc	agccggctgc	cgccatcctt	gcgctgctcc	540
ctgcactcgg	cctgctgctc	tggggaccgg	gccagctata	ggctctgggg	ggccccgctg	600
cagcccacac	tgggtgtggt	gccccaggcc	tctgtgccac	tcctcacaca	cccggcccag	660
tgggagcctg	tcctggttcc	tgaggacat	cctaacgcaa	gtctgaccat	gtatgtctgc	720
gcccctgtcc	cccaccctga	ccctccatg	gccctctcca	ggactcccac	ccggcagatc	780
ggctctattg	acacagatcc	gcctgcagat	ggcccctcca	accctctctg	ctgctgtttc	840
catggcccag	cattctccac	ccttaaccct	gtgctcaggc	acctcttccc	ccaggaagcc	900
ttcctgccc	acccatcta	tgacttgagc	caggtctggt	ccgtggtgtc	ccccgcaccc	960
agcaggggac	aggcactcag	gagggcccgg	taaaggctga	gatgaagtgg	actgagtaga	1020
actggaggac	aggagtgcac	gtgagttcct	gggagtctcc	agagatgggg	cctggaggcc	1080
tggaggaagg	ggccaggcct	cacattcgtg	gggctccctg	aatggcagcc	tcagcacagc	1140
gtaggcctt	aataaacacc	tgttgataa	gccca			1174

Quadro VI(c). Alinhamento de sequências de nucleótidos de PSCA v.2 (SEQ ID NO: 12) e PSCA v.4 (SEQ ID NO: 13)

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

VII(a). Sequências peptídicas de proteína codificada por PSCA v.4 (SEQ ID NO: 14)

MTHRTTTWAR	RTSRAVTPTC	ATPAGPMPCS	RLPSSLRCSL	HSACCSGDEA	SYRLWGAPLQ	60
PTLGVVVQAS	VPLLTHPAQW	EPVLVPEAHP	NASLTMYVCA	PVPHDPDMA	LSRTPTRQIG	120
SIDTDPPADG	PSNPLCCCFH	GPAFSTLNPV	LRHLFPQEAF	PAHPIYDLSQ	VWSVVSPAPS	180
RGQALRRAR						

**Quadro VIII(c). Alinhamento de seqüências de aminoácidos de
PSCA v.1 e PSCA v.4.**

SEM HOMOLOGIA SIGNIFICATIVA

Quadro V(d). Sequência de nucleótidos de variante de transcrito de PSCA v.5 (SEQ ID NO: 15)

```

gacagtgaac cctgcgctga aggcgttggg gtcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
cccagggttt cgtgccgatc agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtffc tgatgcgggg 120
agggcagtgc tgccttccgg tcaccaggac cagtgtcag cccgcctgct tgacccctt 180
acttagctgg ggtccaatcc ataccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaact 240
tttgaactgg gtgcgactta agcactgccc tgctgtgcta ctctgcaa gcccaggtga 300
gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcacccagct gggggagcag tgctggaccg 360
cgcgcatccg tgagtggggg gacgacagcc gccaggccta ggtctctgcc actgaactat 420
taatctttct ggccatctgt ccgcatctgt gtgctgtttt ccttccacct gtccccgacc 480
cgtcccgcac ctgcaccccc aacaatcacc cagcatctgt ccctccagcc atcctcctcc 540
atctgccact cctccactca tctgtccctc cccatcctcc atcttccact cctccacca 600
tctgtccctc ccctccctg agctcactta ctactcacc ccatttctga cgctcagcgg 660
gtggtccatc tgcctcggac atctggatag ggctgagacc agggccgaga ccaggcctc 720
gcactgcttg caatcctgag gccagcccag ggggactcta gagcattagg caggggtggga 780
caggaggagg cctggggcag gtcaggcagg tgagcacaca gggcagcccc atccccgat 840
cccgtgctc cccaggcgca gttggcctcc tgaccgtcat cagcaaaggc tgagcttga 900
actgctgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa gaacatcacg tgctgtgaca 960
ccgacttgtg caacgccagc ggggccccatg ccctgcagcc ggctgccgcc atccttgcc 1020
tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccggcca gctataggct ctggggggcc 1080
ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgccc caggcctctg tgccactcct cacacaccg 1140
gcccagtggg agcctgtcct ggtcctgag gcacatccta acgcaagtct gaccatgat 1200
gtctgcgcc ctgtcccca ccctgacct cccatggccc tctccaggac tcccaccgg 1260
cagatcggct ctattgacac agatccgct gcagatggcc cctccaacc tctctgctg 1320
tgtttccatg gcccagcatt ctccaccctt aaccctgtgc tcaggcact cttccccag 1380
gaagccttc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg tctggctcgt ggtgtcccc 1440
gcacccagca ggggacaggc actcaggagg gcccggtaaa ggctgagatg aagtggactg 1500
agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga gtctccagag atggggcctg 1560
gaggcctgga ggaagggggc aggcctcaca ttcgtggggc tcctgaaatg gcagcctcag 1620
cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1660

```

Quadro VI(d). Alinhamento de sequências de nucleótidos de PSCA v.2 (SEQ ID NO: 16) e PSCA v.5 (SEQ ID NO: 17)

v.2	116	ctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtgagcaacgaggactgcctgca	165
v.5	270	ctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtgagcaacgaggactgcctgca	319
v.2	166	ggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccgcgcgcatcc	215
v.5	320	ggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccgcgcgcatcc	369
v.2	216	-----	215
v.5	370	gtgagtggggggacgacagccgccaggcctaggtctctgccaactgaacta	419
v.2	216	-----	215
v.5	420	ttaatctttctggccatctgtccgcatctgtgtgctgttttccttcacc	469
v.2	216	-----	215
v.5	470	tgtccccgaccctgcccgcacctgcacccccacaacatcaccagcatctg	519
v.2	216	-----	215
v.5	520	tcctccagccatcctcctccatctgccactcctccactcatctgtccct	569
v.2	216	-----	215
v.5	570	ccccatcctccatcttccactcctccacccatctgtccctccccatcct	619
v.2	216	-----	215
v.5	620	gagtcacttactcactcaccatttctgacgctcagcgggtggccat	669
v.2	216	-----	215
v.5	670	ctgcctcggacatctggatagggctgagaccagggccgagaccaggccct	719
v.2	216	-----	215
v.5	720	cgactgcttgcaatcctgaggccagcccagggggactctagagcattag	769
v.2	216	-----	215
v.5	770	gcaggggtggacagggaggagccctggggcaggtcaggcaggtgagcacac	819
v.2	216	-----gcgcagttggcctc	229
v.5	820	agggcagccccatccccggatccccgctgctccccaggcgcagttggcctc	869
v.2	230	ctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcgtggatgactcaca	279
v.5	870	ctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcgtggatgactcaca	919
v.2	280	ggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgctgtgacaccgacttgt	329
v.5	920	ggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgctgtgacaccgacttgt	969

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

v.5 1620 gcacagcgtaggcccttaataaacacctggttgataagcca 1660

VII(d). Sequências peptídicas de proteína codificada por PSCA v.5 (SEQ ID NO: 18)

MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ1 60
 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMYVCA PVPHPDPPMA LS RTPTRQIG 120
 SIDTDPPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVSPAPS 180
 RGQALRRAR

Quadro VIII(d). Alinhamento de sequências de aminoácidos de PSCA v.2 e PSCA v.5.

SEM HOMOLOGIA SIGNIFICATIVA

Quadro IX SNP e mudanças de codão em PSCA v.2 e v.4

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

LISTA DE SEQUÊNCIAS

<110> AGENSYS, INC.

GE, Wangmao

CHALLITA-EID, Pia M.

RAITANO, Arthur B. JAKOBOVITS, Aya

<120> VARIANTES DE ANTIGÊNIO DE CÉLULAS ESTAMINAIS DE PRÓSTATA (PSCA) E SUBSEQUÊNCIAS DAS MESMAS

<130> 511582008846

<140> EP 04785910.3

<141> 28-05-2004

<150> PCT/US2004/017231

<151> 28-05-2004

<150> US 60/475.064

<151> 30-05-2003

<160> 30

<170> FastSEQ para windows versão 4.0

<210> 1

<211> 1020

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 1

tttgaggcca	tataaagtca	cctgaggccc	tctccaccac	agcccaccag	tgaccatgaa	60
ggctgtgctg	cttgccctgt	tgatggcagg	cttggccctg	cagccaggca	ctgccctgct	120
gtgctactcc	tgcaaagccc	aggtgagcaa	cgaggactgc	ctgcaggtgg	agaactgcac	180
ccagctgggg	gagcagtgct	ggaccgcgcg	catccgcgca	gttggcctcc	tgaccgtcat	240
cagcaaaggc	tgcagcttga	actgctgga	tgactcacag	gactactacg	tgggcaagaa	300
gaacatcacg	tgctgtgaca	ccgacttgtg	caacgccagc	ggggcccatg	ccctgcagcc	360
ggctgcccgc	atccttgccg	tgctccctgc	actcggcctg	ctgctctggg	gaccgggcca	420
gctataggct	ctggggggcc	ccgctgcagc	ccacactggg	tgtggtgccc	caggcctctg	480
tgccactcct	cacacaccgg	gcccagtggg	agcctgtcct	ggttcctgag	gcacatccta	540
acgcaagtct	gaccatgtat	gtctgcgccc	ctgtccccca	ccctgaccct	cccatggccc	600
tctccaggac	tcccaccggg	cagatcggct	ctattgacac	agatccgcct	gcagatggcc	660
cctccaaccc	tctctgctgc	tgtttccatg	gcccagcatt	ctccaccctt	aaccctgtgc	720
tcaggcacct	cttccccag	gaagccttcc	ctgcccaccc	catctatgac	ttgagccagg	780
tctggctcgt	ggtgtccccc	gcaccagca	ggggacaggc	actcaggagg	gcccggtaaa	840
ggctgagatg	aagtggactg	agtagaactg	gaggacagga	gtcgcagctga	gttcttggga	900
gtctccagag	atggggcctg	gaggcctgga	ggaaggggccc	aggcctcaca	ttcgtggggc	960
tccctgaatg	gcagcctcag	cacagcgtag	gcccttaata	aacacctggt	ggataagcca	1020

