



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0520902-1 B1



(22) Data do Depósito: 17/05/2005

(45) Data de Concessão: 30/11/2021

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA A PROTEÍNAS PSCA PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DOS MESMOS, HIBRIDOMA, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, COMPOSIÇÃO, ENSAIO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA PROTEÍNA PSCA E MÉTODO DE DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA PSCA

(51) Int.Cl.: C12Q 1/00; G01N 33/53; A01N 61/00.

(30) Prioridade Unionista: 02/12/2004 US 60/633,077; 05/10/2004 US 60/616,381; 12/10/2004 US 60/617,881; 14/04/2005 US 60/672,000; 21/10/2004 US 60/621,310; (...).

(73) Titular(es): AGENSY, INC..

(72) Inventor(es): JEAN GUDAS; AYA JAKOBOVITS; XIAO-CHI JIA; ROBERT KENDALL MORRISON; KAREN JANE MEYRICK MORRISON; HUI SHAO; PIA M. CHALLITA-EID; ARTHUR B. RAITANO.

(86) Pedido PCT: PCT US2005017412 de 17/05/2005

(87) Publicação PCT: WO 2005/118864 de 15/12/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 12/05/2011

(62) Pedido Original do Dividido: PI0511624-4 - 17/05/2005

(57) Resumo: ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA A PROTEÍNAS PSCA PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DOS MESMOS, HIBRIDOMA, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR, CÉLULA, COMPOSIÇÃO, ENSAIO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA PROTEÍNA PSCA E MÉTODO DE DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA PSCA. A presente invenção refere-se a anticorpos e moléculas derivadas dos mesmos que ligam a nova proteína de PSCA, e variantes da mesmas, em que PSCA apresenta expressão tecido específica em tecido adulto normal, e é expressado de modo aberrante nos cânceres listados na Tabela 1. Consequentemente, PSCA proporciona um alvo diagnóstico, prognóstico, profilático e/ou terapêutico para câncer. O gene PSCA ou fragmento do mesmo, ou sua proteína codificada, ou variantes da mesma, ou um fragmento da mesma, podem ser usados para provocar uma reação imune humoral ou celular; anticorpos ou células T reativas com PSCA podem ser usados em imunização ativa ou passiva.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
**"ANTICORPO MONOCLONAL OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO
ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA A PROTEÍNAS PSCA PARA
DIAGNÓSTICO DE CÂNCER, MÉTODO PARA PRODUÇÃO DOS
MESMOS, HIBRIDOMA, POLINUCLEOTÍDEO, VETOR,
COMPOSIÇÃO, ENSAIO PARA DETECTAR A PRESENÇA DE UMA
PROTEÍNA PSCA E MÉTODO DE DETECÇÃO DE UMA PROTEÍNA
PSCA".**

Pedido dividido do PI 0511624-4, depositado em
17.05.2005.

Referência Remissiva a Pedidos Relacionados

[0001] O presente pedido de patente é relacionado ao pedido de patente dos Estados Unidos pendente número 10/857,484, depositado em 28 de Maio de 2004, o qual reivindica prioridade ao pedido de patente Provisório dos Estados Unidos número 60/475.064, depositado em 30 de Maio de 2003; Esses pedidos estão relacionados ao Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº: 60/616,381, depositado em 05 de Outubro de 2004; Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº: 60/617.881, depositado em 12 de Outubro de 2004; e Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº: 60/621.310, depositado em 21 de Outubro de 2004; Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº: 60/633.077, depositado em 02 de Dezembro de 2004; e Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº: Ainda Não Cedido, depositado em 14 de Abril de 2005. O presente pedido está relacionado ao Pedido de Patente PCT Nº: PCT/US2004/017231, depositado em 28 de Maio de 2004. Os conteúdos de cada pedido listado nesse parágrafo são totalmente incorporados por referência aqui.

Estabelecimento de Direitos Sobre Invenções Feito Sob Pesquisa
Federalmente Patrocinada

[0002] NÃO Aplicável.

Campo da Invenção

[0003] A invenção descrita aqui se refere a anticorpos, bem como fragmentos de ligação dos mesmos e moléculas manipuladas dos mesmos, que se ligam à proteínas denominadas PSCA. A invenção ainda se refere a métodos diagnósticos, profiláticos e terapêuticos e a composições úteis no tratamento de cânceres que expressam PSCA.

Antecedentes da Invenção

[0004] O câncer é a segunda causa que leva à morte de seres humanos próximo da doença coronariana. No mundo todo, milhões de pessoas morrem de câncer a cada ano. Nos Estados Unidos apenas, conforme reportado pela American Câncer Society, o câncer causa a morte de mais de meio milhão de pessoas anualmente, com mais de 1,2 milhões de novos casos diagnosticados por ano. Embora as mortes por doença cardíaca venham declinando significativamente, aquelas resultantes de câncer geralmente estão aumentando. No final do próximo século, é previsto que o câncer se torne a causa principal de morte.

[0005] No mundo todo, vários cânceres são tidos como assassinos em potencial. Em particular, carcinomas do pulmão, próstata, mama, cólon, pâncreas, ovário e bexiga representam as causas primárias de morte por câncer. Esses e virtualmente todos os outros carcinomas compartilham uma característica letal comum. Com muito poucas exceções, a doença metastática de um carcinoma é fatal. Além disso, mesmo para aqueles pacientes com câncer que inicialmente sobrevivem a seus cânceres primários, experiência comum tem mostrado que suas vidas são dramaticamente alteradas. Muitos pacientes com câncer experimentam forte ansiedade oriunda da ciência do potencial de recorrência ou falha do tratamento. Muitos pacientes com câncer experimentam debilitações físicas após o

tratamento. Além disso, muitos pacientes com câncer experimentam uma recorrência.

[0006] No mundo todo, o câncer de próstata é o quarto câncer mais prevalente em homens. Na América do Norte e Norte da Europa, ele é o câncer mais comum em homens e é a segunda causa de morte por câncer em homens. Nos Estados Unidos apenas, mais de 30.000 homens morrem anualmente dessa doença - segundo apenas ao câncer de pulmão. Apesar da magnitude desses quadros, não existe tratamento eficaz para câncer de próstata metastático. Prostatectomia cirúrgica, terapia de radiação, terapia com eliminação de hormônio, castração cirúrgica e quimioterapia continuam a ser as principais modalidades de tratamento. Infelizmente, esses tratamentos são ineficazes para muitos e frequentemente estão associados a consequências indesejáveis.

[0007] Na frente diagnóstica, a falta de um marcador de tumor de próstata que pode detectar precisamente tumores localizados em estágio precoce permanece uma limitação significativa no diagnóstico e gerenciamento dessa doença. Embora o ensaio com antígeno próstata-específico (PSA) no soro tenha sido uma ferramenta muito útil, contudo, sua especificidade e utilidade geral são amplamente consideradas como falhas em vários aspectos importantes.

[0008] O progresso na identificação de marcadores específicos adicionais para o câncer de próstata foi melhorado através da geração de xenoinxertos de câncer de próstata que podem recapitular diferentes estágios da doença em camundongos. Os xenoinxertos de LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) são xenoinxertos de câncer de próstata que sobreviveram à passagem em camundongos imunodeficientes combinados graves (SCID) e exibem a capacidade de imitar a transição de dependência de androgênio para independência de androgênio (Klein *et al.*, 1997, Nat. Med. 3: 402). Mais

recentemente, marcadores de câncer de próstata identificados incluem PCTA-1 (Su *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), antígeno da membrana próstata-específico (PSM) (Pinto *et al.*, Clin Câncer Res, Setembro de 1996, 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 7 de Dezembro de 1999; 96(25): 14523-8) e antígeno da célula-tronco de próstata (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

[0009] Embora os marcadores previamente identificados, tais como PSA, PSM, PCTA e PSCA, tenham facilitado os esforços para diagnosticar e tratar o câncer de próstata, existe a necessidade de identificação de marcadores e alvos terapêuticos adicionais para o câncer de próstata e relacionados de forma a melhorar adicionalmente o diagnóstico e terapia.

[00010] O carcinoma de células renais (RCC) soma aproximadamente 3 por cento das 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 de 1998. O carcinoma de células transicionais é menos freqüente, com uma incidência de aproximadamente 500 casos por ano nos Estados Unidos.

[00011] Cirurgia tem sido a terapia primária para adenocarcinoma de células renais durante muitas décadas. Até recentemente, doença metastática tem sido resistente a qualquer terapia sistêmica. Com desenvolvimentos recentes nas terapias sistêmicas, particularmente imunoterapias, o carcinoma de células renais metastático pode ser agressivamente abordado em pacientes apropriados com uma

possibilidade de respostas duráveis. Todavia, existe uma necessidade restante por terapias eficazes para esses pacientes.

[00012] De todos os novos casos de câncer nos Estados Unidos, o câncer 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 aumentando lentamente, concorrente com um aumento na população de idosos. Em 1998, foram estimados 54.500 casos, incluindo 39.500 em homens e 15.000 em mulheres. A incidência idade-relacionada nos Estados Unidos é de 32 por 100.000 para homens e oito por 100.000 em mulheres. A proporção histórica homem/mulher de 3:1 pode estar diminuindo com relação aos padrões de fumo em mulheres. Foram estimadas 11.000 mortes por câncer de bexiga em 1998 (7.800 em homens e 3.900 em mulheres). A incidência e mortalidade por câncer de bexiga aumentam fortemente com a idade e será um grande problema à medida que a população se torna mais idosa.

[00013] A maioria dos cânceres de bexiga ocorrem na bexiga. O câncer de bexiga é tratado com uma combinação de ressecção transuretral da bexiga (TUR) e quimioterapia intravesical ou imunoterapia. A natureza multifocal e recorrente do câncer de bexiga destaca as limitações da TUR. A maior parte dos cânceres músculo-invasivos não é curada pela TUR apenas. Cistectomia radical e desvio urinário é o meio mais eficaz para eliminar o câncer, mas trazem um impacto inegável sobre a função urinária e sexual. Continua a existir uma necessidade significativa por modalidades de tratamento que são benéficas para pacientes com câncer de bexiga.

[00014] Estima-se que 130.200 casos de câncer colorretal ocorreram em 2000 nos Estados Unidos, incluindo 93.800 casos de câncer de cólon e 36.400 de câncer retal. Cânceres cólon-retais são o terceiro câncer mais comum em homens e mulheres. As taxas de

incidência declinaram significativamente durante 1992-1996 (-2,1% por ano). Pesquisa sugere que esses declínios têm sido em virtude de triagem e remoção de pólipos aumentadas, impedindo a progressão de pólipos para cânceres invasivos. Foram estimadas 56.300 mortes (47.700 por câncer de cólon, 8.600 por câncer retal) em 2000, somando cerca de 11% de todas as mortes por câncer nos E.U.A.

[00015] No momento, cirurgia é a forma mais comum de terapia para câncer colorretal e, para cânceres que não se disseminaram, é freqüentemente curativa. Quimioterapia ou quimioterapia mais radiação é fornecida antes ou após cirurgia a maioria dos pacientes cujo câncer perfurou profundamente a parede do intestino ou se disseminou para os nódulos linfáticos. Uma colostomia permanente (criação de uma abertura abdominal para eliminação de resíduos corporais) é ocasionalmente necessária para o câncer de cólon e, não freqüentemente, é requerida para o câncer retal. Continua a existir uma necessidade por modalidades diagnósticas e de tratamento eficazes para o câncer colorretal.

[00016] Estima-se 164.100 novos casos de câncer de pulmão e brônquico em 2000, somando 14% de todos os diagnósticos de câncer nos E.U.A. A taxa de incidência de câncer de pulmão e brônquico está declinando significativamente em homens, de tão alto quanto 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.

[00017] Estima-se que o câncer de pulmão e brônquico causou 156.900 mortes em 2000, somando 28% de todas as mortes por câncer. Durante 1992-1996, a mortalidade por câncer de pulmão declinou significativamente entre homens (-1,7% por ano), enquanto que as taxas para mulheres ainda estão aumentando significativamente (0,9% por ano). Desde 1987, mais mulheres

morreram por ano de câncer de pulmão do que de câncer de mama o qual, durante mais de 40 anos, era a principal causa de morte por câncer em mulheres. A diminuição da incidência de câncer de pulmão e das taxas de mortalidade resultou, mais provavelmente, das taxas diminuídas de fumo durante os últimos 30 anos; contudo, a diminuição dos padrões de fumo entre as mulheres sofre um retardo com relação às das dos homens. Preocupante é que, embora os declínios no uso de tabaco por adultos tenha diminuído, o uso de tabaco em jovens vem aumentando novamente.

[00018] As opções de tratamento para câncer de pulmão e brônquico são determinadas pelo tipo e estágio do câncer e incluem cirurgia, terapia de radiação e quimioterapia. Para muitos cânceres localizados, cirurgia usualmente é o tratamento de escolha. Em virtude do fato de a doença usualmente ter se disseminado até o momento de ser descoberta, terapia de radiação e quimioterapia são freqüentemente necessárias em combinação com cirurgia. Quimioterapia apenas ou combinada com radiação é o tratamento de escolha para câncer de pulmão de células pequenas; sob esse regime, um grande percentual de pacientes experimentam remissão a qual, em alguns casos, é de longa duração. Existe, contudo, uma necessidade crescente por um tratamento e abordagens diagnósticas eficazes para cânceres de pulmão e brônquico.

[00019] Estima-se que 182.800 novos casos invasivos de câncer de mama ocorram entre mulheres nos Estados Unidos durante 2000. Adicionalmente, espera-se que cerca de 1.400 novos casos de câncer de mama sejam diagnosticados em homens em 2000. Após um aumento de cerca de 5% por ano na década de 1980, as taxas de incidência de câncer de mama em mulheres nivelaram na década de 1990 para cerca de 110,6 casos por 100.000.

[00020] Nos E.U.A. apenas, estima-se 41.200 mortes (40.800

mulheres, 400 homens) em 2000 em virtude de câncer de mama. O câncer de mama é o segundo entre as mortes por câncer em mulheres. De acordo com os dados mais recentes, as taxas de mortalidade declinaram significativamente durante 1992-1996, com as menores diminuições em mulheres mais jovens, brancas e negras. Essas diminuições provavelmente são o resultado de detecção precoce e tratamento aperfeiçoado.

[00021] Levando-se em conta as circunstâncias médicas e as preferências do paciente, o tratamento de câncer de mama pode envolver lumpectomia (remoção local do tumor) e remoção dos nódulos linfáticos sob o braço; mastectomia (remoção cirúrgica da mama) e remoção dos nódulos linfáticos sob o braço; terapia de radiação; quimioterapia; ou terapia 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. Avanços significativos nas técnicas de reconstrução proporcionam várias opções para reconstrução da mama após mastectomia. Recentemente, tal reconstrução foi feita ao mesmo tempo que a mastectomia.

[00022] Excisão local do carcinoma ductal *in situ* (DCIS) com quantidades adequadas de tecido da mama normal circundante pode prevenir a ocorrência local de DCIS. Radiação na mama e/ou tamoxifeno podem reduzir a chance de que DCIS ocorra no tecido restante da mama. Isso é importante porque a DCIS, se deixada não tratada, pode se desenvolver em câncer de mama invasivo. Todavia, existem graves efeitos colaterais ou seqüelas desses tratamentos. Portanto, existe uma necessidade de tratamentos eficazes para o câncer de mama.

[00023] Estima-se 23.100 novos casos de câncer ovariano nos Estados Unidos em 2000. Ele soma 4% de todos os cânceres entre mulheres e é classificado como segundo dentre os cânceres ginecológicos. Durante 1992-1996, as taxas de incidência de câncer ovariano declinaram significativamente. Em consequência de câncer ovariano, estima-se 14.000 mortes em 2000. O câncer ovariano causa mais mortes do que qualquer outro câncer do sistema reprodutor feminino.

[00024] Cirurgia, terapia de radiação e quimioterapia são as opções de tratamento para o câncer ovariano. 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, apenas 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 a fim de intensificar o efeito da quimioterapia. Continua a existir uma necessidade importante por opções de tratamento eficazes para o câncer ovariano.