<210> 2

<211> 1005

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

agtcacctga	ggccctctcc	accacagccc	accagtgacc	atgaaggctg	tgctgcttgc	60
cctgttgatg	gcaggcttgg	ccctgcagcc	aggcactgcc	ctgctgtgct	actcctgcaa	120
agcccagggtg	agcaacgagg	actgcctgca	ggtggagaac	tgacccagc	tgggggagca	180
gtgctggacc	gcgcgcatcc	gcgcagtgg	cctcctgacc	gtcatcagca	aaggctgcag	240
cttgaactgc	gtggatgact	cacaggacta	ctacgtgggc	aagaagaaca	tcacgtgctg	300
tgacaccgac	ttgtgcaacg	ccagcggggc	ccatgccctg	cagccggctg	ccgccatcct	360
tgcgctgctc	cctgcactcg	gcctgctgct	ctggggacc	ggccagctat	aggctctggg	420
gggccccgct	gcagcccaca	ctgggtgtgg	tgccccaggc	ctctgtgcca	ctcctcacac	480
acccggccca	gtgggagcct	gtcctggttc	ctgaggcaca	tcctaacgca	agtctgacca	540
tgtatgtctg	cgccccctgc	ccccaccctg	accctcccat	ggccctctcc	aggactccca	600
cccggcagat	cggtcttatt	gacacagatc	cgctgcaga	tggcccctcc	aaccctctct	660
gctgctgttt	ccatggccca	gcattctcca	cccttaaccc	tgtgctcagg	caectcttcc	720
cccaggaagc	cttccctgcc	caccccatct	atgacttgag	ccaggctctgg	tccgtggtgt	780
cccccgacc	cagcagggga	caggcactca	ggagggcccg	gtaaaggctg	agatgaagtg	840
gactgagtag	aactggagga	caggagtcca	cgtaggttcc	tgggagtctc	cagagatggg	900
gcctggaggc	ctggaggaag	gggcccaggc	tcacattcgt	ggggctccct	gaatggcagc	960
ctcagcacag	cgtaggccct	taataaacac	ctgttgata	agcca		1005

<210> 3

<211> 985

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

<222> (0)...(0)

<223> n = a, c, t, ou g

<400> 3

```

agggagaggg agtgaccatg aaggctgtgc tgcctgcctt gttgatggca ggcttggccc 60
tgcagccagg cactgccctg ctgtgctact cctgcaaagc ccaggtgagc aacgaggact 120
gcctgcaggt ggagaactgc acccagctgg gggagcagtg ctggaccgcg cgcacccgcg 180
cagttggcct cctgaccgtc atcagcaaag gctgcagctt gaactgcgtg gatgactcac 240
aggactacta cgtgggcaag aagaacatca cgtgctgtga caccgacttg tgcaacgcca 300
gcggggccca tgccctgcag ccggctgccc ccacacctgc gctgctccct gcaactcggcc 360
tgctgctctg gggacccggc cagctatagg ctctggggggg ccccgctgca gcccaactg 420
ggtgtggtgc cccaggcctt tgtgccactc ctacacagaac ctggcccagt gggagcctgt 480
cctggttcct gaggcacatc ctaacgcaag tttgaccatg tatgtttgca cccctttcc 540
ccnaaccctg accttcccat gggccttttc caggattccc acccggcaga tcagttttag 600
tgacacagat ccgcctgcag atggcccctc caaccctttc tgttgctggt tccatggccc 660
agcattttcc acccttaacc ctgtgttcag gcacttcttc ccccaggaag cttccctgc 720
ccacccatt tatgaattga gccaggtttg gtccgtggtg tccccgcac ccagcagggg 780
acaggcaatc aggagggccc agtaaaggct gagatgaagt ggactgagta gaactggagg 840
acaagagttg acgtgagttc ctgggagttt ccagagatgg ggcctggagg cctggaggaa 900
ggggccaggc ctcacatttg tggggctccc gaatggcagc ctgagcacag cgtaggccct 960
taataaacac ctgttgata agcca 985

```

<210> 4

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

```

<210> 5

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

<400> 5

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

1				5					10				15		
Pro	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Ser	Cys	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Asn
			20					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> 6
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

Met	Lys	Ala	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Met	Ala	Gly	Leu	Ala	Leu	Gln
1				5					10					15	
Pro	Gly	Thr	Ala	Leu	Leu	Cys	Tyr	Ser	Cys	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Asn
			20					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> 7

<211> 888
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 7

```

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 acttgtcac tcggcctgct gctctgggga cccggccagc tataggctct 300
ggggggcccc gctgcagccc acaactgggtg tggtgcccca ggccctctgt ccactcctca 360
cacacccggc ccagtgggag cctgtcctgg ttcttgaggc acatecctaac gcaagtctga 420
ccatgtatgt ctgcgcccct gtccccacc ctgaccctcc catggccctc tccaggactc 480
ccaccgggca gatcggctct attgacacag atccgcctgc agatggcccc tccaaccctc 540
tctgctgctg ttccatggc ccagcattct ccaccctaa cctgtgctc aggcacctct 600
tccccagga agccttcct gccaccca tctatgactt gagccaggtc tgggccgtgg 660
tgteccccgc acccagcagg ggacaggcac tcaggagggc ccggtaaagg ctgagatgaa 720
gtggactgag tagaactgga ggacaggagt cgacgtgagt tcctgggagt ctccagagat 780
ggggcctgga ggcctggagg aaggggccag gcctcacatt cgtggggctc cctgaatggc 840
agcctcagca cagcgtaggc ccttaataaa cacctgttgg ataagcca 888

```

<210> 8
 <211> 1020
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 8

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcagggtg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgtt ggaccgcgca catccgcgca gttgacctc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgctgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgtg caacgccagc ggggccccatg cctgcagcc 360
ggctgccgcc atccttgccg tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgcc caggcctctg 480
tgccactcct cacacacccg gcccagtggg agcctgtcct ggttctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtcccca cctgacctt cccatggccc 600
tctccaggac tcccacccgg cagatcggct ctattgacac agatccgctt gcagatggcc 660
cctccaacc tctctgctgc tgtttccatg gcccagcatt ctccacctt aacctgtgc 720
tcaggcacct ctccccccag gaagccttcc ctgccacc cactatgac ttgagccagg 780
tctggtccgt ggtgtcccc gcacccagca ggggacagc actcaggagg gcccggtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaaggggcc aggcctcaca ttcgtggggc 960
tcctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020

```

<210> 9

<211> 888
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 9

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggcgcagtt ggccctctga ccgtcatcag caaaggctgc 180
agcttgaact gcgtggatga ctcacaggac tactacgtgg gcaagaagaa catcacgtgc 240
tgtgacaccg acttgtgcac tcggcctgct gctctgggga cccggccagc tataggctct 300
ggggggcccc gctgcagccc acaactgggtg tggtgcccc aacatcctaac gcaagtctga 360
cacaccgggc ccagtgggag cctgtcctgg ttccctgaggc acatcctaac gcaagtctga 420
ccatgtatgt ctgcgcccc gtccccacc ctgaccctcc catggccctc tccaggactc 480
ccaccgggca gatcggctct attgacacag atccgctgc agatggcccc tccaaccctc 540
tctgctgctg tttccatggc ccagcattct ccaccctaa ccctgtgctc aggcacctct 600
tccccagga agccttccct gccaccccc tctatgactt gagccaggtc tggtcctggtg 660
tgtccccgc acccagcagg ggacaggcac tcaggagggc ccggtaaagg ctgagatgaa 720
gtggactgag tagaactgga ggacaggagt cgaactgagt tcctgggagt ctccagagat 780
ggggcctgga ggctggagg aaggggccag gcctcacatt cgtggggctc cctgaatggc 840
agcctcagca cagcgtaggc ccttaataaa cacctgttgg ataagcca 888

```

<210> 10
 <211> 94
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 10

```

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

```

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

<400> 11

```

gacagtgaac cctgcgctga aggcgttggg gctcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
cccagggttt cgtgccgatc agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
agggcagtgc tgccttccgg tcaccaggac cagtgtctcag cccgcctgct tgacccccct 180
acttagctgg ggtccaatcc ataccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaaact 240
tttgaactgg gtgcgactta agcactgccc tgctgtgcta ctctgcaaa gcccagggtga 300
gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcaccagct gggggagcag tgctggaccg 360
cgcgcattcc cgcagttggc ctctgaccg tcatcagcaa aggctgcagc ttgaactgcg 420
tggatgactc acaggactac tacgtgggca agaagaacat cacgtgtgtg gacaccgact 480
tgtgcaacgc cagcggggcc catgccctgc agccggctgc cgccatcctt gcgctgtctc 540
ctgcactcgg cctgctgctc tggggacccg gccagctata ggctctgggg ggccccgctg 600
cagccccacac tgggtgtggt gcccaggcc tctgtgccac tcctcacaca cccggcccag 660
tgggagcctg tcctggttcc tgaggcacat cctaacgcaa gtctgaccat gtatgtctgc 720
gcccctgtcc cccaccctga ccctcccctg gccctctcca ggactcccac ccggcagatc 780
ggctctattg acacagatcc gcctgcagat ggccccctca accctctctg ctgctgtttc 840
catggccccg cattctccac ccttaaccct gtgctcaggc acctcttccc ccaggaagcc 900
ttccctgccc accccatcta tgacttgagc caggtctggt ccgtggtgtc ccccgcacc 960
agcaggggac aggcactcag gagggcccg taaaggctga gatgaagtgg actgagtaga 1020
actggaggac aggagtgcac gtgagttcct gggagtctcc agagatgggg cctggaggcc 1080
tggaggaagg ggccaggcct cacattcgtg gggctccctg aatggcagcc tcagcacagc 1140
gtaggccctt aataaacacc tgttgataa gcca 1174

```

<210> 12

<211> 1020

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 12

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cgaggactgc ctgcagggtg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgct ggaccgcgca catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgcgtgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgacttgtg caacgccagc ggggcccatt ccctgcagcc 360
ggctgcccgc atccttgcgc tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccgggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgccc caggcctctg 480
tgccactcct cacacaccgg gcccagtggg agcctgtcct ggttcctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgccc ctgtccccc cctgaccct cccatggccc 600
tctccaggac tcccaccggg cagatcggtt ctattgacac agatccgcct gcagatggcc 660
cctccaacct tctctgtgct gtttccatg gccccagcatt ctccaccctt aaccctgtgc 720
tcaggcacct cttccccag gaagccttcc ctgccacc cactatgac ttgagccagg 780
tctggtccgt ggtgtcccc gcaccagca ggggacaggc actcaggagg gcccggtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaagggg cc aggcctcaca ttcgtggggc 960
tccctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020

```

<210> 13

<211> 1133
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 13

```
tctggggcag ccacagggcg ccagggtttc gtgccgatca gcccaggacg gtcttcccgg 60
tgcagtttct gatgcgggga gggcagtgct gccttccggt caccaggacc agtgctcagc 120
ccgcctgctt gaacccctta cttagctggg gtccaatcca tacccaattt agatgattca 180
gacgatggga ttgaaactt ttgaactggg tgcgacttaa gcactgccct gctgtgctac 240
tcctgcaaag cccaggtgag caacgaggac tgcctgcagg tggagaactg caccagctg 300
ggggagcagt gctggaccgc gcgcatecgc gcagttggcc tcctgaccgt catcagcaa 360
ggctgcagct tgaactgcgt ggatgactca caggactact acgtgggcaa gaagaacatc 420
acgtgctgtg acaccgactt gtgcaacgcc agcggggccc atgccctgca gccggctgcc 480
gccatccttg cgctgctccc tgcactcggc ctgctgctct ggggaccggg ccagctatag 540
gctctggggg gccccgctgc agccacact ggggtgtggtg ccccaggcct ctgtgccact 600
cctcacacac ccggcccagt gggagcctgt cctggttcct gaggcacatc ctaacgcaag 660
tctgaccatg tatgtctgcg cccctgtccc ccaccctgac cctcccattg ccctctccag 720
gactcccacc cggcagatcg gctctattga cacagatccg cctgcagatg gccccccaa 780
ccctctctgc tgctgtttcc atggcccagc attctccacc cttaacctg tgctcaggca 840
cctcttcccc caggaagcct tccctgccc accccatctat gacttgagcc aggtctggtc 900
cgtggtgtcc cccgcacca gcaggggaca ggcactcagg agggcccggg aaaggctgag 960
```

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

<210> 14
 <211> 189
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

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

<210> 15

<211> 1660

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 15

```

gacagtgaac cctgcgctga aggcgttggg gctcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
cccagggttt cgtgccgatc agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
agggcagtg cgccttccgg tcaccaggac cagtgtcag cccgcctgct tgaccccctt 180
acttagctgg ggtccaatcc atacccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaaact 240
tttgaactgg gtgcgactta agcactgccc tgctgtgcta ctctgcaaa gcccagggtga 300
gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcaccagct gggggagcag tgctggaccg 360
cgcgcacccg tgagtggggg gacgacagcc gccaggccta ggtctctgcc actgaactat 420
taatctttct ggccatctgt ccgcatctgt gtgctgtttt ccttccacct gtccccgacc 480
cgtcccgcac ctgcaccccc aacaatcacc cagcatctgt ccctccagcc atcctcctcc 540
atctgccaact cctccactca tctgtccctc cccatcctcc atcttccact cctccacca 600
tctgtccctc cccatccctg agctcactta ctactcacc ccatttctga cgctcagcgg 660
gtggtccatc tgcctcggac atctggatag ggctgagacc agggccgaga ccaggccctc 720
gcaactgctt caatcctgag gccagcccag ggggactcta gagcattagg cagggtgga 780
caggaggagg cctggggcag gtcaggcagg tgagcacaca gggcagcccc atccccgat 840
cccgtgctc cccaggcgca gttggcctcc tgaccgctat cagcaaaggc tgcagcttga 900
actgctgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa gaacatcacg tgctgtgaca 960
ccgacttgtg caacgccagc ggggcccatt ccctgcagcc ggctgcccgc atccttgccg 1020
tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gacccggcca gctataggct ctggggggcc 1080
ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgccc caggcctctg tgccactcct cacacaccg 1140
gcccagtggg agcctgtcct ggttctctgag gcacatccta acgcaagtct gaccatgtat 1200
gtctgcgcc ctgtcccca ccctgaccct cccatggccc tctccaggac tcccaccgg 1260
cagatcggct ctattgacac agatccgctt gcagatggcc cctccaacc tctctgctgc 1320
tgtttccatt gccagcatt ctccaccctt aacctgtgc tcaggcacct ctccccag 1380
gaagccttcc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg tctggtccgt ggtgtcccc 1440
gcaccagca ggggacaggc actcaggagg gcccgtaaa ggctgagatg aagtggactg 1500
agtagaactg gaggaagga gtcgacgtga gttcctggga gtctccagag atggggcctg 1560

```

```

gaggcctgga ggaaggggccc aggcctcaca ttctggtgggc tccctgaatg gcagcctcag 1620
cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1660

```

<210> 16

<211> 1020

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 16

```

tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
ggctgtgctg ctgcccctgt tgatggcagg ctggcccctg cagccaggca ctgcccctgct 120
gtgctactcc tgcaaagccc aggtgagcaa cyaggactgc ctgcaggtgg agaactgcac 180
ccagctgggg gagcagtgct ggaccgcgca catccgcgca gttggcctcc tgaccgtcat 240
cagcaaaggc tgcagcttga actgctgga tgactcacag gactactacg tgggcaagaa 300
gaacatcacg tgctgtgaca ccgactgtg caacgccagc ggggcccatt ccctgcagcc 360
ggctgcccgc atccttgccg tgctccctgc actcggcctg ctgctctggg gaccggcca 420
gctataggct ctggggggcc ccgctgcagc ccacactggg tgtggtgccc caggcctctg 480
tgccactcct cacacaccg gccagtggg agcctgtcct ggttctctgag gcacatccta 540
acgcaagtct gaccatgtat gtctgcgcc ctgtcccca ccctgaccct cccatggccc 600
tctccaggac tcccaccgg cagatcggct ctattgacac agatccgctt gcagatggcc 660
cctccaacc tctctgctgc tgtttccatg gccagcatt ctccaccctt aacctgtgc 720
tcagggacct ctccccag gaagccttcc ctgcccacc catctatgac ttgagccagg 780
tctggtccgt ggtgtcccc gcaccagca ggggacaggc actcaggagg gcccgtaaa 840
ggctgagatg aagtggactg agtagaactg gaggacagga gtcgacgtga gttcctggga 900
gtctccagag atggggcctg gaggcctgga ggaaggggccc aggcctcaca ttctggtggg 960
tccctgaatg gcagcctcag cacagcgtag gcccttaata aacacctgtt ggataagcca 1020