[00025] Estima-se 28.300 novos casos de câncer pancreático nos Estados Unidos em 2000. Nos últimos 20 anos, as taxas de câncer pancreático têm declinado em homens. As taxas entre mulheres permaneceram aproximadamente constantes, mas podem estar começando a declinar. Estima-se que o câncer pancreático causará 28.200 mortes 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.

[00026] Cirurgia, terapia de radiação e quimioterapia são as opções de tratamento para câncer pancreático. Essas opções de tratamento podem aumentar a sobrevivência e/ou aliviar os sintomas em muitos

pacientes, mas é provável que não produza uma cura para a maioria. Existe uma necessidade significativa de opções terapêuticas e diagnósticas adicionais para cânceres. Essas incluem o uso de antibióticos, vacinas e pequenas moléculas como modalidades de tratamento. Adicionalmente, existe também uma necessidade de usar essas modalidades como ferramentas de pesquisa para diagnosticar, detectar, monitorar o estado da técnica em todas as áreas de tratamento e estudos de câncer.

[00027] A utilidade terapêutica de anticorpos monoclonais (mAbs) (G. Kohler e C. Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)) está sendo obtida. Anticorpos monoclonais foram agora aprovados como terapias em transplante, câncer, doença infecciosa, doença cardiovascular e inflamação. Diferentes isotipos têm diferentes funções efetadoras. Tais diferenças na função se refletem em estruturas tridimensionais distintas para os vários isotipos de imunoglobulina (P.M. Alzari *et al.*, *Annual Rev. Immunol.*, 6: 555-580 (1988)).

[00028] Em virtude do fato de camundongos serem convenientes para imunização e reconhecem a maioria dos antígenos humanos como estranhos, mAbs contra alvos humanos com potencial terapêutico têm sido, tipicamente, originários de murina. Contudo, mAbs de murina têm desvantagens inerentes como produtos terapêuticos humanos. Eles requerem dosagem mais freqüente, uma vez que os mAbs têm uma meia-vida em circulação mais curta em seres humanos do que anticorpos humanos. Mais criticamente, a administração repetida de anticorpos de murina ao sistema imune humano faz com que o sistema imune humano responda reconhecendo a proteína de camundongo como estranha e gerando uma resposta de anticorpo anti-camundongo humana (HAMA). Tal resposta HAMA pode resultar em reação alérgica e na rápida eliminação do anticorpo de murina do sistema, desse modo, tornando

o tratamento através de anticorpos de murina ineficaz. Para evitar tais efeitos, tentativas de criar sistemas imunes humanos dentro de camundongos foram feitas.

[00029] Tentativas iniciais esperavam criar camundongos transgênicos capazes de responder a antígenos com anticorpos tendo seqüências humanas (veja Bruggemann *et al.*, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86: 6709-6713 (1989)), mas estavam limitadas pela quantidade de DNA que poderia ser estavelmente mantida pelos veículos de clonagem disponíveis. O uso de vetores de clonagem de cromossoma artificial de levedo (YAC) levou à forma para introduzir grandes fragmentos de linhagem germinativa do locus de Ig humana em mamíferos transgênicos. Essencialmente a maioria dos genes da região V, D e J humana dispostos com o mesmo espaçamento encontrado no genoma humano e as regiões constantes humanas foram introduzidas em camundongos usando YACs. Um de tais gêneros de camundongo transgênico é conhecido como camundongo XenoMouse(r) e está comercialmente disponível da Abgenix, Inc. (Fremont CA).

Sumário da Invenção

[00030] A invenção proporciona anticorpos, bem como fragmentos de ligação dos mesmos e moléculas manipuladas dos mesmos, que se ligam a proteínas de PSCA e fragmentos de polipeptídeo de proteínas de PSCA. A invenção compreende anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos de murina e outros mamíferos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e totalmente humanos e anticorpos ligados com um marcador detectável ou agente terapêutico. Em determinadas modalidades, existe também uma observação de que a seqüência de ácido nucléico da Figura 3 não é codificada e/ou a seqüência de aminoácidos inteira da Figura 2 não é preparada. Em determinadas modalidades, a seqüência de ácido nucléico inteira da

Figura 3 é codificada e/ou a seqüência de aminoácidos inteira da Figura 2 é preparada, qualquer uma das quais está nas respectivas formas de dose unitária humana.

[00031] A invenção ainda proporciona métodos para detecção da presença e estado de polinucleotídeos e proteínas de PSCA em várias amostras biológicas, bem como métodos para identificação de células que expressam PSCA. Uma modalidade da presente invenção proporciona métodos para monitoramento de produtos genéticos de PSCA em um tecido ou amostra hematológica tendo ou que se suspeita ter alguma forma de desregulação de crescimento, tal como câncer.

[00032] A invenção ainda proporciona varias composições imunogênicas ou terapêuticas e estratégias para tratamento de cânceres que expressam PSCA, tais como cânceres dos tecidos listados na Tabela I, incluindo terapias objetivadas à inibição da transcrição, tradução, processamento ou função de PSCA, bem como vacinas contra o câncer. Em um aspecto, a invenção proporciona composições e métodos compreendendo as mesmas para o tratamento de um câncer que expressa PSCA em um indivíduo humano em que a composição compreende um veículo adequado para uso humano e uma dose unitária humana de um ou mais de um agente que inibe a produção ou função de PSCA. De preferência, o veículo é unicamente um veículo humano. Em outro aspecto da invenção, o agente é uma porção que é imunorreativa com a proteína de PSCA. Exemplos não limitativos de tais porções incluem, mas não estão limitados a, anticorpos (tais como anticorpos com cadeia simples, monoclonais, policlonais, humanizados, quiméricos ou humanos), equivalentes funcionais dos mesmos (quer ocorram naturalmente ou sintéticos) e combinações dos mesmos. Os anticorpos podem ser conjugados a uma porção terapêutica ou

diagnóstica. Em outro aspecto, o agente é uma pequena molécula conforme definido aqui.

Breve Descrição das Figuras

[00033] Figura 1. A seqüência de cDNA e aminoácido de PSCA (também denominada "PSCA v.1" ou "variante 1 de PSCA") é mostrada na Figura 1A. A metionina inicial está sublinhada. A rede de leitura aberta se estende do ácido nucléico 18-389, incluindo o códon terminal.

[00034] A seqüência de cDNA e aminoácido da variante 2 de PSCA (também denominada "PSCA v.2") é mostrada na Figura 1B. O códon para a metionina inicial está sublinhado. A rede de leitura aberta se estende do ácido nucléico 56-427, incluindo o códon terminal.

[00035] A seqüência de cDNA e aminoácido da variante 3 de PSCA (também denominada "PSCA v.3") é mostrada na Figura 1C. O códon para a metionina inicial está sublinhado. A rede de leitura aberta se estende do ácido nucléico 423-707, incluindo o códon terminal.

[00036] A seqüência de cDNA e aminoácido da variante 4 de PSCA (também denominada "PSCA v.4") é mostrada na Figura 1D. O códon para a metionina inicial está sublinhado. A rede de leitura aberta se estende do ácido nucléico 424-993, incluindo o códon terminal.

[00037] A seqüência de cDNA e aminoácido da variante 5 de PSCA (também denominada "PSCA v.5") é mostrada na Figura 1E. O códon para a metionina inicial está sublinhado. A rede de leitura aberta se estende do ácido nucléico 910-1479, incluindo o códon terminal.

[00038] A seqüência de cDNA e aminoácido da variante 6 de PSCA (também denominada "PSCA v.6") é mostrada na Figura 1F. O códon para a metionina inicial está sublinhado. A rede de leitura aberta se estende do ácido nucléico 83-427, incluindo o códon terminal.

[00039] Figura 1G. Variantes de SNP de PSCA v.2, PSCA v.7 a v.18. As proteínas de PSCA v.7 a v.18 têm 123 aminoácidos.

Variantes de PSCA v.7 a v.18 são variantes com diferença de um único nucleotídeo 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 1A a 1F.

[00040] Figura 1H. Variantes de SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 a v.30. As proteínas de PSCA v.19 a v.30 têm 189 aminoácidos. As variantes de PSCA v.19 a v.30 são variantes com diferença em um único nucleotídeo com relação à PSCA v.4. As proteínas de PSCA v.9, v.10, v.11, v.24 e v.25 diferem do PSCA v.1 por um único 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.

[00041] Figura 1I. Expressão de variantes de PSCA. (1I(a)) Iniciadores foram projetados para diferenciar entre as variantes PSCA v.1/v.2/v.4, PSCA v.3 e PSCA v.5. Os iniciadores A e B, indicados por pequenas setas acima dos éxons na figura, resultam em um produto de PCR de 425 bp para PSCA v.1/v.2/v.4, um produto de PCR de 300 bp para PSCA v.3 e um produto de PCR de 910 bp para PSCA v.5. (1I(b)) cDNA de primeira fita foi preparado a partir de bexiga, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago normais, reservatórios de câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, metástase de câncer e câncer de pâncreas. Normalização foi realizada através de PCR usando iniciadores à actina. PCR semi-quantitativa, usando os iniciadores variante-específicos, foi realizada em 30 ciclos de amplificação. Os resultados mostram a expressão de PSCA v.5

principalmente em câncer de mama, metástase de câncer e câncer de pâncreas e em menor nível no câncer de cólon e câncer de pulmão. O produto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado somente em próstata, estômago e em menor nível no rim e pulmão, enquanto que a PSCA v.5 não foi detectada em qualquer tecido normal. O produto de PSCA v.3 detectado por PCR não foi detectado em qualquer uma das amostras testadas.

[00042] Figura 1J. Expressão de PSCA v.4 e PSCA v.5. 1J(a) Iniciadores foram projetados para diferenciar entre PSCA v.4 e PSCA v.5, conforme indicado pelas setas ligadas B e C na figura. Iniciadores específicos para PSCA v.4 levaram a um produto de PCR de 460 bp, enquanto que iniciadores específicos para PSCA v.5 levam a um produto de PCR de 945 bp de tamanho. 1J(b) cDNA de primeira fita foi preparado a partir de bexiga, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago normais, reservatórios de câncer de próstata, câncer de bexiga e reservatórios de multixenoinxerto (xenoinxertos de câncer de próstata, câncer de rim e câncer de bexiga). Normalização foi realizada através de PCR usando iniciadores à actina. PCR semi-quantitativa, usando os iniciadores variante-específicos, foi realizada em 30 ciclos de amplificação. Os resultados mostram expressão de PSCA v.4 em câncer de próstata, câncer de bexiga e reservatório de multixenoinxerto, rim e próstata normais. PSCA v.5 foi detectada apenas em próstata normal e câncer de bexiga.

[00043] Figura 2. Seqüências de aminoácido de anticorpos à PSCA. Figura 2A. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.117 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2B. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.117 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2C. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.120 VH. Figura 2D. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.120 VL.

Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2E. A seqüência de aminoácidos de Ha1-5.99 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2F. A seqüência de aminoácidos de Ha1-5.99 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2G. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.121 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2H. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.121 VL c.5. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2I. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.121 VL c.26. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2J. A seqüência de aminoácidos de Ha1-1.16 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2K. A seqüência de aminoácidos de Ha1-1.16 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2L. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.5 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2M. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.5 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2N. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.40 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2O. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.40 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2P. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.37 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2Q. A seqüência de aminoácidos de Ha1-4.37 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2R. A seqüência de aminoácidos de Ha1-1.43 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2S. A seqüência de aminoácidos de Ha1-1.43 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 2T. A seqüência de aminoácidos de Ha1-1.152 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 2U. A seqüência de aminoácidos de Ha1-1.152 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve.

[00044] Figura 3. Seqüências de nucleotídeo e aminoácido de anticorpos à PSCA. Figura 3A. A seqüência de cDNA e aminoácido de

Ha1-4.117 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3B. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.117 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3C. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.120 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3D. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.120 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3E. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-5.99 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3F. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-5.99 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3G. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.121 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3H. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.121 VL c.5. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3I. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.121 VL c.26. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3J. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-1.16 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3K. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-1.16 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3L. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.5 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3M. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.5 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3N. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.40 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3O. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.40 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3P. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.37 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3Q. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-4.37 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3R. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-1.43 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada.

Figura 3S. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-1.43 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve. Figura 3T. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-1.152 VH. Sublinhada é a região constante de cadeia pesada. Figura 3U. A seqüência de cDNA e aminoácido de Ha1-1.152 VL. Sublinhada é a região constante de cadeia leve.

[00045] Figura 4. Alinhamento de anticorpos de PSCA às seqüências de linhagem germinativa V-D-J. Figura 4A. Alinhamento de Ha1-4.117 VH (SEQ ID NO: 13) à VH4-31 humana. Figura 4B. Alinhamento de Ha1-4.117 VL (SEQ ID NO: 14) à L19 humana. Figura 4C. Alinhamento de Ha1-4.120 VH (SEQ ID NO: 15) à VH4-31 humana. Figura 4D. Alinhamento de Ha1-4.120 VL (SEQ ID NO: 16) à O2 humana. Figura 4E. Alinhamento de Ha1-5.99 VH (SEQ ID NO: 17) à VH4-34 humana. Figura 4F. Alinhamento de Ha1-5.99 VL (SEQ ID NO: 18) à A27 humana. Figura 4G. Alinhamento de Ha1-4.121 VH (SEQ ID NO: 19) à VH4-34 humana. Figura 4H. Alinhamento de Ha1-4.121 c.5 VL (SEQ ID NO: 20) à O8 humana. Figura 4I. Alinhamento de Ha1-4.121 c.26 VL (SEQ ID NO: 21) à A3 humana. Figura 4J. Alinhamento de Ha1-1.16 VH (SEQ ID NO: 22) à VH6-1 humana. Figura 4K. Alinhamento de Ha1-1.16 VL (SEQ ID NO: 23) à B3 humana. Figura 4L. Alinhamento de Ha1-4.37 VH (SEQ ID NO: 28) à VH4-31 humana. Figura 4M. Alinhamento de Ha1-4.37 VL (SEQ ID NO: 29) à O2 humana.

[00046] Figura 5. Expressão de proteína de PSCA em linhagens de células de murina, rato e humana. As linhagens de células de murina, rato e humana indicadas foram infectadas com retrovírus trazendo o cDNA de PSCA humana e um gene de resistência à neomicina ou vírus de controle com apenas o gene de resistência à neomicina. Linhagens de células recombinantes estáveis foram selecionadas na presença de G418. Expressão de PSCA foi determinada através de

coloração com FACS com o MAb anti-PSCA 1G8 (5 ug/ml). é mostrado o perfil por FACS de cada linhagem de célula, demonstrando um desvio fluorescente apenas na linhagem infectada com PSCA indicativo de expressão de PSCA na superfície celular. Essas linhagens são úteis em desenvolvimento de MAb como imunogênios, reagentes para seleção de MAb e em ensaios funcionais.

[00047] Figura 6. Purificação de proteína de PSCA de *E. coli*. O gênero BL21 pLysS de *E. coli* foi transformado com o vetor pET-21b que codifica os aminoácidos 21-94 do cDNA de PSCA. Proteína de PSCA foi expressa através de indução de culturas na fase log com IPTG e purificada através de cromatografia por afinidade a partir de frações solúveis ou insolúveis das bactérias submetidas à lise. São mostrados géis corados com azul Coomassie por SDS-PAGE das frações eluídas. Essa proteína é útil como um MAb e imunogênio pAb e como um reagente para seleção de anticorpo.

[00048] Figura 7. Purificação de proteína de PSCA glicosilada recombinante expressa a partir de células 293T. Células 293T foram transfectadas com o vetor psecTag2 trazendo um cDNA de PSCA que codifica os aminoácidos 28-100. Uma linhagem de células que secreta PSCA recombinante estável foi criada através de seleção de droga com higromicina B. A proteína de PSCA presente em meio de cultura condicionado foi purificada através de cromatografia por afinidade usando o MAb 1G8. É mostrado um gel de SDS-PAGE corado com azul Coomassie das frações eluídas em baixo pH. O esfregaço de amplo peso molecular da proteína demonstra glicosilação da proteína de PSCA recombinante conforme ela é observada em PSCA endogenamente expresso.

[00049] Figura 8. Purificação de proteína GST-PSCA de *E. coli*. O gênero BL21 DE3 de *E. coli* foi transformado com pGEX-2T que codifica os aminoácidos 18-98 do PSCA fundida à glutathione-S-

transferase (GST). A proteína GST-PSCA foi induzida com isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) a partir de culturas na fase log e purificada a partir de bactérias submetidas à lise através de cromatografia por afinidade com matriz de agarose glutationa. É mostrado um gel corado com azul Coomassie por SDS-PAGE das frações eluídas de glutaciona contendo GST-PSCA. São indicados a proteína de fusão GST-PSCA intacta e um produto de degradação mínimo contendo GST. Essa proteína é útil como um MAb e imunogênio pAb e como um reagente de seleção de Ab.

[00050] Figura 9. Seleção de anticorpos de PSCA humana através de FACS. A concentração de anticorpo dos sobrenadantes foi determinada por ELISA. 50ul/cavidade de (puro) foram adicionados a lamina de FACS com 96 cavidades e serialmente diluídos. Células expressando PSCA foram adicionadas (endógenas ou recombinantes, 50.000 células/cavidade) e a mistura incubada a 4°C durante duas horas. Após incubação, as células foram lavadas com Tampão de FACS e ainda incubadas com 100 ul de anticorpo de detecção (anti-hIgG-PE) durante 45 minutos a 4°C. Ao final da incubação, as células foram lavadas com Tampão de FACS, fixadas com formaldeído e analisadas usando FACScan. Os dados foram analisados usando o software CellQuest Pro. Histogramas sólidos representam os dados de células de controle negativo e histogramas abertos indicam dados de células PSCA-positivas.

[00051] Figura 10. Classificação por afinidade relativa de MAbs de PSCA através de FACS. 21 diluições em série a 1:2 de cada anticorpo de PSCA foram incubadas com células SW780 (50.000 células por cavidade) durante a noite a 4°C (concentrações finais de MAb oscilavam de 40 nM a 0,038 pM). Ao final da incubação, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo de detecção anti-hIgG-PE. Após lavagem dos anticorpos secundários não ligados, as células

foram analisadas através de FACS e a intensidade de fluorescência média de cada ponto obtida usando o software CellQuest Pro. A afinidade foi calculada com o software Graphpad Prism usando uma equação de Dose-Resposta Sigmoidal (declínio variável). Uma análise por FACS representativa representando a titulação de ligação para o MAb de PSCA 4.121 é apresentada na Figura.

[00052] Figura 11. Expressão de PSCA de murina e macaco cynomologus em células 293T e reconhecimento pelos MAbs de PSCA anti-humana. Células 293T foram transitoriamente transfectadas com o vetor pCDNA3.1 trazendo o cDNA de PSCA de murina, o cDNA de PSCA de símio ou com vetor vazio (neo). Dois dias após transfecção, as células foram coletadas e coradas com o MAb anti-PSCA humano Ha1-4.117 ou o MAb de murina 1G8 (5 ug/ml). É mostrado o perfil por FACS demonstrando que o MAb Ha1-4.117 estimulado à proteína de PSCA humana se liga à proteína de PSCA de murina e símio expressa em células 293T. O MAb 1G8 de murina se liga à PSCA de símio, mas não à PSCA de murina. Tais resultados demonstram a capacidade de selecionar MAbs que reagem cruzadamente com antígeno de outras espécies. A reação cruzada de MAbs será útil para estudar a expressão e toxicidade nessas espécies.

[00053] Figura 12. Internalização de PSCA após incubação com Mab 4.121. Mab 4.121 de PSCA foi incubado com células PC3-PSCA a 4°C durante 90 minutos para permitir ligação dos anticorpos à superfície celular. As células foram, então, divididas em duas alíquotas e incubadas a 37°C (para permitir internalização) ou 4°C (controle sem internalização). Após incubação a 37°C ou 4°C, o Mab 4.121 de PSCA restante ligado à superfície celular foi removido com uma lavagem ácida. Subseqüente permeabilização e incubação com um anticorpo de detecção secundário permitiu a detecção do Mab 4.121 de PSCA internalizado. As células foram analisadas usando FACS ou

observadas sob um microscópio de fluorescência. Aproximadamente 30% do Mab 4.121 de PSCA foram internalizados após incubação a 37°C durante duas horas.

[00054] Figura 13. Anticorpos à PSCA mediam a morte saporina-dependente em células que expressam PSCA. Células B300.19 (750 células/cavidade) foram cultivadas em uma lâmina com 96 cavidades no dia 1. No dia seguinte, um volume igual de meio contendo uma concentração de 2X do anticorpo primário indicado junto com um excesso de 2 vezes de anticorpo policlonal anti-humano (Hum-Zap) ou anti-cabra (Goat-Zap) conjugado com toxina saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) foi adicionada a cada cavidade. As células foram deixadas incubar durante 5 dias a 37 graus C. Ao final do período de incubação, MTS (Promega) foi adicionado a cada cavidade e a incubação continuada durante mais 4 horas. A OD a 450 nM foi determinada. Os resultados na Figura 13(A) mostram que os anticorpos de PSCA HA1-4.121 e HA1-4.117 mediam a citotoxicidade saporina-dependente em células B300.19-PSCA enquanto que um controle, anticorpo IgG₁ não específico, não teve efeito. Os resultados na Figura 13(B) mostram que a adição de um anticorpo secundário saporina-conjugado que não reconhece a Fc humana, falhou em mediar a citotoxicidade.

[00055] Figura 14. Citotoxicidade complemento-mediada de MAbs de PSCA. Anticorpos de PSCA (0–50 µg/ml) foram diluídos com tampão RHB (RPMI 1640, Gibco Life Technologies, HEPES a 20 mM). Células B300.19 expressando PSCA foram lavadas em tampão RHB e resuspensas em uma densidade de 106 células/ml. Em um ensaio típico, 50 µl de anticorpo de PSCA, 50 µl de soro complementar de coelho diluído (Cedarlane, Ontario, Can) e 50 µl de uma suspensão de células foram adicionados juntos em uma lâmina com 96 cavidades de cultura tecidual com fundo plano. A mistura foi incubada durante 2

horas a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂ para facilitar a lise de células complemento-mediada. 50 µl de Alamar Blue (Biosource Intl. Camarillo, CA) foram adicionados a cada cavidade e a incubação continuada durante mais 4-5 horas a 37°C. A fluorescência em cada cavidade foi lida usando um fluorômetro para 96 cavidades com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. Os resultados mostram que anticorpos de PSCA tendo um isotipo IgG₁ (HA1-4.121) ou IgG₂ (HA1-5.99.1), mas não um isotipo IgG₄ (HA1-6.46), foram capazes de mediar a lise complemento-dependente de células alvo.

[00056] Figura 15. Geração de fragmentos F(ab')₂ de MAb Ha1-4.121 através de digestão com pepsina. 20 mgs de MAb Ha1-4.121 em tampão de acetato de sódio a 20 mM, pH de 4,5, foram incubados com e sem pepsina imobilizada (Pierce. Rockford IL) durante os tempos indicados. MAb intacto e fragmentos Fc digeridos foram removidos através de cromatografia por proteína A. É mostrado um gel corado com Coomassie por SDS-PAGE de MAb intacto não digerido não reduzido, alíquotas não reduzidas de material não digerido tomadas nos tempos indicados e uma amostra reduzida do produto de F(ab')₂ final digerido.

[00057] Figura 16. Ligação de mAb anti-PSCA humana recombinante à PSCA através de citometria de fluxo. (16A) Células 293T foram transfectadas com estruturas de expressão que codificam as cadeias pesada e leve do mAb anti-PSCA humana. O sobrenadante foi coletado após 48 horas e ensaiado com relação à ligação à PSCA. (16B) MAb anti-PSCA humana foi purificado a partir de sobrenadante de hibridoma e usado para ensaios de ligação à PSCA. A ligação à PSCA foi testada como segue. Células originais PC3 ou PC3-PSCA foram incubadas com os mAbs anti-PSCA humana descritos acima durante 30 minutos sobre gelo. As células foram lavadas e incubadas com Ig anti-humana PE-conjugada durante 30 minutos sobre gelo. As

células foram lavadas e, então, ensaiadas através de citometria de fluxo.

[00058] Figura 17. Detecção de proteína de PSCA através de imunoistoquímica. Expressão de proteína de PSCA em espécimes de tumor de pacientes com câncer foi detectada usando o anticorpo HA1-4.117. Tecidos incrustados em parafina, fixados em formalina foram cortados em seções de 4 microns e montados sobre lâminas de vidro. As seções foram desengorduradas, reidratadas e tratadas com solução de recuperação de antígeno (Antígeno Retrieval Citra Solution; BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA, 94583) em elevada temperatura. As seções foram, então, incubadas em antianticorpo de PSCA monoclonal humano fluoresceína-conjugado, Ha1-4.117, durante 16 horas a 4°C. As lâminas foram lavadas três vezes em tampão e adicionalmente incubadas com antifuoresceína de coelho durante 1 hora e, após lavagem em tampão, imersas em anticorpo secundário antiimunoglobulina de coelho peroxidase-conjugado DAKO EnVision+® (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) durante 30 minutos. As seções foram, então, lavadas em tampão, reveladas usando o kit DAB (SIGMA Chemicals), contra-coradas usando hematoxilina e analisadas através de microscopia com campo brilhante. Os resultados mostram a expressão de PSCA nas células tumorígenas de adenocarcinoma de próstata (Painel A, Painel B), carcinoma transicional de bexiga (Painel C) e adenocarcinoma dutal pancreático (Painel D). Esses resultados indicam que a PSCA é expressa em cânceres humanos e que anticorpos dirigidos a esse antígeno são úteis como reagentes diagnósticos.

[00059] Figura 18. MAb de PSCA Ha1-4.120 Inibe o crescimento de Xenoenxertos de Câncer de Próstata Subcutâneo. Células tumorígenas LAPC-9AI (2,0 x 10⁶ células) foram injetadas

subcutaneamente em camundongos SCID machos. Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ em cada grupo) e o tratamento iniciado intraperitonealmente (i.p.) no dia 0 com HA1-4.120 ou controle de isotipo de MAb conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana durante um total de 7 doses até o dia 28 do estudo. O crescimento do tumor foi monitorado usando medições do calibre a cada 3 a 4 dias, conforme indicado. Os resultados mostram que o anticorpo monoclonal anti-PSCA humana Ha1-4.120 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer de próstata humano implantados subcutaneamente em camundongos SCID ($p < 0,05$).

[00060] Figura 19. MAb de PSCA Ha1-5.99 Inibe o Crescimento de Xenoenxertos de Câncer de Próstata Estabelecido em Camundongos SCID. Células tumorígenas LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID machos. Quando o volume de tumor atingiu 50 mm^3 , os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ em cada grupo) e o tratamento iniciado intraperitonealmente (i.p.) com HA1-5.99.1 ou controle de isotipo de MAb conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana durante um total de 5 doses até dia 14 de estudo. Crescimento do tumor foi monitorado usando medições do calibre a cada 3 a 4 dias conforme indicado. Os resultados mostram que anticorpo monoclonal anti-PSCA humana Ha1-5.99 total inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer de próstata humano androgênio-independente estabelecidos implantados subcutaneamente em camundongos SCID ($p < 0,05$).

[00061] Figura 20. MAb de PSCA HA1-4.121 Inibe o Crescimento de Xenoenxertos de Câncer de Próstata Humano Androgênio-Dependente Estabelecidos. Células tumorígenas LAPC-9AD ($2,5 \times 10^6$ células) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID

machos. Quando o volume de tumor atingiu 40 mm³, os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos (n = 10 em cada grupo) e o tratamento foi iniciado intraperitonealmente (i.p.) com concentrações crescentes de HA1-4.121 ou MAb de controle de isotipo conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana durante um total de 7 doses até o dia 21 do estudo. O crescimento do tumor foi monitorado usando medições do calibre a cada 3 a 4 dias, conforme indicado. Os resultados desse estudo demonstraram que o HA1-4.121 inibiu o crescimento de xenoenxertos de próstata androgênio-dependente humanos subcutâneos estabelecidos em camundongos SCID. Os resultados eram estatisticamente significativos para o grupo com dose de 300 ug no dias 14, 17 e 21 ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, dois lados com $\alpha = 0,05$) e para a dose de 700 ug grupo no dias 10, 14, 17 e 21 ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, dois lados com $\alpha = 0,05$).

[00062] Figura 21. Células tumorígenas LAPC-9AD paciente-derivadas, androgênio-dependentes ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas nos lóbulos dorsais da próstata de camundongos SCID machos. Os tumores foram deixados crescer durante aproximadamente 10 dias, tempo no qual os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos. O tratamento com 500 ug de HA1-4.117, HA1-4.121 ou MAb de controle de isotipo humano foi iniciado 10 dias após implante do tumor. Anticorpos foram distribuídos intraperitonealmente duas vezes por semana durante um total de 7 doses. Quatro dias após a última dose, os animais foram sacrificados e os tumores primários excisados e pesados. Os resultados mostram que anticorpos monoclonais anti-PSCA humana Ha1-4.121 ($p < 0,01$) e Ha1-4.117 ($p < 0,05$) inibiram significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer de próstata LAPC-9AD ortotopicamente implantados em camundongos SCID.

[00063] Figura 22. MAb de PSCA HA1-4.121 Prolonga a Sobrevivência de Camundongos SCID com Tumores de Próstata Androgênio-Dependentes Humanos Ortotópicos Estabelecidos. Células tumorígenas LAPC-9AD paciente-derivadas, androgênio-dependentes ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas nos lóbulos dorsais da próstata de camundongos SCID machos. Os tumores foram deixados crescer durante aproximadamente 9 dias, tempo no qual os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos. Os animais aleatoriamente distribuídos em grupos de sobrevivência incluem 11 camundongos no MAb de controle de isotipo e 12 camundongos no grupo tratado com HA1-4.121. Os animais foram tratados i.p. com 1000 ug de Ha1-4.121 ou 1000 ug de MAb de controle de isotipo duas vezes por semana durante um total de 9 doses. Os resultados demonstraram que o HA1-4.121 (teste de log-classificação: $p < 0,01$) prolongou significativamente a sobrevivência de camundongos SCID com tumores de próstata androgênio-dependentes humanos. Dois camundongos no grupo tratado com HA1-4.121 permaneceram isentos de tumores palpáveis 110 dias após o último tratamento.

[00064] Figura 23. Inibição Intensificada de Crescimento de Tumor de Próstata com Terapia Combinada com HA1-4.21 e Taxotero. Células tumorígenas LAPC-9AI (2×10^6 células por animal) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID machos. Quando o volume do tumor atingiu 65 mm^3 , os animais foram aleatoriamente distribuídos e atribuídos a quatro diferentes grupos ($n = 10$ em cada grupo) conforme indicado. Começando no dia 0, Ha1-4.121 ou MAb de controle de isotipo foram administrados i.p. duas vezes por semana em uma dose de 500 ug durante um total de 6 doses. A última dose foi fornecida no dia 17. Taxotero foi fornecido intravenosamente em uma dose de 5 mg/kg no dias 0, 3 e 7. Crescimento do tumor foi monitorado

a cada 3-4 dias usando medições do calibre. Os resultados desse estudo demonstram que o HA1-4.121, como um agente único, inibiu o crescimento de xenoenxertos de próstata androgênio-independentes em camundongos SCID em 45% quando comparado com tratamento com anticorpo de controle apenas no dia 28 (ANOVA/teste de Tukey: $p < 0,05$). Administração do MAb de controle de isotipo mais taxotero inibiu o crescimento do tumor em 28% quando comparado com tratamento com anticorpo de controle apenas, o que não era estatisticamente significativo. A administração de HA1-4.121 em combinação com Taxotero intensificou o efeito e resultou em uma inibição de 69% de crescimento do tumor quando comparado com anticorpo de controle apenas (ANOVA/teste de Tukey: $p < 0,01$). Uma diferença estatisticamente significativa foi também demonstrada quando o grupo com a combinação HA1-4.121 mais Taxotero foi comparado com os grupos com HA1-4.121 ou MAb de controle de isotipo mais Taxotero (ANOVA/teste de Tukey: $p < 0,05$).