```

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

<400> 17

```

tctggggcag ccacagggcg ccagggtttc gtgccgatca gcccaggacg gtcttcccgg 60
tgcagtttct gatgcgggga gggcagtgct gccttccggt caccaggacc agtgctcagc 120
ccgcctgctt gacccccctta cttagctggg gtccaatcca tacccaattt agatgattca 180
gacgatggga ttgaaactt ttgaaactgg tgcgacttaa gcactgccct gctgtgctac 240
tcctgcaaag cccaggtgag caacgaggac tgcttgacag tggagaactg caccagctg 300
ggggagcagt gctggaccgc gcgcatccgt gagtgggggg acgacagccg ccaggcctag 360
gtctctgccg ctgaactatt aatctttctg gccatctgtc cgcactgtgt tgcgttttc 420
cttccacctg tccccgacct gtccccgacc tgcaccccca acaatcacc agcatctgtc 480
cctccagcca tcttcttcca tctgccactc ctccactcat ctgtccctcc ccatectcca 540
tcttccactc ctccacccat ctgtccctcc ccatecctga gctcacttac tcactcacce 600
catttctgac gctcagcggg tgggtccatct gcctcggaca tctggatagg gctgagacca 660
gggcccagac caggccctcg cactgcttgc aatcctgagg ccagcccagg gggactctag 720
agcattaggc aggggtgggac aggaggaggc ctggggcagg tcaggcaggt gagcacacag 780
ggcagcccca tccccggatc ccgctgctcc ccaggcgcag ttggcctcct gaccgtcatc 840
agcaaaggct gcagcttgaa ctgctgggat gactcacagg actactacgt gggcaagaag 900
aacatcacgt gctgtgacac cgacttgtgc aacgccagcg gggcccatgc cctgcagccg 960
gctgccgcca tccttgcgct gctcccctgca ctccggctgc tgctctgggg acccgccag 1020
ctataggctc tggggggccc cgctgcagcc cacactgggt gtggtgcccc aggcctctgt 1080
gccactcctc acacaccceg cccagtgagg gcctgtcctg gttcctgagg cacatectaa 1140
cgcaagtctg accatgtatg tctgcgcccc tgteccccac cctgaccctc ccatggccct 1200
ctccaggact cccaccgggc agatcggtc tattgacaca gatccgcctg cagatggccc 1260
ctccaacct ctctgctgct gtttccatgg cccagcattc tccaccctta accctgtgct 1320
caggcacctc tccccccagg aagccttccc tgccccccc atctatgact tgagccaggt 1380
ctggtccgtg gtgtcccccg caccagcag gggacaggca ctcaggaggg cccggtaaag 1440
gctgagatga agtggactga gtagaactgg aggacaggag tcgacgtgag ttctggggag 1500
tctccagaga tggggcctgg aggcctggag gaaggggcca ggcctcatat tcgtggggct 1560
ccctgaatgg cagcctcagc acagcgtagg cccttaataa acacctgttg gataagcca 1619

```

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

<400> 18

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							

<210> 19

<211> 1020

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 19

tttgaggcca	tataaagtca	cctgaggccc	tctccaccac	agcccaccag	tgaccatgaa	60
ggctgtgctg	cttgccctgt	tgatggcagg	cttggccctg	cagccaggca	ctgccctgct	120
gtgctactcc	tgcaaagccc	aggtgagcaa	cgaggactgc	ctgcagggtg	agaactgcac	180
ccagctgggg	gagcagtgct	ggaccgcgcg	catccgcgca	gttggcctcc	tgaccgtcat	240
cagcaaaggc	tgagcttga	actgctgga	tgactcacag	gactactacg	tgaggcaagaa	300
gaacatcacg	tgctgtgaca	ccgacttgtg	caacgccagc	ggggcccatg	ccctgcagcc	360
ggctgccgcc	atccttgcgc	tgctccctgc	actcggcctg	ctgctctggg	gacccggcca	420
gctataggct	ctggggggcc	ccgctgcagc	ccacactggg	tgtggtgccc	caggcctctg	480
tgccactcct	cacacacccg	gcccagtgga	agcctgtcct	ggttctgag	gcacatccta	540
acgcaagtct	gacatgtat	gtctgcgccc	ctgtccccc	ccctgaccct	cccatggccc	600
tctccaggac	tcccaccggg	cagatcggtc	ctattgacac	agatccgcct	gcagatggcc	660
ctccaacccc	tctctgctgc	tgtttccatg	gcccagcatt	ctccaccctt	aacctgtgct	720
tcaggcacct	cttccccccag	gaagccttcc	ctgcccaccc	catctatgac	ttgagccagg	780
tctggtccgt	ggtgtcccc	gcacccagca	ggggacaggc	actcaggagg	gcccggtaaa	840
ggctgagatg	aagtggactg	agtagaactg	gaggacagga	gtcgcagtg	gttccctggga	900
gtctccagag	atggggcctg	gaggcctgga	ggaaggggccc	aggcctcaca	ttcgtggggc	960
tccttgaatg	gcagccctcag	cacagcgtag	gcccttaata	aacacctgtt	ggataagcca	1020

<210> 20

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

```

Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser
 1      5      10
Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys
 20      25
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

```

<210> 21

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met	Thr	His	Arg	Thr	Thr	Thr	Trp	Ala	Arg	Arg	Thr	Ser	Arg	Ala	Val
1				5					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	Ser	Arg	Leu	Trp	Gly	Ala	Pro	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Gly
	50					55					60				
Val	Val	Pro	Gln	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Leu	Thr	His	Pro	Ala	Gln	Trp
65					70					75					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

<210> 23

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

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

<210> 24

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

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

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

<400> 25

```

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
Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr Met
 85      90      95
Tyr Val Cys Thr Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu Ser
 100     105     110
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
 115     120
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130     135     140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145     150     155
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165     170     175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180     185

```

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

<400> 26

```

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
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
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Ser Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro Ala
      115      120
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
      130      135      140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145      150      155
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
      165      170      175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
      180      185

```

<210> 27

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

```

Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1      5      10      15
Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
      20      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
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
Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ser Asp Thr Asp Pro Pro Ala
      115      120
Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
      130      135      140
Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145      150      155
Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
      165      170      175
Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
      180      185

```

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

<400> 28
 Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg Leu
 20 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 Gln
 180 185

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

<220>
 <223> variantes de PSCA de comparação

<400> 29

```

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

```

<210> 30

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

```

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

```

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 9840403 A [0025]
- WO 0140309 A [0025]
- US 6258939 B [0025]
- US 2003023054 A [0028]
- US 5010175 A [0055]
- WO 9119735 A [0055]
- WO 9320242 A [0055]
- WO 9200091 A [0055]
- US 5288514 A [0055]
- US 5539083 A [0055]
- US 9610287 W [0055]
- US 5593853 A [0055]
- US 5569588 A [0055]
- US 5549974 A [0055]
- US 5525735 A [0055]
- US 5519134 A [0055]
- US 5506337 A [0055]
- US 5559410 A [0059]
- US 5585639 A [0059]
- US 5576220 A [0059]
- US 5541061 A [0059]
- WO 9733602 A, Chesnut [0099]
- WO 9824893 A [0114]
- US 6162963 A [0114]

- US 6150584 A [0114]
- US 6114598 A [0114]
- US 5837501 A [0123]
- US 5840501 A [0152]
- US 5939533 A [0152]
- US 9804664 W [0161]
- US 28883 W [0161]
- US 0019967 W [0161]
- GB 2211504 A [0216]
- US 09359326 B [0261]
- US 09308503 B [0261]
- US 09251835 B [0261]
- US 09203939 B [0261]
- US 09038261 B [0261]
- US 08814279 B [0261]
- US 60071141 B [0261]
- US 60124658 B [0261]
- US 60120536 B [0261]
- US 60113230 B [0261]
- EP 04785910 A [0263]
- US 2004017231 W [0263]
- US 60475064 B [0263]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

- **Klein et al.** *Nat. Med.*, 1997, vol. 3, 402 [0006]
- **Su et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996, vol. 93, 7252 [0006]
- **Pinto et al.** *Clin Cancer Res*, 02 September 1996, 1445-51 [0006]
- **Hubert et al.** *Proc Natl Acad Sci USA.*, 07 December 1999, vol. 96 (25), 14523-8 [0006]
- **Reiter et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, vol. 95, 1735 [0006]

- **Hopp T.P. ; Woods K.R.** *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 1981, vol. 78, 3824-3828 [0034]
- **Kyte J. ; Doolittle R.F.** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 157, 105-132 [0035] [0192]
- **Janin J.** *Nature*, 1979, vol. 277, 491-492 [0036] [0111] [0192]
- **Bhaskaran R. ; Ponnuswamy P.K.** *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1988, vol. 32, 242-255 [0037] [0192]
- **Deleage, G. ; Roux B.** *Protein Engineering*, 1987, vol. 1, 289-294 [0038] [0111] [0192]
- **Combet C. ; Blanchet C. ; Geourjon C. ; Deléage G.** *NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS*, March 2000, vol. 25 (3), 147-150, http://pbil.ib-cp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html [0043]
- **K. Hofmann ; W. Stoffel.** TMBASE - A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 1993, vol. 374, 166 [0044]
- A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. **Erik L.L. Sonnhammer ; Gunnar von Heijne ; Anders Krogh.** *Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology*. AAAI Press, 1998, 175-182 [0044]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989 [0047]
- **Gallop et al.** *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37 (9), 1233-1251 [0054]
- **Furka.** *Pept. Prot. Res.*, 1991, vol. 37, 487-493 [0055]
- **Houghton et al.** *Nature*, 1991, vol. 354, 84-88 [0055]
- **Hobbs et al.** *Proc. Nat. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 90, 6909-6913 [0055]
- **Hagihara et al.** *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, 6568 [0055]

- **Hirschmann et al.** *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, vol. 114, 9217-9218 [0055]
- **Chen et al.** *J. Amer. Chem. Soc.*, 1994, vol. 116, 2661 [0055]
- **Cho et al.** *Science*, 1993, vol. 261, 1303 [0055]
- **Campbell et al.** *J. Org. Chem.*, 1994, vol. 59, 658 [0055]
- **Gordon et al.** *J. Med. Chem.*, 1994, vol. 37, 1385 [0055]
- **Vaughn et al.** *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14 (3), 309-314 [0055]
- **Liang et al.** *Science*, 1996, vol. 274, 1520-1522 [0055]
- **Baum.** *C&EN*, 18 January 1993, 33 [0055]
- **Stites et al.** *Immunology*. Lange Publishing, 1994 [0062]
- **Ausubel et al.** *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience Publishers, 1995 [0083]
- **Sambrook et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0084]
- **Krajinovic et al.** *Mutat. Res.*, 1998, vol. 382 (3-4), 81-83 [0092]
- **Johansson et al.** *Blood*, 1995, vol. 86 (10), 3905-3914 [0092]
- **Finger et al.** *P.N.A.S.*, 1988, vol. 85 (23), 9158-9162 [0092]
- **Evans et al.** *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1994, vol. 171 (4), 1055-1057 [0092]
- **Marrogi et al.** *J. Cutan. Pathol.*, 1999, vol. 26 (8), 369-378 [0093]
- **Sambrook, J. et al.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*,. Cold Spring Harbor Press, 1989 [0096]
- *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons, 1995 [0096]

- **Sette.** *Immunogenetics*, 1999, vol. 50 (3-4), 201-212 [0099]
- **Sette et al.** *J. Immunol.*, 2001, vol. 166 (2), 1389-1397 [0099]
- **Sidney et al.** *Hum. Immunol.*, 1997, vol. 58 (1), 12-20 [0099]
- **Kondo et al.** *Immunogenetics*, 1997, vol. 45 (4), 249-258 [0099]
- **Sidney et al.** *J. Immunol.*, vol. 157 (8), 3480-90 [0099]
- **Falk et al.** *Nature*, 1991, vol. 351, 290-6 [0099]
- **Hunt et al.** *Science*, 1992, vol. 255, 1261-3 [0099]
- **Parker et al.** *J. Immunol.*, 1992, vol. 149, 3580-7 [0099]
- **Parker et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 152, 163-75 [0099]
- **Borras-Cuesta et al.** *Hum. Immunol.*, 2000, vol. 61 (3), 266-278 [0099]
- **Alexander et al.** *J. Immunol.*, 2000, vol. 164 (3), 1625-1633 [0099]
- **Alexander et al.** PMID: 7895164, UI: 95202582 [0099]
- **O'Sullivan et al.** *J. Immunol.*, 1991, vol. 147 (8), 2663-2669 [0099]
- **Alexander et al.** *Immunity*, 1994, vol. 1 (9), 751-761 [0099]
- **Alexander et al.** *Immunol. Res.*, 1998, vol. 18 (2), 79-92 [0099]
- **Antibodies: A Laboratory Manual.** CSH Press, 1988 [0109]
- **Harlow.** *Antibodies.* Cold Spring Harbor Press, 1989 [0109]
- **Donnelly et al.** *Ann. Rev. Immunol.*, 1997, vol. 15, 617-648 [0110]

- **Hopp, T.P. ; Woods, K.R.** *Proc. Natl. Acad Sci. U.S.A.*, 1981, vol. 78, 3824-3828 [0111]
- **Kyte, J. ; Doolittle, R.F.** *J. Mol. Biol.*, 1982, vol. 157, 105-132 [0111]
- **Bhaskaran R. ; Ponnuswamy P.K.** *Int. J Pept. Protein Res.*, 1988, vol. 32, 242-255 [0111]
- **Jones et al.** *Nature*, 1986, vol. 321, 522-525 [0113]
- **Riechmann et al.** *Nature*, 1988, vol. 332, 323-327 [0113]
- **Verhoeyen et al.** *Science*, 1988, vol. 239, 1534-1536 [0113]
- **Carter et al.** *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1993, vol. 89, 4285 [0113]
- **Sims et al.** *J. Immunol.*, 1993, vol. 151, 2296 [0113]
- **Vaughan et al.** *Nature Biotechnology*, 1998, vol. 16, 535-539 [0114]
- Building an in vitro immune system: human antibodies from phage display libraries. **Griffiths ; Hoogen-boom.** *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man.* Nottingham Academic, 1993, 45-64 [0114]
- **Burton ; Barbas.** *Human Antibodies from combinatorial libraries*, 65-82 [0114]
- **Jakobovits.** *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 1998, vol. 7 (4), 607-614 [0114]
- **Wolff et al.** *Cancer Res.*, vol. 53, 2560-2565 [0115]
- **Alers et al.** *Lab Invest.*, 1997, vol. 77 (5), 437-438 [0123]
- **Isaacs et al.** *Cancer Surv.*, 1995, vol. 23, 19-32 [0123]
- **Grever et al.** *J. Comp. Neurol.*, 09 December 1996, vol. 376 (2), 306-14 [0123]
- *Current Protocols In Molecular Biology.* 1995 [0125]
[0132]

- **Murphy et al.** *Prostate*, 2000, vol. 42 (4), 315-317 [0128]
- **Su et al.** *Semin. Surg. Oncol.*, 2000, vol. 18 (1), 17-28 [0128]
- **Freeman et al.** *J Urol*, August 1995, vol. 154, 474-8 [0128]
- **De Marzo et al.** *Am. J. Pathol.*, 1999, vol. 155 (6), 1985-1992 [0132]
- **Brooks et al.** *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, vol. 7, 531-536 [0132]
- **Lethe et al.** *Int. J. Cancer*, 1998, vol. 76 (6), 903-908 [0132]
- **Thomas.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1980, vol. 77, 5201-5205 [0133]
- **Verkaik et al.** *Urol. Res.*, 1997, vol. 25, 373-384 [0134]
- **Ghossein et al.** *J. Clin. Oncol.*, 1995, vol. 13, 1195-2000 [0134]
- **Heston et al.** *Clin. Chem.*, 1995, vol. 41, 1687-1688 [0134]
- **Bocking et al.** *Anal. Quant Cytol.*, 1984, vol. 6 (2), 74-88 [0138]
- **Epstein.** *Hum. Pathol.*, 1995, vol. 26 (2), 223-9 [0138]
- **Thorson et al.** *Mod Pathol.*, 1998, vol. 11 (6), 543-51 [0138]
- **Baisden et al.** *Am. J. Surg. Pathol.*, 1999, vol. 23 (8), 918-24 [0138]
- **Merrill et al.** *J. Urol.*, 2000, vol. 163 (2), 503-5120 [0142]
- **Polascik et al.** *J. Urol.*, August 1999, vol. 162 (2), 293-306 [0142]
- **Fortier et al.** *J. Nat. Cancer Inst.*, 1999, vol. 91, 1635-1640 [0142]

- **Tulchinsky et al.** *Int J Mol Med*, 04 July 1999, 99-102 [0142]
- **Minimoto et al.** *Cancer Detect Prev*, 2000, vol. 24 (1), 1-12 [0142]
- **Sharief et al.** *Biochem. Mol. Biol. Int.*, 1994, vol. 33 (3), 567-74 [0143]
- **Okegawa et al.** *J. Urol.*, 2000, vol. 163 (4), 1189-1190 [0143]
- **Stephan et al.** *Urology*, 2000, vol. 55 (4), 560-3 [0143]
- **Alanen et al.** *Pathol. Res. Pract.*, 1996, vol. 192 (3), 233-7 [0143]
- **Alanen et al.** *Pathol. Res. Pract.*, 1996, vol. 192 (3), 233-237 [0145] [0153]
- **Diaz et al.** *The Breast Journal*, 2001, vol. 7, 40-45 [0148]
- **Zhang et al.** *Clinical Cancer Research*, 1998, vol. 4, 2669-2676 [0148]
- **Cao et al.** *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1997, vol. 45, 1547-1557 [0148]
- **De Potter et al.** *International Journal of Cancer*, 1989, vol. 44, 969-974 [0148]
- **Caetano-Anolles, G.** *Biotechniques*, 1998, vol. 25 (3), 472-476 478-480 [0151]
- **Robertson et al.** *Methods Mol. Biol.*, 1998, vol. 98, 121-154 [0151]
- **Sawai et al.** *Fetal Diagn. Ther.*, November 1996, vol. 11 (6), 407-13 [0151]
- *Current Protocols In Molecular Biology*. 1995, vol. 2 [0151] [0152]
- **Takahama K.** *Forensic Sci Int*, 28 June 1996, vol. 80 (1-2), 63-9 [0154]
- **Saffran et al.** *Proc Natl Acad Sci USA.*, 27 February 2001, vol. 98 (5), 2658-2663 [0161]