[00065] Figura 24. MAbs de PSCA Humano Inibem o Crescimento de Xenoenxertos de Câncer Pancreático em Camundongos SCID/HPAC Humano. Células de câncer pancreático (2×10^6 /camundongo) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID ICR-imunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ animais/grupo) e o tratamento com o anticorpo monoclonal de PSCA humana indicado iniciado no mesmo dia. Anticorpos (500 mg/camundongo) foram distribuídos intraperitonealmente duas vezes por semana durante um total de 8 doses. Os resultados demonstraram que anticorpos monoclonais anti-PSCA humano Ha1-4.121, Ha1-4.117 e Ha1-1.16 inibem significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer pancreático humano subcutaneamente implantados em camundongos SCID. Análises estatísticas foram realizadas usando um

t-teste (dois lados, $\alpha=0,05$).

[00066] Figura 25. MAb de PSCA HA1-4.121 Inibe o Crescimento de Tumores Pancreáticos Implantados Ortotopicamente em Camundongos SCID. Células HPAC ($3,0 \times 10^6$ células) foram implantadas ortotopicamente no pâncreas de camundongos SCID. Os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a três grupos ($n = 9$ em cada grupo) conforme indicado. O tratamento com HA1-4.121 (250 ug ou 1000 ug) ou MAb de controle de isotipo (1000 ug) foi iniciado no dia de implante. Anticorpos foram administrados i.p. duas vezes por semana durante um total de 10 doses. Treze dias após a última dose, os animais foram sacrificados e os tumores primários excisados e pesados. Os resultados desse estudo demonstraram que o HA1-4.121 inibiu significativamente o crescimento ortotópico de xenoinxertos de câncer pancreático humano em camundongos SCID em ambos os níveis de dose examinados. Tratamento com 250 ug e 1000 ug AGS-PSCA inibiu o crescimento do tumor em 66% e 70%, respectivamente (Kruskal-Wallis/teste de Tukey: $p<0,01$ e $p<0,01$, respectivamente).

[00067] Figura 26. MAb de PSCA HA1-4.121 Inibe Metástases. Na autópsia, metástases visíveis aos nódulos linfáticos e órgãos distantes foram observadas no grupo tratado com anticorpo de controle. Nenhuma metástase visível foi observada em ambos os grupos tratados com HA1-4.121. Nódulos linfáticos, pulmões e fígados foram removidos de todos os animais e examinados histologicamente com relação à presença de tumor metastático. As seções dos pulmões e nódulos linfáticos removidas de cada animal foram coradas para citoqueratina humana e o número de metástases determinado microscopicamente. Os resultados da análise histológica demonstraram uma redução significativa nas metástases no nódulo linfático (LN) em animais tratados com HA1-4.121 ($p = 0,0152$, conforme detectado através de teste exato de Fishers). A incidência de

metástase e invasão também foi diminuída significativamente nos animais tratados com ambas as concentrações de HA1-4.121 ($p = 0,0152$, conforme detectado através de teste exato de Fishers). O número de metástases no pulmão diminuiu significativamente em camundongos tratados com a dose de 1,0 mg de HA1-4.121 apenas ($p = 0,0498$, conforme detectado através de teste exato de Fishers).

[00068] Figura 27. MABs de PSCA Humana Inibem o Crescimento de Tumores de Bexiga SW780 em Camundongos SCID. Células de câncer de bexiga SW780 humano (2×10^6 / camundongo) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID ICR-imunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ animais/grupo) e o tratamento com o MAb de PSCA humano indicado iniciado no mesmo dia. Anticorpos (250 mg/camundongo) foram distribuídos intraperitonealmente duas vezes por semana durante um total de 7 doses. Os resultados demonstraram que o HA1-4.117 ($p = 0,014$), HA1-4.37 ($p = 0,0056$), HA1-1.78 ($p = 0,001$), Ha1-5.99 ($p = 0,0002$) e HA1-4.5 ($p = 0,0008$) inibiu significativamente o crescimento de tumores de bexiga SW780 implantados subcutaneamente em camundongos SCID. Análises estatísticas foram realizadas usando um t-teste (dois lados, $\alpha=0,05$).

Descrição Detalhada da Invenção

Esboço das Seções

- I.) Definições
- II.) Polinucleotídeos de PSCA
 - II.A.) Usos de Polinucleotídeos de PSCA
 - II.A.1.) Monitoramento de Anormalidades Genéticas
 - II.A.2.) Modalidades Antisentido
 - II.A.3.) Iniciadores e Pares de Iniciador
 - II.A.4.) Isolamento de Moléculas de Ácido nucléico que Codificam

PSCA

- II.A.5.) Moléculas de Ácido nucléico Recombinantes e Sistemas de Hospedeiro-Vetor
- III.) Proteínas de PSCA-Relacionadas
 - III.A.) Modalidades de Proteína Trazendo Motivo
 - III.B.) Expressão de Proteínas de PSCA-Relacionadas
 - III.C.) Modificações de Proteínas de PSCA-Relacionadas
 - III.D.) Usos de Proteínas de PSCA-Relacionadas
- IV.) Anticorpos de PSCA
- V.) Respostas Imunes Celulares à PSCA
- VI.) Animais Transgênicos para PSCA
- VII.) Métodos para a Detecção de PSCA
- VIII.) Métodos para Monitoramento do Estado de Genes PSCA-Relacionados e Seus Produtos
- IX.) Identificação de Moléculas Que interagem Com PSCA
- X.) Métodos e Composições Terapêuticas
 - X.A.) Vacinas Anti-Câncer
 - X.B.) PSCA Como um Alvo Para Terapia Anticorpo-Baseada
 - X.C.) PSCA Como um Alvo Para Respostas Imunes Celulares
 - X.C.1. Vacinas de Minigene
 - X.C.2. Combinações de Peptídeos de CTL com Peptídeos Auxiliares
 - X.C.3. Combinações de Peptídeos de CTL com Agentes que Produzem Células T
 - X.C.4. Composições de Vacina Compreendendo DC Pulsadas com CTL e/ou Peptídeos de HTL
 - X.D.) Imunoterapia Adotiva
 - X.E.) Administração de Vacinas para Fins Terapêuticos ou Profiláticos
- XI.) Modalidades Diagnósticas e Prognósticas de PSCA.
- XII.) Inibição de Função da Proteína de PSCA

- XII.A.) Inibição de PSCA Com Anticorpos Intracelulares
- XII.B.) Inibição de PSCA com Proteínas recombinantes
- XII.C.) Inibição de Transcrição ou Tradução de PSCA
- XII.D.) Considerações gerais para Estratégias Terapêuticas
- XIII.) Identificação, Caracterização e Uso de Moduladores de PSCA
- XIV.) RNAi e Uso Terapêutico de Pequeno RNA de Interferência (siRNAs)
- XV.) KITS/Artigos de Fabricação

I.) Definições:

[00069] A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos, notações e outros termos ou terminologia científica usados aqui se destinam a ter os significados comumente compreendidos por aqueles versados na técnica à qual a presente invenção pertence. Em alguns casos, termos com significados comumente compreendidos são definidos aqui para clareza e/ou para pronta referência e a inclusão de tais definições aqui não deverá ser necessariamente construída como representando uma diferença substancial sobre aquilo que é geralmente compreendido na técnica. Muitas das técnicas e procedimentos descritos ou mencionados aqui são bem compreendidos e comumente empregados usando metodologia convencional por aqueles versados na técnica tais como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular amplamente utilizadas descritas em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edição (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Conforme apropriado, procedimentos envolvendo o uso de kits e reagentes comercialmente disponíveis são geralmente realizados de acordo com os protocolos e/ou parâmetros definidos pelo fabricante, a menos que de outro modo observado.

[00070] Os termos "câncer de próstata avançado", "câncer de próstata localmente avançado", "doença avançada" e "doença

localmente avançada" significam cânceres de próstata que se estenderam através da cápsula da próstata e se destinam a incluir doença no estágio C sob o sistema da American Urological Association (AUA), doença em estágio C1-C2 sob o sistema de Whitmore-Jewett e doença em estágio T3 - T4 e N+ sob o sistema TNM (tumor, nódulo, metástase). Em geral, cirurgia não é recomendada para pacientes com doença localmente avançada e esses pacientes têm resultados substancialmente menos favoráveis comparado com pacientes tendo câncer de próstata clinicamente localizado (órgão-confinado). Doença localmente avançada é clinicamente identificada através de evidência palpável de endurecimento além da borda lateral da próstata ou assimetria ou endurecimento acima da base da próstata. Câncer de próstata localmente avançado é, atualmente, diagnosticado patologicamente após prostatectomia radical se o tumor invade ou penetra a cápsula da próstata e se estende para a margem cirúrgica ou invade as vesículas seminais.

[00071] "Alteração do padrão nativo de glicosilação" se destina, para as finalidades aqui, a significar deleção de uma ou mais porções carboidrato encontradas na seqüência nativa do PSCA (quer através de remoção do sítio de glicosilação subjacente ou através de deleção da glicosilação através de meios químicos e/ou enzimáticos) e/ou adição de um ou mais sítios de glicosilação que não estão presentes na seqüência nativa do PSCA. Além disso, a expressão inclui alterações qualitativas nas várias porções carboidrato presentes.

[00072] O termo "análogo" se refere a uma molécula a qual é estruturalmente similar ou compartilha atributos similares ou correspondentes com outra molécula (por exemplo, uma proteína de PSCA-relacionada). Por exemplo, um análogo de uma proteína de PSCA pode ser especificamente ligado através de um anticorpo ou

célula T que se liga especificamente à PSCA.

[00073] O termo "anticorpo" é usado no sentido mais amplo, a menos que claramente indicado de outro modo. Portanto, um "anticorpo" pode ocorrer naturalmente ou ser feito pelo homem, tal como anticorpos monoclonais produzidos por meio da tecnologia convencional de hibridoma. Antianticorpos de PSCA compreendem anticorpos monoclonais e policlonais, bem como fragmentos contendo o domínio de ligação de antígeno e/ou uma ou mais regiões de determinação de complementaridade desses anticorpos. Conforme usado aqui, o termo "anticorpo" se refere a qualquer forma de anticorpo ou fragmento do mesmo que se liga especificamente à PSCA e/ou exibe a atividade biológica desejada e abrange, especificamente, anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais de comprimento total), anticorpos policlonais, anticorpos multiespecíficos (por exemplo, anticorpos biespecíficos) e fragmentos de anticorpos, na medida em que eles se liguem especificamente à PSCA e/ou exibam a atividade biológica desejada. Qualquer anticorpo específico pode ser usado nos métodos e composições proporcionados aqui. Assim, em uma modalidade, o termo "anticorpo" abrange uma molécula compreendendo pelo menos uma região variável de uma molécula de imunoglobulina com cadeia leve e pelo menos uma região variável de uma molécula com cadeia pesada que, em combinação, formam um sítio de ligação específico para o antígeno alvo. Em uma modalidade, o anticorpo é um anticorpo de IgG. Por exemplo, o anticorpo é um anticorpo de IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Os anticorpos úteis nos presentes métodos e composições podem ser gerados em cultura de células em fagos ou em vários animais incluindo, mas não limitado a, vacas, coelhos, cabras, camundongos, ratos, hamsters, porcos-da-índia, ovelha, cães, gatos, macacos, chimpanzés, gorilas. Portanto, em uma modalidade, um

anticorpo da presente invenção é um anticorpo de mamífero. Técnicas de fago podem ser usadas para isolar um anticorpo inicial ou gerar variantes com características alteradas de especificidade ou avidéz. Tais métodos são rotina e bem-conhecidos na técnica. Em uma modalidade, o anticorpo é produzido através de meios recombinantes conhecidos na técnica. Por exemplo, um anticorpo recombinante pode ser produzido através de transfecção de uma célula hospedeira com um vetor compreendendo uma seqüência de DNA que codifica o anticorpo. Um ou mais vetores podem ser usados para transfectar a seqüência de DNA expressando pelo menos uma região VL e uma VH na célula hospedeira. Descrições exemplificativas de meios recombinantes de geração e produção de anticorpos incluem Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, edição mais recente). Um anticorpo da presente invenção pode ser modificado através de meios recombinantes para aumentar a eficácia do anticorpo na mediação da função desejada. Assim, está dentro do escopo da invenção que os anticorpos podem ser modificados através de substituições usando meios recombinantes. Tipicamente, as substituições serão substituições conservativas. Por exemplo, pelo menos um aminoácido na região constante do anticorpo pode ser substituído por um resíduo diferente. Veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.624.821, Patente U.S. Nº 6.194.551, Pedido Nº WO 9958572; e Angal *et al.*, Mol. Immunol. 30: 105-08 (1993). A modificação em aminoácidos inclui deleções, adições, substituições de aminoácidos. Em alguns casos, tais alterações são feitas para reduzir atividades indesejadas, por exemplo, citotoxicidade complemento-dependente. Frequentemente, os

anticorpos são ligados através de união, covalente ou não-covalentemente, de uma substância a qual proporciona um sinal detectável. Uma ampla variedade de rótulos e técnicas de conjugação são conhecidos e reportados extensivamente na literatura científica e de patente. Esses anticorpos podem ser selecionados para ligação à PSCA normal ou defectiva. Veja, por exemplo, ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996). Anticorpos adequados com as atividade biológicas desejadas podem ser identificados seguindo ensaios *in vitro* incluindo, mas não limitado a: proliferação, migração, adesão, crescimento em ágar macio, angiogênese, comunicação célula-célula, apoptose, transporte, transdução de sinal e seguindo ensaios *in vivo*, tais como inibição de crescimento do tumor. Os anticorpos proporcionados aqui podem também ser úteis em aplicações diagnósticas. Como anticorpos de captura ou não-neutralização, eles podem ser selecionados com relação à capacidade de se ligar ao antígeno específico sem inibição da atividade de receptor-ligação ou biológica do antígeno. Como anticorpos de neutralização, os anticorpos podem ser úteis em ensaios de ligação competitiva. Eles também podem ser usados para quantificar a PSCA ou seu receptor.

[00074] 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 antígeno-ligação. Em uma modalidade, ele abrange especificamente antianticorpos de PSCA simples e clones dos mesmos (incluindo anticorpos agonistas, antagonistas e de neutralização) e composições de antianticorpo de PSCA com especificidade poliepitópica. O anticorpo dos presentes métodos e composições pode ser monoclonal ou policlonal. Um anticorpo pode estar na forma de um fragmento de anticorpo de ligação a antígeno, incluindo um fragmento Fab, fragmento F(ab')₂,

uma região variável com cadeia simples e similares. Fragmentos de moléculas intactas podem ser gerados usando métodos bem-conhecidos na técnica e incluem digestão enzimática e meios recombinantes.

[00075] Conforme usado aqui, qualquer forma do "antígeno" pode ser usada para gerar um anticorpo que é específico para a PSCA. Assim, o antígeno de estimulação pode ser um epítopo simples, epítopos múltiplos ou a proteína inteira apenas ou em combinação com um ou mais agentes de intensificação de imunogenicidade conhecidos na técnica. O antígeno de estimulação pode ser uma proteína de comprimento total isolada, uma proteína da superfície celular (por exemplo, imunização com células transfectadas com pelo menos uma porção do antígeno) ou uma proteína solúvel (por exemplo, imunização com apenas a porção de domínio extracelular da proteína). O antígeno pode ser produzido em uma célula geneticamente modificada. O DNA que codifica o antígeno pode ser genômico ou não-genômico (por exemplo, cDNA) e codifica pelo menos uma porção do domínio extracelular. Conforme usado aqui, o termo "porção" se refere ao número mínimo de aminoácidos ou ácidos nucleicos, conforme apropriado, para constituir um epítopo imunogênico do antígeno de interesse. Quaisquer vetores genéticos adequados para transformação das células de interesse podem ser empregados incluindo, mas não limitado a, vetores adenovirais, plasmídeos e vetores não-virais, tais como lipídios catiônicos. Em uma modalidade, o anticorpo dos métodos e composições aqui se ligam especificamente a pelo menos uma porção do domínio extracelular do PSCA de interesse.