- **Amara et al.** *Cancer Res.*, 15 June 2001, vol. 61 (12), 4660-65 [0161]
- **Reiter et al.** *Proc Natl Acad Sci USA.*, 17 February 1998, vol. 95 (4), 1735-40 [0161]
- **Argani et al.** *Cancer Res.*, 01 June 2001, vol. 61 (11), 4320-24 [0161]
- **A. Salamov ; V. Solovyev.** Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA. *Genome Research.*, April 2000, vol. 10 (4), 516-22 [0171]
- **Southan, C.** A genomic perspective on human proteases. *FEBS Lett.*, 08 June 2001, vol. 498 (2-3), 214-8 [0171]
- **de Souza, S.J. et al.** Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. *Proc. Natl Acad Sci USA.*, 07 November 2000, vol. 97 (23), 12690-3 [0171]
- **Brennan, S.O. et al.** Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry. *Biochem Biophys Acta*, 17 August 1999, vol. 1433 (1-2), 321-6 [0172]
- **Ferranti P et al.** Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein. *EurJBiochem.*, 01 October 1997, vol. 249 (1), 1-7 [0172]
- **Wellmann S et al.** Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem.*, April 2001, vol. 47 (4), 654-60 [0172]
- **Jia, H.P. et al.** Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach. *Gene*, 24 January 2001, vol. 263 (1-2), 211-8 [0172]
- **Brigle, K.E. et al.** Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms. *Biochem Biophys Acta*, 07 August 1997, vol. 1353 (2), 191-8 [0172]

- **P. Nowotny ; J. M. Kwon ; A. M. Goate.** SNP analysis to dissect human traits. *Curr. Opin. Neurobiol.*, October 2001, vol. 11 (5), 637-641 [0177]
- **M. Pirmohamed ; B. K. Park.** Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol. Sci.*, June 2001, vol. 22 (6), 298-305 [0177]
- **J. H. Riley ; C. J. Allan ; E. Lai ; A. Roses.** The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes. *Pharmacogenomics*, February 2000, vol. 1 (1), 39-47 [0177]
- **R. Judson ; J. C. Stephens ; A. Windemuth.** The predictive power of haplotypes in clinical response. *Pharmacogenomics*, February 2000, vol. 1 (1), 15-26 [0177]
- **P. Bean.** The promising voyage of SNP target discovery. *Am. Clin. Lab.*, October 2001, vol. 20 (9), 18-20 [0178]
- **K. M. Weiss.** In search of human variation. *Genome Res.*, July 1998, vol. 8 (7), 691-697 [0178]
- **M. M. She.** Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies. *Clin. Chem.*, February 2001, vol. 47 (2), 164-172 [0178]
- **Z. Gu ; L. Hillier ; P. Y. Kwok.** Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace. *Hum. Mutat.*, 1998, vol. 12 (4), 221-225 [0178]
- **P. Y. Kwok.** Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2001, vol. 2, 235-258 [0178]
- **M. Kokoris ; K. Dix ; K. Moynihan ; J. Mathis ; B. Erwin ; P. Grass ; B. Hines ; A. Duesterhoeft.** High-throughput SNP genotyping with the Masscode system. *Mol. Diagn.*, December 2000, vol. 5 (4), 329-340 [0178]

- **Hopp T.P. ; Woods K.R.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1981, vol. 78, 3824-3828 [0192]
- **Combet C. ; Blanchet C. ; Geourjon C. ; Deléage G.** *NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS*, March 2000, vol. 25 (3), 147-150, <http://pbil.ib-cp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa-nn.htm> [0197]
- Production of PSCA in Prokaryotic Systems. *Current Protocols In Molecular Biology*. 1995, vol. 2 [0201]
- **Linsley, P.S. ; Brady, W. ; Urnes, M. ; Grosmaire, L. ; Damle, N. ; Ledbetter, L.** *J. Exp. Med*, vol. 174, 561-566 [0201]
- **Welford K.** *Opt. Quant. Elect.*, 1991, vol. 23, 1 [0212]
- **Morton ; Myszka.** *Methods in Enzymology*, 1998, vol. 295, 268 [0212]
- **Miki T et al.** *Oncol Res.*, 2001, vol. 12, 209 [0217]
- **Fu X et al.** *Int. J Cancer.*, 1991, vol. 49, 938 [0217]
- **Kaighn, M.E. et al.** *Invest Urol*, 1979, vol. 17 (1), 16-23 [0219]
- **Saffran et al.** *PNAS*, 1999, vol. 10, 1073-1078 [0219]
- **Saffran, D. et al.** *PNAS*, vol. 10, 1073-1078, pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698 [0220]
- **Craft, N. et al.** *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 5030-5036 [0224]
- **Hubert, R.S. et al.** *Proc Natl. Acad. Sci USA*, 1999, vol. 96 (25), 14523 [0225]
- **Lin S et al.** *Cancer Detect Prev.*, 2001, vol. 25, 202 [0229]
- **Davidoff AM et al.** *Clin Cancer Res.*, 2001, vol. 7, 2870 [0230]
- **Solesvik O et al.** *Eur. J Cancer Clin Oncol.*, 1984, vol. 20, 1295 [0230]
- **Potamianos S. et al.** *Anticancer Res*, 2000, vol. 20 (2A), 925-948 [0233]

- **Meerson, N. R.** *Hepatology*, 1998, vol. 27, 563-568 [0233]
- **Divgi et al.** *J. Natl. Cancer Inst.*, 1991, vol. 83, 97-104 [0235]
- **Shan et al.** *Biophys Chem*, 1999, vol. 82, 157 [0238]
- **Yap AS ; Kovacs EM.** *J Biol Chem*, 2003, vol. 160, 11 [0238]
- **Vestweber D.** *Curr Opin Cell Biol*, 2002, vol. 14, 587 [0238]
- **Bloom et al.** *Mol Biol Cell*, 1999, vol. 10, 1521 [0238]
- **Brodt P.** *Cancer Met Rev*, 1991, vol. 10, 23 [0238]
- **Xu, S. Q. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1998, vol. 273, 20078 [0238]
- **Liau L et al.** *Cancer Res.*, vol. 60, 1353 [0238]
- **Donald, C. D et al.** *Anticancer Res.*, vol. 21, 3739 [0238]
- **Smid-Koopman E et al.** *Br J Cancer.*, 2000, vol. 83, 246 [0242]
- **Chen K et al.** *Thyroid.*, 2001, vol. 11, 41 [0242]
- *JNeurochem.*, 2001, vol. 76, 217-223 [0245]
- **Kouklis.** *J Biol Chem.*, 2003, vol. 278, 16230 [0245]
- *Cell Growth Differ*, 2000, vol. 11, 279 [0245]
- *J Biol Chem.*, 1999, vol. 274, 801 [0245]
- *Oncogene*, 2000, vol. 19, 3003 [0245]
- *J. Cell Biol.*, 1997, vol. 138, 913 [0245]
- **Fraser SP ; Grimes JA ; Djamgoz MB.** *Prostate*, 2000, vol. 44, 61 [0249]
- **Johnson DE ; Ochieng J ; Evans SL.** *Anticancer Drugs*, 1996, vol. 7, 288 [0249]
- *Cancer Res.*, 1999, vol. 59, 6010 [0251]
- **Abdel-Malek ZA.** *J Cell Physiol.*, 1988, vol. 136, 247 [0252]
- **Hanahan D ; Folkman J.** *Cell*, 1996, vol. 86, 353 [0254]
- **Folkman.** *J. Endocrinology*, 1998, vol. 139, 441 [0254]

- *Curr Opin Chem Biol.*, 1999, vol. 3, 64 **[0258]**

REIVINDICAÇÕES

1. Um método *in vitro* para detectar a presença de um polinucleótido PSCA numa amostra de teste derivada de um indivíduo como um indicador da presença de cancro que compreende:

colocar a amostra em contacto com uma sonda que se liga especificamente ao polinucleótido PSCA, e detectar a ligação da sonda ao polinucleótido PSCA, em que o polinucleótido PSCA é seleccionado a partir do grupo que consiste em:

- (a) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993;
- (b) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO: 11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 521 é T;
- (c) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 578 é C;
- (d) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 649 é G;
- (e) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 653 é T;
- (f) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 721 é A;
- (g) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO: 11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 781 é A;

- (h) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO: 11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 788 é G;
- (i) um polinucleótido que compreende a sequência de SEQ ID NO:11, desde o número de resíduo de nucleótido 424 até 993, em que o resíduo de nucleótido em 989 é A;
- e

(j) um polinucleótido completamente complementar a um polinucleótido de qualquer um de (a) a (i);

em que a etapa de detecção compreende comparar uma quantidade de ligação da sonda que se liga especificamente ao polinucleótido PSCA à quantidade de ligação da sonda ao polinucleótido numa amostra de tecido normal correspondente, e em que a presença de polinucleótido PSCA elevado na amostra de teste em relação à amostra de tecido normal proporciona uma indicação da presença de cancro.

2. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o polinucleótido PSCA é um ADNc produzido a partir da amostra por transcrição reversa.

3. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o polinucleótido é um ARNm.

4. O método de acordo com a reivindicação 1, em que o cancro é seleccionado a partir do grupo que consiste em cancro da próstata, bexiga, rim, cólon, pulmão, ovário, mama, e pâncreas.

5. Um método *in vitro* para detectar a presença de uma proteína PSCA que tem uma sequência seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NOs: 14, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, e 28 numa amostra de teste derivada de um

indivíduo como um indicador da presença de cancro que compreende:

colocar a amostra em contacto com um anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga especificamente à proteína PSCA, e detectar uma quantidade de ligação do anticorpo ou fragmento do mesmo à proteína PSCA na amostra de teste e comparar a ligação do anticorpo ou fragmento do mesmo à proteína numa amostra de tecido normal, em que a presença de proteína PSCA elevada na amostra de teste em relação à amostra de tecido normal proporciona uma indicação da presença de cancro.

6. O método de acordo com a reivindicação 5, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo é monoclonal.

7. O método de acordo com a reivindicação 5 ou 6 em que a etapa de detecção compreende comparar uma quantidade de ligação de um anticorpo que se liga especificamente à proteína PSCA na amostra de teste e numa amostra normal correspondente.

8. O método de acordo com a reivindicação 5, em que o cancro é seleccionado a partir do grupo que consiste em cancro da próstata, bexiga, rim, cólon, pulmão, ovário, mama e pâncreas.

Fig. 2A

A sequência de ADNc (SEQ ID NO: 3) e aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de PSCA v.1. A sequência Kozak mostra-se em negrito, a metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se desde o ácido nucleico 18 ao 389 incluindo o codão de terminação.

```

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  TGCAGCCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACT
36  L Q V E N C T Q L G E Q C W T A R I R A
121 GCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGGCATCCGCG
56  V G L L T V I S K G C S L N C V D D S Q
181 CAGTTGGCCTCCTGACCGTCATCAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGGATGACTCAC
76  D Y Y V G K K N I T C C D T D L C N A S
241 AGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCA
96  G A H A L Q P A A A I L A L L P A L G L
301 GCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGGCGTGCTCCCTGCACTCGGCC
116 L L W G P G Q L *
361 TGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGgctctggggggccccgctgcagcccacactg
421 ggtgtggtgccccaggcctttgtgccactcctcacagaacctggcccagtgaggcctgt
481 cctggttcctgaggcacatcctaacgcaagtttgaccatgtatgtttgcacccctttcc
541 ccnaacctgaccttcccattgggcttttccaggattcccacccggcagatcagttttag
601 tgacacagatccgctgcagatggccctccaacctttctgttgcgtgtttccatggccc
661 agcattttccacccttaacctgtgttcaggcacttcttccccaggaagccttccctgc
721 ccacccatttatgaattgagccagggttgggtccgtggtgtcccccgacccagcagggg
781 acaggcaatcaggagggcccagtaaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggagg
841 acaagagttgacgtgagttcctgggagtttccagagatggggcctggaggcctggaggaa
901 ggggccaggcctcacatttgtggggctcccgaatggcagcctgagcacagcgtaggcctt
961 taataaacacctgttgataagccaaaaaa

```

Fig. 2B

A sequência de ADNc (SEQ ID NO: 1) e aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de PSCA v.2. A sequência Kozak mostra-se em negrito, a metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se desde o ácido nucleico 56 ao 427 incluindo o codão de terminação.

```

1                                     M K
1  tttgaggccatataaaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccATGAA
3  A V L L A L L M A G L A L Q P G T A L L
61 GGCTGTGCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT
23  C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC
43  Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I
181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
63  S X G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
83  N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCC
103 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
361 GGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
123 L *
421 GCTATAGgctctggggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactcctcacacacccggcccagtgaggcctgtcctgggtcctgaggcacatccta
541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgccccctgtccccaccctgacctcccatggccc
601 tetccaggactcccaccggcagatcggtctctattgacacagatccgctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgctgctgtgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccaggaagccttccctgcccacccatctatgacttgagccagg
781 tctggtccgtgggtgtcccccgccaccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtgcacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggc
961 tccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttggataagcca

```

Fig. 2C

A sequência de ADNc (SEQ ID NO: 7) aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de PSCA v.3. A sequência Kozak mostra-se em negrito, e a metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se desde o ácido nucleico 423 ao 707 incluindo o codão de terminação.

```

1 tttgaggccatataaaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaa
61 ggctgtgctgcttgcctgttgatggcaggcttggccctgcagccaggcactgcctgtct
121 gtgctactcctgcaaagcccaggcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgc
181 agcttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgc
241 tgtgacaccgacttgtgcactcggcctgctgctctggggacccggccagctataggctct
301 ggggggccccgctgcagcccacactgggtgtgggtgccccaggcctctgtgccactcctca
361 cacaccggccccagtgaggagcctgtcctgggttcctgaggcacatcctaacgcaagtctga
1 M Y V C A P V P H P D P P M A L S R T P
421 ccATGTATGTCTGCGCCCCTGTCCCCCACCCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTC
21 T R Q I G S I D T D P P A D G P S N P L
481 CCACCCGGCAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCCCTCCAACCCTC
41 C C C F H G P A F S T L N P V L R H L F
541 TCTGCTGCTGTTTCCATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCT
61 P Q E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V
601 TCCCCAGGAAGCCTTCCCTGCCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGG
81 S P A P S R G Q A L R R A R *
661 TGTCCCCCGCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAAaggetgagatgaa
721 gtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtcctccagagat
781 ggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggc
841 agcctcagcacagcgtagggcccttaataaacacctgttggataagcca

```

Fig. 2D

A sequência de ADNc (SEQ ID NO: 11) e aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de PSCA v.4. A metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se desde o ácido nucleico 424 ao 993 incluindo o codão de terminação.

```

1 gacagtgaacctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacagggc
61 cccagggtttcgtgcccgatcagcccaggacgggtcttcccggtgcagtttctgatgcgggg
121 agggcagtgetgccttccggtcaccaggaccagtgtcagcccgcctgcttgacccctt
181 acttagctggggccaatccatacccaatcttagatgattcagacgatgggatttgaaact
241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtga
301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccg
361 cgcgcacccgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcy
1 M T H R T T T W A R R T S R A V T P T
421 tggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACT
20 C A T P A G P M P C S R L P P S L R C S
481 TGTGCAACGCCAGCGGGGCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCC
40 L H S A C C S G D P A S Y R L W G A P L
541 CTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCCCCGCTG
60 Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P A Q
601 CAGCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCGGCCAG
80 W E P V L V P E A H P N A S L T M Y V C
661 TGGGAGCCTGTCCTGGTTCCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTATGTCTGC
100 A P V P H P D P P M A L S R T P T R Q I
721 GCCCCTGTCCCCACCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGGCAGATC
120 G S I D T D P P A D G P S N P L C C C F
781 GGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCCCTCCAACCTCTCTGCTGCTGTTTC
140 H G P A F S T L N P V L R H L F P Q E A
841 CATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCCAGGAAGCC
160 F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P A P
901 TTCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCCCGCACCC
180 S R G Q A L R R A R *
961 AGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCCGGTAAaggctgagatgaagtggactgagtaga
1021 actggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtcctccagagatggggcctggaggcc
1081 tggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcagcacagc
1141 gtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Fig. 2E

A sequência de ADNc (SEQ ID NO: 15) e aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de PSCA v.5. A metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se desde o ácido nucleico 910 ao 1479 incluindo o codão de terminação.