[00076] Os anticorpos ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos proporcionados aqui podem ser conjugados a um "agente bioativo". Conforme usado aqui, o termo "agente bioativo" se refere a

qualquer composto sintético ou que ocorre naturalmente que se liga ao antígeno e/ou intensifica ou media o efeito biológico desejado para intensificar toxinas que matam células.

[00077] Em uma modalidade, os fragmentos de ligação úteis na presente invenção são fragmentos biologicamente ativos. Conforme usado aqui, o termo "biologicamente ativo" se refere a um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é capaz de ligação ao epítopo antigênico desejado e exerce, direta ou indiretamente, um efeito biológico. Efeitos diretos incluem, mas não estão limitados a, modulação, estimulação e/ou inibição de um sinal de crescimento, modulação, estimulação e/ou inibição de um sinal anti-apoptótico, modulação, estimulação e/ou inibição de um sinal apoptótico ou necrótico, modulação, estimulação e/ou inibição da cascata de ADCC e modulação, estimulação e/ou inibição da cascata de CDC.

[00078] Anticorpos "biespecíficos" são também úteis nos presentes métodos e composições. Conforme usado aqui, o termo "anticorpo biespecífico" se refere a um anticorpo, tipicamente um anticorpo monoclonal, tendo especificidades de ligação por pelo menos dois epítomos antigênicos diferentes. Em uma modalidade, os epítomos são do mesmo antígeno. Em outra modalidade, os epítomos são de dois antígenos diferentes. Métodos para fabricação de anticorpos biespecíficos são conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos biespecíficos podem ser produzidos recombinantemente usando a co-expressão de dois pares de cadeia pesada/cadeia leve de imunoglobulina. Veja, por exemplo, Milstein *et al.*, Nature 305: 537-39 (1983). Alternativamente, anticorpos biespecíficos podem ser preparados usando ligação química. Veja, por exemplo, Brennan *et al.*, Science 229: 81 (1985). Anticorpos biespecíficos incluem fragmentos de anticorpo biespecíficos. Veja, por exemplo, Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6444-48 (1993), Gruber *et al.*, J. Immunol.

152: 5368 (1994).

[00079] Os anticorpos monoclonais aqui incluem especificamente anticorpos "quiméricos" nos quais uma porção da cadeia pesada e/ou leve é idêntica ou homóloga às seqüências correspondentes em anticorpos derivados de uma espécie em particular ou pertencendo a uma classe ou subclasse de anticorpo em particular, enquanto que o restante da(s) cadeia(s) é idêntico ou homólogo às seqüências correspondentes em anticorpos derivados de outra espécie ou pertencendo a outra classe ou subclasse de anticorpo, bem como fragmentos de tais anticorpos, na medida em que eles se ligam especificamente ao antígeno alvo e/ou exibem a atividade biológica desejada (Pat. U.S. Nº 4.816.567; e Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[00080] O termo "agente quimioterapêutico" se refere a todos os compostos químicos que são eficazes na inibição de crescimento de tumor. Exemplos não limitativos de agentes quimioterapêuticos incluem agentes de alquilação; por exemplo, compostos de etilenoimina de mostardas de nitrogênio e alquil sulfonatos; anti-metabólitos; por exemplo, ácido fólico, antagonistas de purina ou pirimidina; inibidores mitóticos; por exemplo, vinca alcalóides e derivados de podofilotoxina, antibióticos citotóxicos, compostos que danificam ou interferem com a expressão de DNA e antagonistas do receptor do fator de crescimento. Além disso, agentes quimioterapêuticos incluem agentes citotóxicos (conforme definido aqui), anticorpos, moléculas biológicas e pequenas moléculas.

[00081] O termo "seqüências códon-otimizadas" refere-se à seqüências de nucleotídeo que tenham sido otimizadas para uma espécie hospedeira em particular através de substituição de quaisquer códons tendo uma freqüência de uso de menos do que cerca de 20%. Seqüências de nucleotídeo que tenham sido otimizadas com relação à

expressão em uma determinada espécie hospedeira através de eliminação de seqüências de poliadenilação espúrias, eliminação de sinais de união de éxon/intron, de repetições semelhantes a transposons e/ou otimização do teor de GC, além de otimização de códon, são referidas aqui como uma "seqüência com expressão intensificada".

[00082] Uma "biblioteca combinatorial" é uma coleção de diversos compostos químicos gerados através de síntese química ou síntese biológica através de combinação de uma série de "blocos de construção" químicos, tais como reagentes. Por exemplo, uma biblioteca química combinatorial, tal como uma biblioteca de polipeptídeo (por exemplo, muteína), é formada através de combinação de um conjunto de blocos de construção químicos denominados aminoácidos em cada forma possível para um determinado comprimento de composto (isto é, o número de aminoácidos em um composto polipeptídico). Números compostos químicos são sintetizados através de tal mistura combinatorial de blocos de construção químicos (Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37(9): 1233-1251 (1994)).

[00083] O preparo e seleção de bibliotecas combinatoriais é bem-conhecido por aqueles versados na técnica. Tais bibliotecas químicas combinatoriais incluem, mas não estão limitadas a, bibliotecas de peptídeo (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.010.175, Furka, Pept. Prot. Res. 37: 487-493 (1991), Houghton *et al.*, Nature, 354: 84-88 (1991)), peptídeos (Publicação PCT Nº WO 91/19735) peptídeos codificados (Publicação PCT WO 93/20242), bio-oligômeros aleatórios (Publicação PCT WO 92/00091), benzodiazepinas (Pat. U.S. Nº 5.288.514), diversômeros, tais como hidantoínas, benzodiazepinas e dipeptídeos (Hobbs *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)), polipeptídeos vinilólogos (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)), sínteses orgânicas análogas de pequenas bibliotecas de compostos (Chen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), oligocarbarnatos (Cho *et al.*, Science 261: 1303 (1993)) e/ou peptidil fosfonatos (Campbell *et al.*, J. Org. Chem. 59: 658 (1994)). Veja, de modo geral, Gordon *et al.*, J. Med. Chem. 37: 1385 (1994), bibliotecas de ácido nucléico (veja, por exemplo, Stratagene, Corp.), bibliotecas de ácido nucléico peptídico (veja, por exemplo, Patente U.S. 5.539.083), bibliotecas de anticorpo (veja, por exemplo, Vaughn *et al.*, Nature Biotechnology 14(3): 309-314 (1996) e PCT/US96/10287), bibliotecas de carboidrato (veja, por exemplo, Liang *et al.*, Science 274: 1520-1522 (1996) e Patente U.S. Nº 5.593.853) e bibliotecas de pequenas moléculas orgânicas (veja, por exemplo, benzodiazepinas, Baum, C&EN, 18 de Janeiro, página 33 (1993); isoprenóides, Patente U.S. Nº 5.569.588; tiazolidinonas e metatiazanonas, Patente U.S. Nº 5.549.974; pirrolidinas, Patentes U.S. Nºs 5.525.735 e 5.519.134; compostos de morfolino, Patente U.S. Nº 5.506.337; benzodiazepinas, Patente U.S. Nº 5.288.514; e similares).

[00084] Dispositivos para o preparo de bibliotecas combinatoriais estão comercialmente disponíveis (veja, 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 de fase em solução. Esses sistemas incluem estações de trabalho automatizadas, tais como o aparelho de síntese automatizada desenvolvido pela Takeda Chemical Industries, LTDA. (Osaka, Japão) e muitos sistemas robóticos que utilizam braços robóticos (Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto,

Calif.), os quais imitam as operações sintéticas naturais realizadas por um químico. Qualquer um dos dispositivos acima é adequado para uso com a presente invenção. A natureza e implementação de modificações nesses dispositivos (se houver), de modo que eles possam operar conforme discutido aqui, será evidente para aqueles versados na técnica relevante. Além disso, numerosas bibliotecas combinatoriais estão, em si, comercialmente disponíveis (veja, 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.).

[00085] Conforme usado aqui, o termo "substituição conservativa" se refere a substituições de aminoácidos que são conhecidas por aqueles versados na técnica e podem ser feitas geralmente sem alterar a atividade biológica da molécula resultante. Aqueles versados na técnica sabem que, em geral, substituições de um único aminoácido em regiões não-essenciais de um polipeptídeo não alteram substancialmente a atividade biológica (veja, por exemplo, Watson *et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., página 224 (4ª Edição 1987)). Tais substituições exemplificativas são, de preferência, feitas de acordo com aquelas apresentadas na(s) Tabela(s) III(a-b). Por exemplo, tais alterações incluem substituição de qualquer um de isoleucina (I), valina (V) e leucina (L) por qualquer outro desses aminoácidos hidrofóbicos; ácido aspártico (D) por ácido glutâmico (E) e vice-versa; glutamina (Q) por asparagina (N) e vice-versa; e serina (S) por treonina (T) e vice-versa. Outras substituições também podem ser consideradas conservativas, dependendo do ambiente do aminoácido em particular e seu papel na estrutura tridimensional de uma proteína. Por exemplo, glicina (G) e alanina (A) podem freqüentemente ser permutáveis, assim como alanina (A) e valina (V). Metionina (M), a

qual é relativamente hidrofóbica, pode freqüentemente ser permutada com leucina e isoleucina e, algumas vezes, com valina. Lisina (K) e arginina (R) são freqüentemente permutáveis em locais nos quais a característica significativa do resíduo de aminoácido é sua carga e os diferentes pK's dos ambientes em particular (veja, por exemplo Tabela III(a) aqui; páginas 13-15 "Biochemistry" 2ª ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff *et al.*, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei *et al.*, J Biol Chem, 19 de Maio de 1995; 270(20): 11882-6). Outras substituições também são permissíveis e podem ser determinadas empiricamente ou de acordo com substituições conservativas conhecidas.

[00086] O termo "agente citotóxico" se refere a uma substância que inibe ou impede a atividade de expressão de células, função de células e/ou causa destruição de células. O termo se destina a incluir isótopos radioativos, agentes quimioterapêuticos e toxinas, tais como toxinas de pequenas moléculas ou toxinas enzimaticamente ativas de origem bacteriana, fúngicas, vegetal ou animal, incluindo fragmentos e/ou variantes da mesma. Exemplos de agentes citotóxicos incluem, mas não estão limitados a, auristatinas, auristatina e, auromicinas, maitansinóides, ítrio, bismuto, ricina, cadeia A de ricina, combrestatina, duocarmicinas, dolostatinas, doxorubicina, daunorubicina, taxol, cisplatina, brometo de etídio cc1065, etoposídeo de mitomicina, tenoposídeo, vincristina, vinblastina, colchicina, dihidróxi antracina diona, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inibidor de *Saponaia officinalis* e glicocorticóides e outros agentes quimioterapêuticos, bem como radioisótopos, tais como At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² ou ²¹³, P³² e isótopos radioativos de Lu, incluindo Lu¹⁷⁷. Anticorpos

também podem ser conjugados a uma enzima de ativação de pró-droga anti-câncer capaz de converter a pró-droga em sua forma ativa.

[00087] Conforme usado aqui, o termo "diacorpos" se refere a um pequeno fragmento de anticorpos com dois sítios de ligação-antígeno, fragmentos os quais compreendem um domínio variável de cadeia pesada (V_H) conectado a um domínio variável de cadeia leve (V_L) na mesma cadeia polipeptídica (V_H - V_L). Através de uso de um ligante que é muito curto para permitir emparelhamento entre os dois domínios sobre a mesma cadeia, os domínios são forçados a emparelhar com os domínios complementares de outra cadeia e criam dois sítios de antígeno-ligação. Diacorpos são descritos mais completamente, por exemplo, no EP 404.097; WO 93/11161; e Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-48 (1993).

[00088] O "produto genético" é usado aqui para indicar um peptídeo/ proteína ou mRNA. Por exemplo, um "produto genético da invenção" é, algumas vezes, referido aqui como uma "seqüência de aminoácidos de câncer", "proteína de câncer", "proteína de um câncer listado na Tabela I", um "mRNA de câncer", "mRNA de um câncer listado na Tabela I", etc. Em uma modalidade, a proteína de câncer é codificada por um ácido nucléico da Figura 1. A proteína de câncer pode ser um fragmento ou, alternativamente, ser a proteína de comprimento total codificada pelos ácidos nucléicos da Figura 1. Em uma modalidade, uma seqüência de aminoácidos de câncer é usada para determinar a identidade ou similaridade de seqüência. Em outra modalidade, as seqüências são variantes alélicas que ocorrem naturalmente de uma proteína codificada por um ácido nucléico da Figura 1. Em outra modalidade, as seqüências são variantes de seqüência conforme ainda descrito aqui.

[00089] Anticorpos "heteroconjugados" são úteis nos presentes métodos e composições. Conforme usado aqui, o termo "anticorpo

heteroconjugado" se refere a dois anticorpos covalentemente unidos. Tais anticorpos podem ser preparados usando métodos conhecidos em química de proteína sintética, incluindo uso de agentes de ligação reticulada. Veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.676.980.

[00090] Ensaios de "seleção de elevado rendimento", com relação à presença, ausência, quantificação ou outras propriedades de ácidos nucleicos ou produtos de proteína em particular são bem-conhecidos por tamanho. Similarmente, ensaios de ligação e ensaios com gene repórter são similarmente bem-conhecidos. Assim, por exemplo, a Patente U.S. Nº 5.559.410 divulga métodos de seleção de elevado rendimento para proteínas; a Patente U.S. Nº 5.585.639 divulga métodos de seleção de elevado rendimento para ligação de ácido nucleico (isto é, em arranjos); enquanto que as Patentes U.S. Nºs 5.576.220 e 5.541.061 divulgam métodos de seleção de elevado rendimento para ligação de ligante/anticorpo.

[00091] Além disso, sistemas de seleção de elevado rendimento estão comercialmente disponíveis (veja, 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 amostras e reagentes, distribuição de líquidos, incubações sincronizadas e leituras finais da microlâmina em detector(es) apropriados para o ensaio. Esses sistemas configuráveis proporcionam elevado rendimento e início rápido, bem como um alto grau de flexibilidade e padronização. Os fabricantes de tais sistemas fornecem protocolos detalhados para vários sistemas de elevado rendimento. Assim, por exemplo, a Zymark Corp. proporciona boletins técnicos que descrevem sistemas de seleção para a detecção da modulação de transcrição de gene, ligação a ligante e similares.

[00092] O termo "homólogo" se refere a uma molécula a qual exibe homologia com outra modalidade, por ter, por exemplo, seqüências de resíduos químicos que são as mesmas ou similares em posições correspondentes.

[00093] Em uma modalidade, o anticorpo proporcionado aqui é um "anticorpo humano". Conforme usado aqui, o termo "anticorpo humano" se refere a um anticorpo no qual essencialmente as seqüências inteiras das seqüências de cadeia leve e cadeia pesada, incluindo as regiões de determinação de complementaridade (CDRs), são de genes humanos. Em uma modalidade, anticorpos monoclonais humanos são preparados através da técnica de trioma, da técnica de célula B humana (veja, por exemplo, Kozbor *et al.*, Immunol. Dia 4: 72 (1983), da técnica de transformação com EBV (veja, por exemplo, Cole *et al* MONOCLONAL ANTIBODIES AND CÂNCER THERAPY 77-96 (1985)) ou usando exposição do Fago (veja, por exemplo, Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581 (1991)). Em uma modalidade específica, o anticorpo humano é gerado em um camundongo transgênico. Métodos para tornar tal anticorpo parcial totalmente humano são conhecidos na técnica e qualquer um de tais métodos pode ser usado. De acordo com uma modalidade particularmente preferida, seqüências de anticorpo totalmente humano são feitas em um camundongo transgênico manipulado para expressar genes de anticorpo das cadeias pesada e leve humanas. Uma descrição exemplificativa do preparo de camundongos transgênicos que produzem anticorpos humanos é encontrada no Pedido Nº WO 02/43478 e Patente dos Estados Unidos 6.657.103 (Abgenix) e sua prole. Células B de camundongos transgênicos que produzem o anticorpo desejado podem ser, então, fundidas para fazer linhagens de células de hibridoma para produção contínua do anticorpo. Veja, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; e

5.545.806; e Jakobovits, Adv. Drug Del. Rev. 31: 33-42 (1998); Green *et al.*, J. Exp. Med. 188: 483-95 (1998).