```

1 gacagtgaaccctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacagggc
61 cccagggtttctgtgcccagtcagcccaggacggtctctcccggcagtttctgatgcgggg
121 agggcagtgctgccttccggtcaccaggaccagtgctcagcccgcctgcttgacccctt
181 acttagctgggtccaatccataaccaatattagatgattcagaagatgggatttgaact
241 tttgaactgggtgagacttaagcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtga
301 gcaacgaggaactgctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccg
361 cgcgcatccgtgagtggggggacgacagccgccaggcctaggtctctgccactgaactat
421 taatctttctggccatctgtccgcatctgtgtgtgtgttttccctccacctgtcccagcc
481 cgtcccgcacctgcaccccccaacaatcaccagcatctgtccctccagccatctctctcc
541 atctgccactcctccactcactctgtccctccccatcctccatcttccactcctccacca
601 tctgtccctcccatccctgagctcacttactcactcaccocatttctgaagctcagcgg
661 gtggtecatctgcctcggacatctggatagggtgagaccagggccgagaccaggccctc
721 gcactgcttgcaatcctgagccagcccagggggactctagagcattaggcaggtgggga
781 caggaggaggcctggggcaggtcaggcaggtgagcaccagggcagccccatccccggat
841 cccgctgctcccagggcaggtggcctcctgaccgctcatcagcaaaggctgcagcttga
1      M T H R T T T W A R R T S R A V T
901 actgctggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACA
18 P T C A T P A G P M P C S R L P P S L R
961 CCGACTGTGCAACGCCAGCGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTSCCGCCATCCTTCGCG
38 C S L H S A C C S G D P A S Y R L W G A
1021 TGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGACCCCGCCAGCTATAGSCTCTGGGGGGCC
58 P L Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P
1081 CCGCTGCAGCCACACTGGGTGTGGTGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACCCCG
78 A Q W E P V L V P E A H P N A S L T M Y
1141 GCCCAGTGGGAGCCTGTCTGTTCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTAT
98 V C A F V P H P D P P M A L S R T F T R
1201 GTCTGCGCCCTGTCCCCCACCCTGACCCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCCG
118 Q I G S I D T D P P A D G P S N P L C C
1261 CAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCTCCAACCCCTCTCTGCTGC
138 C F H G P A F S T L N P V L R H L F P Q
1321 TGTTCATGGCCAGCATTTCTCACCCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCCAG
158 E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P
1381 GAAGCCTTCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCCC
178 A P S R G Q A L R R A R *
1441 GCACCCAGCAGGGGACAGGCACCTCAGGAGGGCCCGGTAAGgetgagatgaagtggactg
1501 agtagaactggaggacagggagtcgacgtgagttcctgggagtctccagagatggggcctg
1561 gaggcctggaggaaggggcccagggcctccatctgtggggctcctgaatggcagcctcag
1621 cacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Fig. 2F

A sequência de ADNc (SEQ ID NO: 19) e aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de PSCA v.6. A sequência Kozak mostra-se em **negrito**, a metionina de iniciação está sublinhada. A grelha de leitura aberta estende-se desde o ácido nucleico 83 ao 427 incluindo o codão de terminação.

```

1 tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaa
1           M A G L A L Q P G T A L L
61 ggctgtgctgcttgcctgttgATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT
14 C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC
34 Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I
181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGCCTGGACCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
54 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAACCTGCGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
74 N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCATGCCCTGCAGCC
94 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
361 GGCTGCCGCCATCCTTGGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
114 L *
421 GCTATAGgctctggggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactcctcacacaccggccagtgaggcctgtcctggttcctgaggeacatccta
541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgcgccctgtccccaccctgaccctcccatggccc
601 tctccaggactcccaccggcagatcggctctattgacacagatccgctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccaccettaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccaggaagccttccctgccccaccatctatgacttgagccagg
781 tctggtccgtggtgtccccgcacccagcaggggacagggcactcaggagggcccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtgcacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacatcgtggggc
961 tcctgaatggcagcctcagcacagcgtagcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Fig. 2G

Variantes de SNP de PSCA v.2, PSCA v.7 a v.18. As proteínas PSCA v.7 a v.18 têm 123 aminoácidos. As Variantes PSCA v.7 a v.18 são variantes com diferença de nucleótido simples de PSCA v.2, e codificam a mesma proteína que v.2. Embora estas variantes de SNP sejam mostradas por separado, também podem aparecer em qualquer combinação e em qualquer das variantes de transcrito enumeradas anteriormente nas Figuras 2A a 2F.

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

Fig. 2H

Variantes de SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 a v.30. As proteínas PSCA v.19 a v.30 têm 189 aminoácidos. As variantes de PSCA v.19 a v.30 são variantes com diferença de nucleótido simples de PSCA v.4. As proteínas PSCA v.9, v.10, v.11, v.24 e v.25 diferem de PSCA v.1 num aminoácido. PSCA v.23, v.28, v.29 e v.30 codificam a mesma proteína que v.4. Embora estas variantes de SNP sejam mostradas por separado, também podem aparecer em qualquer combinação e em qualquer das variantes de transcrito v.3 e v.4.

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

Fig. 3A

Sequência de aminoácidos de PSCA v.1 (SEQ ID NO: 6). A
 proteína PSCA v.1 tem 123 aminoácidos.
 1 MKAVLLALLM AGLALQPGTA LLCYSCKAQV SNEDCLQVEN CTQLGEQCWT ARIRAVGLLT
 61 VISKGCSSLNC VDDSQDYVVG KKNITCCDTD LCNASGAHAL QPAAAILALL PALGLLLWGP
 121 GQL

Fig. 3B

Sequência de aminoácidos de PSCA v.3 (SEQ ID NO: 10). A
 proteína PSCA v.3 tem 94 aminoácidos.
 1 MYVCAVPHD DPMALSRTP TRQIGSIDTD PPADGPSNPL CCCFHGPAFS TLNPVLRHLF
 61 PQEAFPAHPI YDLSQVWSVV SPAPSRGQAL RRAR

Fig. 3C

Sequência de aminoácidos de PSCA v.4 (SEQ ID NO: 14). A
 proteína PSCA v.4 tem 189 aminoácidos.
 1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG
 121 SIDTDPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSFAPS
 181 RGQALRRAR

Fig. 3D

Sequência de aminoácidos de PSCA v.6 (SEQ ID NO: 20). A
 proteína PSCA v.6 tem 114 aminoácidos.
 1 MAGLALQPGT ALLCYSCKAQ VSNEDCLQVE NCTQLGEQCW TARIRAVGLL TVISKGCSSLN
 61 CVDDSQDYV GKNITCCDT DLCNASGAHA LQPAAAILAL LPALGLLLWG PGQL

Fig. 3E

Sequência de aminoácidos de PSCA v.19 (SEQ ID NO: 21). A
 proteína PSCA v.19 tem 189 aminoácidos.
 1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLLPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG
 121 SIDTDPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSFAPS
 181 RGQALRRAR

Fig. 3F

Sequência de aminoácidos de PSCA v.20 (SEQ ID NO: 22). A
 proteína PSCA v.20 tem 189 aminoácidos.
 1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SSRLWGAPLQ
 61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG

121 SIDTDFPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAF PAHPIYDLSQ VWSVVSPAPS
181 RGQALRRAR

Fig. 3G

Sequência de aminoácidos de PSCA v.21 (SEQ ID NO: 23). A
proteína PSCA v.21 tem 189 aminoácidos.

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

Fig. 3H

Sequência de aminoácidos de PSCA v.22 (SEQ ID NO: 24). A
proteína PSCA v.22 tem 189 aminoácidos.

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

Fig. 3I

Sequência de aminoácidos de PSCA v.24 (SEQ ID NO: 25). A
proteína PSCA v.24 tem 189 aminoácidos.

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

Fig. 3J

Sequência de aminoácidos de PSCA v.25 (SEQ ID NO: 26). A
proteína PSCA v.25 tem 189 aminoácidos.

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

Fig. 3K

Sequência de aminoácidos de PSCA v.26 (SEQ ID NO: 27). A
proteína PSCA v.26 tem 189 aminoácidos.

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

Fig. 3L

Sequência de aminoácidos de PSCA v.27 (SEQ ID NO: 28). A proteína PSCA v.27 tem 189 aminoácidos.

```

1 MTHRTTTWAR RTSRAVTPTC ATPAGPMPCS RLPPSLRCSL HSACCSGDPA SYRLWGAPLQ
61 PTLGVVPQAS VPLLTHPAQW EPVLVPEAHP NASLTMVCA PVPHPDPPMA LSRTPTRQIG
121 SIDTDPADG PSNPLCCCFH GPAFSTLNPV LRHLFPQEAFF PAHPIYDLSQ VWSVSPAPS
181 RGQALRRAR

```

Fig. 4

Alinhamento de PSCA v.4 (SEQ ID NO: 14) com homólogos conhecidos

Alinhamento com antigénio de células estaminais de próstata humana (gi 27482160) (SEQ ID NO: 30)

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

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

```

Consulta: 1 MTHRTTTWARRTSRAVTPTCATPAGPMPCSRLPPSLRCSLHSACCSGDPA SYRLWGAPLQ 60
Objeto: 1 MTHRTTTWARRTSRAVTPTCATPAGPMPCSRL PSLRCSLHSACCSGDPA SYRLWGAPLQ 60

Consulta: 61 PTLGVVPQASVPLLTHPAQWEPVLVPEAHPNASLTMVCA PVPHPDPPMALSRTPTRQIG 120
Objeto: 61 PTLGVVPQASVPLLTHPAQWEPVLVPEAHPNASLTMVCA PVPHPDPPMALSRTPTRQIG 120

Consulta: 121 SIDTDPADGPSNPLCCCFH GPAFSTLNPVLRHLFPQEAFF PAHPIYDLSQVWSVSPAPS 180
Objeto: 121 SIDTDPADGPSNPLCCCFH GPAFSTLNPVLRHLFPQEAFF PAHPIYDLSQVWSVSPAPS 180

Consulta: 181 RGQALRRAR 189
Objeto: 181 RGQALRRAR 189

```