[00094] "Antígeno de leucócito humano" ou "HLA" é uma proteína do Principal Complexo de Histocompatibilidade (MHC) da classe I ou da classe II humana (veja, por exemplo, Stites *et al.*, IMMUNOLOGY, 8ª ED., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994).

[00095] Conforme usado aqui, o termo "anticorpo humanizado" se refere a formas de anticorpos que contêm seqüências de anticorpos não-humanos (por exemplo, murina), bem como anticorpos humanos. Tais anticorpos são anticorpos quiméricos os quais contêm seqüência mínima derivada de imunoglobulina não-humana. Em geral, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um e tipicamente dois domínios variáveis nos quais todos ou substancialmente todos os loops hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma seqüência de imunoglobulina humana. O anticorpo humanizado opcionalmente compreenderá também pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), tipicamente aquela de uma imunoglobulina humana. Veja, por exemplo, Cabilly Patente U.S. Nº 4.816.567; Queen *et al* (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86: 10029-10033; e ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996).

[00096] Os termos "hibridiza", "hibridização", "hibridizar" e similares, usados no contexto de polinucleotídeos, se destinam a se referir a condições convencionais de hibridização, de preferência tais como hibridização em formamida a 50%/6XSSC/0,1% de SDS/100 µg/ml de ssDNA, nas quais as temperaturas para hibridização estão acima de 37 graus C e as temperaturas para lavagem em 0,1XSSC/0,1% de SDS estão acima de 55 graus C.

[00097] As expressões "isolado" ou "biologicamente puro" se referem a um material o qual é substancial ou essencialmente isento de componentes os quais normalmente acompanham o material conforme ele é encontrado em seu estado nativo. Assim, peptídeos isolados de acordo com a invenção, de preferência, não contêm materiais normalmente associados aos peptídeos em seu ambiente *in situ*. Por exemplo, um polinucleotídeo é mencionado com sendo "isolado" quando ele é substancialmente separado dos polinucleotídeos contaminantes que correspondem ou são complementares a outros genes que não os genes de PSCA ou que codificam outros polipeptídeos que não o produto genético de PSCA ou fragmentos do mesmo. Aqueles versados na técnica podem empregar prontamente procedimentos de isolamento de ácido nucléico para obter um polinucleotídeo de PSCA isolado. Uma proteína é mencionada como sendo "isolada", por exemplo, quando métodos físicos, mecânicos ou químicos são empregados para remover proteínas de PSCA de constituintes celulares que normalmente estão associados com a proteína. Aqueles versados na técnica podem empregar prontamente métodos de purificação para obter uma proteína de PSCA isolada. Alternativamente, uma proteína isolada pode ser preparada através de meios químicos.

[00098] "Rótulos" adequados incluem enzimas de radionuclídeos, substratos, cofatores, inibidores, porções fluorescentes, porções quimioluminescentes, artigos magnéticos e similares. Patentes ensinando o uso de tais rótulos incluem as Patentes U.S. N^{os} 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; e 4.366.241. Além disso, os anticorpos fornecidos aqui podem ser úteis como o componente de antígeno-ligação de fluorocorpos. Veja, por exemplo, Zeytun *et al.*, Nat. Biotechnol. 21: 1473-79 (2003).

[00099] O termo "mamífero" se refere a qualquer organismo

classificado como um mamífero, incluindo camundongos, ratos, coelhos, cães, gatos, vacas, cavalos e seres humanos. Em uma modalidade da invenção, o mamífero é um camundongo. Em outra modalidade da invenção, o mamífero é um ser humano.

[000100] Os termos "câncer metastático de próstata" e "doença metastática" significam cânceres de próstata que se disseminaram para nódulos linfáticos regionais ou sítios distantes e devem ser entendidos como incluindo doença no estágio D sob o sistema AUA e no estágio TxNxM+ sob o sistema TNM. Conforme é o caso com câncer de próstata localmente avançado, cirurgia geralmente não é indicada para pacientes com doença metastática e terapia hormonal (ablação de androgênio) é uma modalidade de tratamento preferida. Pacientes com câncer de próstata metastático eventualmente desenvolvem um estado androgênio-resistente dentro dos 12 a 18 meses de início do tratamento. Aproximadamente metade desses pacientes androgênio-resistentes morrem dentro de 6 meses após desenvolvimento do estado. O local mais comum para metástase de câncer de próstata é o osso. Metástases ósseas de câncer de próstata são freqüentemente osteoblásticas ao invés de osteolíticas (isto é, resultam em formação de osso líquida). Metástases ósseas são encontradas mais freqüentemente na espinha, seguido pelo fêmur, pélvis, costelas, crânio e úmero. Outros locais comuns para metástase incluem nódulos linfáticos, pulmão, fígado e cérebro. O câncer de próstata metastático é, tipicamente, diagnosticado através de linfadenectomia pélvica aberta ou laparoscópica, explorações com radionuclídeo do sangue inteiro, radiografia esquelética e/ou biópsia de lesões ósseas.

[000101] O termo "modulador" ou "composto de teste" ou "candidato à droga" ou equivalentes gramaticais conforme usado aqui descreve qualquer molécula, por exemplo, proteína, oligopeptídeo, pequena

molécula orgânica, polissacarídeo, polinucleotídeo, etc., a ser testada com relação à capacidade de alterar, direta ou indiretamente, o fenótipo do câncer ou a expressão de uma seqüência de câncer, por exemplo, uma seqüência de ácido nucléico ou proteína, ou afetar as seqüências de câncer (por exemplo, sinalização, expressão do gene, interação de proteína, etc.). Em um aspecto, um modulador neutralizará o efeito de uma proteína de câncer da invenção. Por "neutralizar" entenda-se que uma atividade de uma proteína é inibida ou bloqueada, junto com o conseqüente efeito sobre a célula. Em outro aspecto, um modulador neutralizará o efeito do agente e sua proteína correspondente da invenção através de normalização dos níveis da referida proteína. Em modalidades preferidas, moduladores alteram os perfis de expressão ou ácidos nucléicos ou proteínas de perfis de expressão fornecidos aqui ou vias efetuatoras a jusante. Em uma modalidade, o modulador suprime um fenótipo de câncer, por exemplo, em um perfil de um tecido normal. Em outra modalidade, um modulador induz a um fenótipo de câncer. Geralmente, uma pluralidade de misturas de ensaio é passada em paralelo com diferentes concentrações de agente para obter uma resposta diferencial a várias concentrações. Tipicamente, uma dessas concentrações serve como um controle negativo, isto é, na concentração zero ou abaixo do nível de detecção.

[000102] Moduladores, candidatos à droga ou compostos de teste abrangem numerosas classes químicas, embora eles sejam, tipicamente, moléculas orgânicas, de preferência pequenos compostos orgânicos tendo um peso molecular de mais de 100 e menos do que cerca de 2.500 Daltons. Pequenas moléculas preferidas têm menos de 2000 ou menos de 1500 ou menos de 1000 ou menos de 500 D. Agentes candidatos compreendem grupos funcionais necessários para interação estrutural com proteínas, particularmente ligação de

hidrogênio e incluem, tipicamente, pelo menos um grupo amina, carbonila, hidroxila ou carboxila, de preferência pelo menos dois dos grupos químicos funcionais. Os agentes candidatos freqüentemente compreendem estruturas heterocíclicas ou de carbono cíclico e/ou estruturas aromáticas ou poliaromáticas substituídas por um ou mais dos grupos funcionais acima. Moduladores também compreendem biomoléculas tais como peptídeos, sacarídeos, ácidos graxos, esteróides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estruturais ou combinações dos mesmos. Particularmente preferidos são peptídeos. Uma classe de moduladores são peptídeos, por exemplo, de cerca de cinco a cerca de 35 aminoácidos, com de cerca de cinco a cerca de 20 aminoácidos sendo preferidos e de cerca de 7 a cerca de 15 sendo particularmente preferido. De preferência, a proteína modulatória de câncer é solúvel, inclui uma região não-transmembrana e/ou tem uma Cis N-terminal para auxiliar na solubilidade. Em uma modalidade, 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. Em uma modalidade, uma proteína de câncer da invenção é conjugada a um agente imunogênico conforme discutido aqui. Em uma modalidade, a proteína de câncer é conjugada à BSA. Os peptídeos da invenção, por exemplo, de comprimentos preferidos, podem ser ligados uns aos outros ou a outros aminoácidos para criar um peptídeo/proteína mais longa. Os peptídeos modulatórios podem ser digestões de proteínas que ocorrem naturalmente, conforme é esboçado acima, peptídeos aleatórios ou peptídeos aleatórios "com tendências". Em uma modalidade preferida, moduladores baseados em peptídeo/proteína são anticorpos e fragmentos dos mesmos, conforme definido aqui.

[000103] Moduladores de câncer 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 "com tendências". Por exemplo, digestões de genomas eucariotas ou procariotas podem ser usadas em uma abordagem análoga àquela esboçada acima para proteínas.

[000104] O termo "anticorpo monoclonal", conforme usado aqui, se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogênea, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto quanto a possíveis mutações que ocorrem naturalmente que podem estar presentes em quantidades mínimas. Anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo dirigidos contra um único epítipo de anticorpo. Em contraste, preparados de anticorpo convencionais (policlonais) incluem, tipicamente, uma multiplicidade de anticorpos dirigidos contra (ou específicos para) diferentes epítipos. Em uma modalidade, o anticorpo policlonal contém uma pluralidade de anticorpos monoclonais com diferentes especificidades, afinidades ou avides por epítipos dentro de um único antígeno que contém múltiplos epítipo antigênicos. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população de anticorpo substancialmente homogênea e não deve ser construído como requerendo a produção do anticorpo através de qualquer método em particular. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos através do método de hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975) ou podem ser feitos através de métodos de DNA recombinante (veja, por exemplo, Pat. U.S. Nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de anticorpo em fago usando as técnicas descritas em Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) e Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991), por exemplo. Esses anticorpos monoclonais usualmente se ligarão com uma Kd de pelo menos cerca de 1 μ M, mais usualmente pelo menos cerca de 300 nM, tipicamente

pelo menos cerca de 30 nM, de preferência pelo menos cerca de 10 nM, mais preferivelmente pelo menos cerca de 3 nM ou melhor, usualmente determinado através de ELISA.

[000105] Um "motivo", como em um motivo biológico de uma proteína de PSCA-relacionada, se refere a qualquer padrão de aminoácidos que forma parte da seqüência primária de uma proteína, que está associado a uma função em particular (por exemplo, interação proteína-proteína, interação proteína-DNA, etc.) ou modificação (por exemplo, que é fosforilada, glicosilada ou amidada) ou localização (por exemplo, seqüência secretórias, seqüência de localização nuclear, etc.) ou uma seqüência que está correlacionada por ser imunogênica, quer humoral ou celularmente. Um motivo pode ser contínuo ou capaz de ser alinhado com determinadas posições que geralmente estão correlacionadas a determinada função ou propriedade. No contexto de motivos do HLA, "motivo" se refere ao padrão de resíduos em um peptídeo de comprimento definido, usualmente um peptídeo de cerca de 8 a cerca de 13 aminoácidos para um motivo do HLA da classe I e de cerca de 6 a cerca de 25 aminoácidos para um motivo do HLA da classe II, o qual é reconhecido por uma molécula de HLA em particular. Motivos peptídicos para ligação ao HLA são, tipicamente, diferentes para cada proteína codificada por cada alelo de HLA humano e diferem quanto ao padrão dos resíduos âncora primários e secundários. Motivos que ocorrem freqüentemente são apresentados na Tabela V.

[000106] Um "excipiente farmacêutico" compreende um material, tal como um adjuvante, um veículo, agentes para ajuste de pH e tamponamento, agentes de umedecimento, conservantes e similares.

[000107] "Farmaceuticamente aceitável" se refere a uma composição não-tóxica, inerte e/ou que é fisiologicamente compatível com seres humanos e outros mamíferos.

[000108] O termo "polinucleotídeo" significa uma forma polimérica de nucleotídeo de pelo menos 10 bases ou pares de base de comprimento, quer ribonucleotídeos ou deoxinucleotídeos ou uma forma modificada do tipo de nucleotídeo e deve ser entendido como incluindo formas fita simples e dupla de DNA e/ou RNA. Na técnica, esse termo é freqüentemente usado permutavelmente com "oligonucleotídeo". Um polinucleotídeo pode compreender uma seqüência de nucleotídeos descrita aqui em que a timidina (T), conforme mostrado, por exemplo, na Figura 1, também pode ser uracila (U); essa definição se refere às diferenças entre as estruturas químicas do DNA e RNA, observando-se, em particular, que uma das quatro bases principais em RNA é uracila (U) ao invés de timidina (T).

[000109] O termo "polipeptídeo" significa um polímero de pelo menos cerca de 4, 5, 6, 7 ou 8 aminoácidos. No decorrer da especificação, designações padrões com três letras ou com uma única letra para aminoácidos são usadas. Na técnica, esse termo é freqüentemente usado permutavelmente com "peptídeo" ou "proteína".

[000110] Um "resíduo âncora primário" do HLA é um aminoácido em uma posição específica ao longo de uma seqüência peptídica a qual é compreendido como proporcionando um ponto de contato entre o peptídeo imunogênico e uma molécula do HLA. Um a três, usualmente dois resíduos âncora primários dentro de um peptídeo de comprimento definido geralmente define um "motivo" para um peptídeo imunogênico. Esses resíduos devem ser compreendidos como se adaptando em contato íntimo com a ranhura de ligação peptídica de uma molécula do HLA, com suas cadeias laterais encaixadas em bolsas específicas da ranhura de ligação. Em uma modalidade, por exemplo, os resíduos âncora primários para uma molécula da classe I do HLA estão localizados na posição 2 (a partir da posição amino terminal) e na posição carbóxi-terminal de um epítopo peptídico com 8,

9, 10, 11 ou 12 resíduos de acordo com a invenção. Alternativamente, em outra modalidade, os resíduos âncora primários do peptídeo que se ligam a uma molécula da classe II do HLA são espaçados uns com relação aos outros, ao invés de aos terminos de um peptídeo, onde o peptídeo geralmente tem pelo menos 9 aminoácidos de comprimento. As posições âncoras primárias para cada motivo e supermotivo são apresentadas na Tabela IV(a). Por exemplo, peptídeos análogos podem ser criados alterando a presença ou ausência de resíduos em particular nas posições âncora primárias e/ou secundárias mostradas na Tabela IV. Tais análogos são usados para modular a afinidade de ligação e/ou abrangência de população de um peptídeo compreendendo um motivo ou supermotivo do HLA em particular.

[000111] "Radioisótopos" incluem, mas não estão limitados, aos seguintes (usos exemplificativos não limitativos são também apresentados na Tabela IV(I)).

[000112] Por "aleatoriamente distribuídos" ou equivalentes gramaticais conforme aqui aplicado a ácidos nucleicos e proteínas entenda-se que cada ácido nucleico e peptídeo consiste essencialmente de nucleotídeos e aminoácidos aleatórios, respectivamente. Esses peptídeos aleatórios (ou ácidos nucleicos, discutidos aqui) podem incorporar qualquer nucleotídeo ou aminoácido em qualquer posição. O processo sintético pode ser projetado para gerar proteínas ou ácidos nucleicos aleatoriamente distribuídos, para permitir a formação de todas ou a maioria das combinações sobre a extensão da sequência, assim, formando uma biblioteca de agentes proteínicos bioativos candidatos aleatoriamente distribuídos.

[000113] Em uma modalidade, uma biblioteca é "totalmente distribuída aleatoriamente", sem nenhuma preferência de sequência ou constantes em qualquer posição. Em outra modalidade, a biblioteca é uma biblioteca "com tendência aleatória". Isto é, algumas posições

dentro da sequência são mantidas constantes ou são selecionadas a partir de um número limitado de possibilidades. Por exemplo, os nucleotídeos ou resíduos de aminoácido são aleatoriamente distribuídos dentro de uma classe definida, por exemplo, de aminoácidos hidrofóbicos, resíduos hidrofílicos, resíduos com tendência estérica (quer pequenos ou grandes), com relação à criação de domínios de ligação de ácido nucléico, criação de cisteínas, para ligação reticulada, prolinas para domínios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas ou histidinas para sítios de fosforilação, etc. ou purinas, etc.

[000114] Uma molécula de DNA ou RNA "recombinante" é uma molécula de DNA ou RNA que tenha sido submetida à manipulação molecular *in vitro*.

[000115] Conforme usado aqui, o termo "Fv de cadeia simples" ou "scFv" ou anticorpo com "cadeia simples" se refere a fragmentos de anticorpo compreendendo os domínios V_H e V_L de anticorpo, em que esses domínios estão presentes em uma cadeia polipeptídica simples. Geralmente, o polipeptídeo Fv ainda compreende um ligante polipeptídico entre os domínios V_H e V_L o qual permite que o sFv forme a estrutura desejada para ligação ao antígeno. Para uma revisão de sFv veja Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenberg e Moore eds. Springer-Verlag, New York, páginas 269-315 (1994).

[000116] Exemplos não limitativos de "pequenas moléculas" incluem compostos que se ligam ou interagem com a PSCA, ligantes, incluindo hormônios, neuropeptídeos, quimiocinas, odorantes, fosfolipídios e equivalentes funcionais dos mesmos que se ligam e, de preferência, inibem a função da proteína de PSCA. Tais pequenas moléculas 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

determinadas modalidades, pequenas moléculas se associam fisicamente ou se ligam à proteína de PSCA; não são encontradas em vias metabólicas que ocorrem naturalmente; e/ou são mais solúveis em soluções aquosas do que não aquosas.

[000117] Conforme usado aqui, o termo "específico" se refere à ligação seletiva do anticorpo ao epítipo de antígeno alvo. Anticorpos podem ser testados com relação à especificidade de ligação através de comparação da ligação ao antígeno apropriado com a ligação a um antígeno irrelevante ou mistura de antígenos sob um determinado conjunto de condições. Se o anticorpo se liga ao antígeno apropriado pelo menos 2, 5, 7 e, de preferência, 10 vezes mais do que ao antígeno irrelevante ou mistura de antígenos, então, ele é considerado como sendo específico. Em uma modalidade, um anticorpo específico é um que se liga somente ao antígeno PSCA, mas não se liga ao antígeno irrelevante. Em outra modalidade, um anticorpo específico é um que se liga ao antígeno PSCA humana, mas não se liga a um antígeno de não-PSCA humana com 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ou mais de homologia de aminoácidos ao antígeno PSCA. Em outra modalidade, um anticorpo específico é um que se liga ao antígeno PSCA humana e se liga ao antígeno PSCA de murina, mas com um maior grau de ligação ao antígeno humano. Em outra modalidade, um anticorpo específico é um que se liga ao antígeno PSCA humana e se liga ao antígeno PSCA de primata, mas com um maior grau de ligação ao antígeno humano. Em outra modalidade, o anticorpo específico se liga ao antígeno PSCA humana e a qualquer antígeno PSCA não-humana, mas com um maior grau de ligação ao antígeno humano ou qualquer combinação do mesmo.

[000118] "Estringência" de reações de hibridização é prontamente determinável por temperatura e é geralmente um cálculo empírico

dependente do comprimento da sonda, temperatura de lavagem e concentração de sal. Em geral, sondas mais longas requerem maiores temperaturas para anelamento apropriado, enquanto que sondas mais curtas precisam de temperaturas menores. A hibridização geralmente depende da capacidade das seqüências de ácido nucléico desnaturadas de reanelar quando fitas complementares estão presentes em um ambiente abaixo de sua temperatura de fusão. Quanto maior o grau de homologia desejado entre a sonda e a seqüência hibridizável, maior a temperatura relativa que pode ser usada. Como um resultado, segue que maiores temperaturas relativas tenderão a tornar as condições de reação mais estridentes, enquanto que menores temperaturas menos. Para detalhes adicionais e explicação da estridência de reações de hibridização veja Ausubel *et al.*, Current Protocols em Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[000119] "Condições estridentes" ou "condições de elevada estridência", conforme definido aqui, são identificadas por, mas não estão limitadas, àquelas que: (1) empregam 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) empregam, durante hibridização, um agente de desnaturação, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (v/v) com 0,1% de albumina de soro bovino/0,1% de Ficoll/0,1% de polivinilpirrolidona/tampão de fosfato de sódio a 50 mM em um pH de 6,5, com cloreto de sódio a 750 mM, citrato de sódio a 75 mM a 42°C; ou (3) empregam 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), 0,1% de pirofosfato de sódio, 5 x solução de Denhardt, DNA de esperma de salmão submetido a ultra-som (50 µg/ml), 0,1% de SDS e 10% de sulfato de dextrana 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 de alta estrigência consistindo de 0,1 x SSC contendo EDTA a 55°C. "Condições moderadamente estridentes" são descritas por, mas não limitado, àquelas em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 e incluem o uso de solução de lavagem e condições de hibridização (por exemplo, temperatura, resistência iônica e % de SDS) menos estridentes do que aquelas descritas acima. Um exemplo de condição moderadamente estrigente é incubação durante a noite a 65°C em uma solução compreendendo: 1% de albumina de soro bovino, fosfato de sódio a 0,5M, pH de 7,5, EDTA a 1,25 mM e 7% de SDS 5 x SSC (NaCl a 150 mM, citrato trissódico a 15 mM), seguido por lavagem dos filtros em 2 x SSC/1% de SDS a 50°C e 0,2 X SSC/0,1% de SDS a 50°C. aqueles versados na técnica saberão como ajustar a temperatura, resistência iônica, etc. conforme necessário para acomodar fatores tais como extensão da sonda e similares.

[000120] Um "supermotivo" do HLA é uma especificidade de ligação peptídica compartilhada por uma molécula do HLA codificada por dois ou mais alelos de HLA. Frequências fenotípicas globais de supertipos de HLA em diferentes populações étnicas são apresentadas na Tabela IV (f). Os constituintes não-limitativos de vários supertipos são como segue:

A2: A*0201, A*0202, A*0203, A*0204, A* 0205, A*0206, A*6802, A*6901, A*0207

A3: A3, A11, A31, A*3301, A*6801, A*0301, A*1101, A*3101

B7: B7, B*3501-03, B*51, B*5301, B*5401, B*5501, B*5502, B*5601, B*6701, B*7801, B*0702, B*5101, B*5602

B44: B*3701, B*4402, B*4403, B*60 (B*4001), B61 (B*4006)

A1: A*0102, A*2604, A*3601, A*4301, A*8001

A24: A*24, A*30, A*2403, A*2404, A*3002, A*3003

B27: B*1401-02, B*1503, B*1509, B*1510, B*1518, B*3801-02, B*3901, B*3902, B*3903-04, B*4801-02, B*7301, B*2701-08

B58: B*1516, B*1517, B*5701, B*5702, B58

B62: B*4601, B52, B*1501 (B62), B*1502 (B75), B*1513 (B77)

[000121] A abrangência de população calculada fornecida por diferentes combinações de supertipo de HLA é apresentada na Tabela IV(g).

[000122] Conforme usado aqui, "tratar" ou "terapêutico" e termos gramaticalmente relacionados se referem a qualquer aperfeiçoamento de qualquer consequência de uma doença, tal como sobrevivência prolongada, menos morbidez e/ou diminuição dos efeitos colaterais os quais são de subprodutos de uma modalidade terapêutica alternativa; conforme é prontamente apreciado na técnica, erradicação total da doença é uma característica preferida, embora não um requisito para um tratamento.

[000123] Um "animal transgênico" (por exemplo, um camundongo ou rato) é um animal tendo células que contêm um transgene, transgene o qual foi introduzido no animal ou um ancestral do animal em um estágio pré-natal, por exemplo, embriônico. Um "transgene" é um DNA que é integrado no genoma de uma célula a partir da qual o animal transgênico se desenvolve.

[000124] Conforme usado aqui, uma "vacina" de resposta imune de HLA ou celular é uma composição que contém ou codifica um ou mais peptídeos da invenção. Existem numerosas modalidades de tais vacinas, tal como um coquetel de um ou mais peptídeos individuais; um ou mais peptídeos da invenção compreendidos por um peptídeo poliepitópico; ou ácidos nucleicos que codificam tais peptídeos ou polipeptídeos individuais, por exemplo, um minigene que codifica um peptídeo poliepitópico. O "um ou mais peptídeos" pode incluir qualquer número inteiro unitário 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, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 ou 150 ou mais peptídeos da invenção. Os peptídeos ou polipeptídeos podem, opcionalmente, ser modificados, tal como através de lipidação, adição de seqüências de objetivação ou outras. Peptídeos da classe I do HLA da invenção podem ser misturados com ou ligados a peptídeos da classe II do HLA, para facilitar ativação de linfócitos T citotóxicos e linfócitos T auxiliares. Vacinas de HLA também podem compreender células que apresentam antígeno peptídeo-pulsadas, por exemplo, células dendríticas.

[000125] O termo "variante" se refere a uma molécula que exibe uma variação de um tipo ou norma descrito, tal como uma proteína que tem um ou mais resíduos de aminoácido diferentes na(s) posição(ões) correspondentes de uma proteína especificamente descrita (por exemplo, uma proteína de PSCA mostrada na Figura 1). Um análogo é um exemplo de uma proteína variante. Isoformas com união e polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) são outros exemplos de variantes.

[000126] As "proteínas de PSCA-relacionadas" da invenção incluem aquelas especificamente identificadas aqui, 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 aqui 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 polipeptídeo heterólogo também são incluídos. Tais proteínas de PSCA são coletivamente referidas como proteínas de PSCA-relacionadas, uma proteína da invenção ou PSCA. O termo "proteína

de PSCA-relacionada" se refere a um fragmento polipeptídico ou uma seqüência 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, 330, 335, 339 ou mais aminoácidos.

I.) Polinucleotídeos de PSCA

[000127] Um aspecto, a invenção proporciona polinucleotídeos correspondentes ou complementares a todo ou parte de um gene, mRNA e/ou seqüência de codificação de PSCA, de preferência na forma isolada, incluindo polinucleotídeos que codificam uma proteína de PSCA-relacionada e fragmentos dos mesmos, DNA, RNA, híbrido de DNA/RNA e moléculas relacionadas, polinucleotídeos ou oligonucleotídeos complementares a um gene ou seqüência de mRNA de PSCA ou uma parte da mesma e polinucleotídeos ou oligonucleotídeos que se hibridizam a um gene de PSCA, mRNA ou a um polinucleotídeo que codifica PSCA (coletivamente, "polinucleotídeos de PSCA"). Em todos os casos, quando referida na presente seção, T também pode ser U na Figura 1.

[000128] Modalidades de um polinucleotídeo de PSCA incluem: um polinucleotídeo de PSCA tendo a seqüência mostrada na Figura 1, uma seqüência de nucleotídeo de PSCA conforme mostrado na Figura 1 em que T é U; pelo menos 10 nucleotídeos contínuos de um polinucleotídeo tendo a seqüência conforme mostrado na Figura 1; ou pelo menos 10 nucleotídeos contínuos de um polinucleotídeo tendo a seqüência conforme mostrado na Figura 1 onde T é U.

[000129] Polinucleotídeos que codificam porções relativamente longas de uma proteína de PSCA também estão dentro do escopo da invenção. Por exemplo, polinucleotídeos que codificam de cerca do

aminoácido 1 (ou 20 ou 30 ou 40, etc.) a cerca do aminoácido 20 (ou 30 ou 40 ou 50, etc.) de uma proteína de PSCA ou "variante" mostrada na Figura 1 ou Figura 3 podem ser gerados através de uma variedade de métodos bem-conhecidos na técnica. Esses fragmentos de polinucleotídeo podem incluir qualquer parte da sequência de PSCA, conforme mostrado na Figura 1.

I.A.) Usos de Polinucleotídeos de PSCA

I.A.1. Monitoramento de Anormalidades Genéticas

[000130] Os polinucleotídeos dos parágrafos precedentes têm uma série de diferentes usos específicos. O gene de PSCA humana se mapeia ao local cromossômico apresentando no Exemplo intitulado "Mapeamento Cromossômico de PSCA". Por exemplo, em virtude do fato de o gene de PSCA se mapear a esse cromossoma, polinucleotídeos que codificam diferentes regiões de uma proteína de PSCA são usados para caracterizar citoanormalidades genéticas desse local cromossômico, tais como anormalidades que são identificadas como estando associadas a vários cânceres. Em determinados genes, uma variedade de anormalidades cromossômicas, incluindo reestruturações, foram identificadas como citoanormalidades genéticas freqüentes em uma série de diferentes cânceres (veja, 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, polinucleotídeos que codificam regiões específicas de uma proteína de PSCA proporcionam novas ferramentas que podem ser usadas para delinear, com maior precisão do que anteriormente possível, citoanormalidades genéticas na região cromossômica que codifica a PSCA que podem contribuir para o fenótipo maligno. Nesse contexto, esses polinucleotídeos satisfazem uma necessidade na técnica por expansão da sensibilidade de seleção cromossômica de forma a identificar anormalidades

cromossômicas mais sutis e menos comuns (veja, por exemplo Evans *et al.*, Am. J. Obstet. Gynecol 171(4): 1055-1057 (1994)).

[000131] Além disso, uma vez que foi mostrado que a PSCA é altamente expressa em câncer de próstata e outros, polinucleotídeos de PSCA são usados em métodos para avaliar o estado dos produtos genéticos de PSCA em tecidos normais versus cancerígenos. Tipicamente, polinucleotídeos que codificam regiões específicas de uma proteína de PSCA são usados para avaliar a presença de perturbações (tais como deleções, inserções, mutações por pontos ou alterações que resultam em uma perda de um antígeno, 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 conformacional de fita simples (SSPC) (veja, por exemplo, Marrogi *et al.*, J. Cutan. Pathol. 26(8): 369-378 (1999), ambos os quais utilizam polinucleotídeos que codificam regiões específicas de uma proteína para examinar essas regiões dentro de uma proteína.

I.A.2. Modalidades Antisentido

[000132] Outras modalidades ácido nucléico-relacionadas consideradas especificamente pela invenção descrita aqui são DNA genômico, cDNAs, ribozimas e moléculas antisentido, bem como moléculas de ácido nucléico baseadas em uma parte principal alternativa ou incluindo bases alternativas, quer derivadas ou sintetizadas de fontes naturais e incluem moléculas capazes de inibição do RNA ou expressão da proteína de PSCA. Por exemplo, moléculas antisentido podem ser RNAs ou outras moléculas, incluindo ácidos nucléicos peptídicos (PNAs) ou moléculas de não-ácido nucléico, tais como derivados de fosforotioato que se ligam especificamente ao DNA ou RNA de uma maneira par de base-dependente. Aqueles versados na técnica podem obter prontamente

essas classes de moléculas de ácido nucléico usando os polinucleotídeos e seqüências de polipeptídeo de PSCA descritos aqui.

[000133] A tecnologia antisentido requer a administração de oligonucleotídeos exógenos que se ligam a um polinucleotídeo alvo localizado dentro das células. O termo "antisentido" se refere ao fato de que tais oligonucleotídeos são complementares a seus alvos intracelulares, por exemplo, PSCA. Veja, por exemplo, Jack Cohen, *Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, 1989; e *Synthesis* 1: 1-5 (1988). Os oligonucleotídeos antisentido de PSCA da presente invenção incluem derivados tais como S-oligonucleotídeo (derivados de fosforotioato ou S-oligos, veja Jack Cohen *supra*), os quais exibem ação inibitória de crescimento de células cancerígenas intensificada. S-oligos (fosforotioatos de nucleosídeo) são análogos isoeletrônicos de um oligonucleotídeo (O-oligo) nos quais um átomo de oxigênio de não-ligação em ponte do grupo fosfato é substituído por um átomo de enxofre. Os S-oligos da presente invenção podem ser preparados através de tratamento dos O-oligos correspondentes com 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido, o qual é um reagente de transferência de enxofre. Veja, por exemplo, Iyer, R. P. *et al.*, *J. Org. Chem.* 55: 4693-4698 (1990); e Iyer, R. P. *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1253-1254 (1990). Oligonucleotídeos antisentido de PSCA adicionais da presente invenção incluem oligonucleotídeos antisentido de morfolino conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Partridge *et al.*, 1996, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 6: 169-175).

[000134] Os oligonucleotídeos antisentido de PSCA da presente invenção podem, tipicamente, ser RNA ou DNA que é complementar a e se hibridiza estavelmente com os primeiros 100 códons 5' ou os últimos 100 códons 3' de uma seqüência genômica de PSCA ou o

mRNA correspondente. Complementaridade absoluta não é requerida, embora altos graus de complementaridade sejam preferidos. O uso de um oligonucleotídeo complementar a essa região permite a hibridização seletiva ao mRNA de PSCA e não ao mRNA específico de outras subunidades regulatórias da quinase de proteína. Em uma modalidade, os oligonucleotídeos antisentido de PSCA da presente invenção são fragmentos de 15 a 30-mer da molécula de DNA antisentido que tem uma sequência que se hibridiza ao mRNA de PSCA. Opcionalmente, o oligonucleotídeo antisentido de PSCA é um oligonucleotídeo de 30-mer que é complementar à região nos primeiros 10 códons 5' ou nos últimos 10 códons 3' do PSCA. Alternativamente, as moléculas antisentido são modificadas para empregar ribozimas na inibição de expressão de PSCA; veja, por exemplo, L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; Trends Genet 12: 510-515 (1996).

I.A.3. Iniciadores e Pares de Iniciador

[000135] Outras modalidades específicas desses nucleotídeos da invenção incluem iniciadores e pares de iniciador os quais permitem a amplificação específica de polinucleotídeos da invenção ou de quaisquer partes específicas dos mesmos e sondas que se hibridizam seletiva ou especificamente a moléculas de ácido nucléico da invenção ou a qualquer parte das mesmas. Sondas podem ser ligadas com um marcador detectável, tal como, por exemplo, um radioisótopo, composto fluorescente, composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, quelador de metal ou enzima. Tais sondas e iniciadores são usados para detectar a presença de um polinucleotídeo de PSCA em uma amostra e como um meio para detecção de uma célula que expressa uma proteína de PSCA.

[000136] Exemplos de tais sondas incluem polipeptídeos compreendendo toda ou parte da sequência de cDNA de PSCA

humana mostrada na Figura 1. Exemplos de pares de iniciador capazes de amplificar especificamente mRNAs de PSCA são também descritos nos Exemplos. Conforme será compreendido por aqueles versados na técnica, muitos iniciadores e sondas diferentes podem ser preparados baseado nas seqüências fornecidas aqui e usados eficazmente para amplificar e/ou detectar um mRNA de PSCA.

[000137] Os polinucleotídeos de PSCA da invenção são úteis para uma variedade de finalidades incluindo, mas não limitado a, seu uso como sondas e iniciadores para a amplificação e/ou detecção do(s) gene(s) de PSCA, mRNA(s) ou fragmentos dos mesmos; como reagentes para o diagnóstico e/ou prognóstico de câncer de próstata e outros cânceres; como seqüências de codificação capazes de direcionar a expressão de polipeptídeos de PSCA; como ferramentas para modulação ou inibição da expressão do(s) gene(s) de PSCA e/ou tradução do(s) transcrito(s) de PSCA; e como agentes terapêuticos.

[000138] A presente invenção inclui o uso de qualquer sonda conforme descrito aqui para identificar e isolar uma seqüência de ácido nucléico de PSCA ou PSCA-relacionada a partir de uma fonte que ocorre naturalmente, tal como seres humanos ou outros mamíferos, bem como a seqüência de ácido nucléico isolada per se, a qual compreenderá todas ou a maioria das seqüências encontradas nas sondas usadas.

I.A.4. Isolamento de Moléculas de Ácido nucléico que Codificam PSCA

[000139] As seqüências de cDNA de PSCA descritas aqui permitem o isolamento de outros polinucleotídeos que codificam o(s) produto(s) genético(s) de PSCA, bem como o isolamento de polinucleotídeos que codificam homólogos de produtos genéticos de PSCA, alternativamente isoformas com união, variantes alélicas e formas mutantes de um produto genético de PSCA, bem como polinucleotídeos que codificam análogos de proteínas de PSCA-

relacionadas. Vários métodos de clonagem de moléculas que podem ser empregados para isolar cDNAs de comprimento total que codificam um gene de PSCA são bem-conhecidos (veja, por exemplo, Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª 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 no fago lambda podem ser convenientemente empregadas, usando sistemas de clonagem comercialmente disponíveis (por exemplo, Lambda ZAP Express, Stratagene). Clones de fago contendo cDNAs do gene de PSCA podem ser identificados através de hibridização com um cDNA de PSCA ligado ou um fragmento do mesmo. Por exemplo, em uma modalidade, um cDNA de PSCA (por exemplo, Figura 1) ou uma porção do mesmo pode ser sintetizada e usada como uma sonda para recuperar cDNAs de comprimento total e de sobreposição correspondendo a um gene de PSCA. Um gene de PSCA em si pode ser isolado através de seleção de bibliotecas de DNA genômico, bibliotecas de cromossoma artificial bacteriano (BACs), bibliotecas de cromossoma artificial de levedo (YACs) e similares, com sondas ou iniciadores de DNA de PSCA.

I.A.5. Moléculas de Ácido nucléico Recombinantes e Sistemas de Hospedeiro-Vetor

[000140] A invenção também proporciona moléculas de DNA ou RNA recombinantes contendo um polinucleotídeo de PSCA, um fragmento, análogo ou homólogo do mesmo incluindo, mas não limitado a, fagos, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, YACs, BACs, bem como vários vetores virais e não virais bem-conhecidos na técnica e células transformadas ou transfectadas com tais moléculas de DNA ou RNA recombinantes. Métodos para a geração de tais moléculas são bem-conhecidos (veja, por exemplo, Sambrook *et al.*,

1989, *supra*).

[000141] A invenção ainda proporciona um sistema de hospedeiro-vetor compreendendo uma molécula de DNA recombinante contendo um polinucleotídeo de PSCA, fragmento, análogo ou homólogo do mesmo dentro de uma célula hospedeira eucariota ou procariota adequada. Exemplos de células hospedeiras eucariotas adequadas incluem uma célula de levedo, uma célula vegetal ou uma célula animal, tal como uma célula de mamífero ou uma célula de inseto (por exemplo, uma célula baculovírus-infectível, tal como célula Sf9 ou HighFive). Exemplos de células de mamífero adequadas incluem várias linhagens de células de câncer de próstata, tais como DU145 e TsuPr1, outras linhagens de células de câncer de próstata transfectáveis ou transduzíveis, células primárias (PrEC), bem como uma série de células de mamífero rotineiramente usadas para a expressão de proteínas recombinantes (por exemplo, células COS, CHO, 293, 293T). Mais particularmente, um polinucleotídeo compreendendo a seqüência de codificação de PSCA ou um fragmento, análogo ou homólogo da mesma pode ser usado para gerar proteínas de PSCA ou fragmentos das mesmas usando qualquer um de uma série de sistemas de hospedeiro-vetor adequado para a expressão de proteínas de PSCA.

[000142] Uma ampla faixa de sistemas de hospedeiro-vetor adequados para a expressão de proteínas de PSCA ou fragmentos das mesmas está disponível; veja, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, *supra*). Vetores preferidos para expressão em mamífero incluem, mas não estão limitados a, pcDNA 3,1 myc-His-expressão (Invitrogen) e o vetor retroviral pSR α tkneo (Muller *et al.*, 1991, MCB 11: 1785). Usando esses vetores de expressão, a PSCA pode ser expressa em várias linhagens de células de câncer de próstata e não-próstata incluindo,

por exemplo, 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 e TsuPr1. Os sistemas de hospedeiro-vetor da invenção são úteis para a produção de uma proteína de PSCA ou fragmentos da mesma. Tais sistemas de vetor-hospedeiro podem ser empregados para estudar as propriedades funcionais de PSCA e mutações de PSCA ou análogos.

[000143] Proteína de PSCA recombinante humana ou um análogo ou homólogo ou fragmento da mesma pode ser produzido por células de mamífero transfectadas com uma estrutura que codifica um nucleotídeo PSCA-relacionado. Por exemplo, células 293T podem ser transfectadas com um plasmídeo de expressão que codifica PSCA ou um fragmento, análogo ou homólogo da mesma, uma proteína de PSCA-relacionada é expressa nas células 293T e a proteína de PSCA recombinante é isolada usando métodos padrões de purificação (por exemplo, purificação por afinidade usando antianticorpos de PSCA). Em outra modalidade, uma seqüência de codificação de PSCA é subclonada no vetor retroviral pSR α MSVtkneo e usada para infectar várias linhagens de células de mamífero, tal como NIH 3T3, TsuPr1, 293 e rat-1 de forma a estabelecer linhagens de células que expressam PSCA. Vários outros sistemas de expressão bem-conhecidos na técnica também podem ser empregados. Estruturas de expressão que codificam um peptídeo líder unido em rede a uma seqüência de codificação de PSCA podem ser usadas para a geração de uma forma secretada de proteína de PSCA recombinante.

[000144] Conforme discutido aqui, redundância no código genético permite variação nas seqüências do gene de PSCA. Em particular, sabe-se na técnica que espécies hospedeiras específicas freqüentemente têm preferências de códon específicas e, assim, pode-se adaptar a seqüência descrita conforme preferido para um hospedeiro desejado. Por exemplo, seqüências de códon análogas preferidas têm, tipicamente, códons raros (isto é, códons tendo uma

freqüência de uso de menos do que cerca de 20% em seqüências conhecidas do hospedeiro desejado) substituídos por códons de maior freqüência. As preferências de códon para espécies específicas são calculadas, por exemplo, através de utilização de tabelas de uso de códon disponíveis na INTERNET, tal como na URL dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html.

[000145] Modificações adicionais de seqüência são conhecidas por intensificar a expressão de proteína em um hospedeiro celular. Essas incluem eliminação de seqüências que codificam sinais de poliadenilação espúrios, sinais de sítio de união de éxon/intron, repetições semelhantes a transposons e/ou outras de tais seqüências bem caracterizadas que são prejudiciais à expressão do gene. O teor de GC da seqüência é ajustado para níveis médios para um determinado hospedeiro celular, conforme calculado através de referência a genes conhecidos expressos na célula hospedeira. Onde possível, a seqüência é modificada para evitar estruturas de mRNA secundárias "grampo de cabelo" previstas. Outras modificações úteis incluem a adição de uma seqüência de consenso de início de tradução no início da rede de leitura aberta, conforme descrito em Kozak, Mol. Cell Biol., 9: 5073-5080 (1989). aqueles versados na técnica compreenderão que a regra geral de que ribossomas eucariotas iniciam a tradução exclusivamente no codon AUG 5' proximal é abolida apenas sob condições raras (veja, por exemplo, Kozak PNAS 92(7): 2662-2666, (1995) e Kozak NAR 15(20): 8125-8148 (1987)).

II.) Proteínas de PSCA-Relacionadas

[000146] Outro aspecto da presente invenção proporciona proteínas de PSCA-relacionadas. Modalidades específicas de proteínas de PSCA compreendem um polipeptídeo ou toda ou parte de uma seqüência de aminoácidos do PSCA humana, conforme mostrado na Figura 1, de preferência Figura 1A. Alternativamente, modalidades de

proteínas de PSCA compreendem polipeptídeos variantes, homólogos ou análogos que têm alterações na seqüência de aminoácidos de PSCA mostrada na Figura 1.

[000147] Modalidades de um polipeptídeo de PSCA incluem: a seqüência de polipeptídeo de PSCA mostrada na Figura 1, a seqüência de peptídeo de PSCA conforme mostrado na Figura 1 em que T é U; pelo menos 10 nucleotídeos contínuos de uma seqüência de polipeptídeo conforme mostrado na Figura 1; ou pelo menos 10 peptídeos contínuos de uma seqüência de polipeptídeo conforme mostrado na Figura 1 onde T é U.

[000148] Abreviações de aminoácidos são fornecidas na Tabela II. Substituições conservativas de aminoácido podem, freqüentemente, ser feitas em uma proteína sem alterar a conformação ou a função da proteína. As proteínas de antígeno podem compreender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 substituições conservativas.

[000149] Modalidades da invenção descrita aqui incluem uma ampla variedade de variantes ou análogos aceitos na técnica de proteínas de PSCA, tais como polipeptídeos tendo inserções, deleções e substituições de aminoácido. Variantes de PSCA podem ser feitas usando métodos conhecidos na técnica, tais como mutagênese sítio-dirigida, exploração com alanina e mutagênese por PCR. Mutagênese sítio-dirigida (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)), mutagênese em cassete (Wells *et al.*, Gene, 34: 315 (1985)), mutagênese através de seleção por restrição (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. Londres SerA, 317: 415 (1986)) ou outras técnicas conhecidas podem ser realizados sobre o DNA clonado para produzir o DNA de variante de PSCA.

[000150] Análise por exploração de aminoácido também pode ser empregada para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma seqüência contínua que está envolvida em uma atividade biológica

específica, tal como uma interação proteína-proteína. Dentre os aminoácidos de exploração preferidos estão aminoácidos neutros relativamente pequenos. Tais aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. Alanina é, tipicamente, um aminoácido de exploração preferido entre esse grupo, porque ela elimina a cadeia lateral além do beta-carbono e é menos provável de alterar a conformação da cadeia principal da variante. Alanina também é, tipicamente, preferida porque ela é o aminoácido mais comum. Ainda, ela é frequentemente encontrada em posições de encaixe e expostas (Creighton, *A Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150: 1 (1976)). Se substituição de alanina não proporciona quantidades adequadas de variante, um aminoácido isostérico pode ser usado.

[000151] Conforme definido aqui, variantes, análogos ou homólogos de PSCA têm o atributo distinguível de terem pelo menos um epítopo que tem "reação cruzada" com uma proteína de PSCA tendo uma sequência de aminoácidos da Figura 1. Conforme usado nessa sentença, "reação cruzada" significa que um anticorpo ou célula T que se liga especificamente a uma variante de PSCA também se liga especificamente a uma proteína de PSCA tendo uma sequência de aminoácidos apresentada na Figura 1. Um polipeptídeo deixa de ser uma variante de uma proteína mostrada na Figura 1 quando ele não contém mais qualquer epítopo capaz de ser reconhecido por um anticorpo ou célula T que se liga especificamente à proteína de PSCA alvo. Aqueles versados na técnica compreenderão que anticorpos que reconhecem proteínas se ligam a epítopos de tamanho e agrupamento variados da ordem de cerca de quatro a cinco aminoácidos, contínuos ou não, é considerado como um número típico de aminoácidos em um epítopo mínimo. Veja, por exemplo, Nair *et al.*, *J. Immunol* 2000 165(12): 6949-6955; Hebbes *et al.*, *Mol Immunol* (1989) 26(9): 865-73; Schwartz *et al.*, *J Immunol* (1985) 135(4): 2598-608.

[000152] Outras classes de variantes de proteína de PSCA-relacionadas compartilham 70%, 75%, 80%, 85% ou 90% ou mais de similaridade com uma seqüência de aminoácidos da Figura 1 ou um fragmento da mesma. Outra classe específica de variantes de proteína de PSCA ou análogos compreende um ou mais motivos biológicos de PSCA descritos aqui ou atualmente conhecidos na técnica. Assim, abrangidos pela presente invenção são análogos de fragmentos de PSCA (ácido nucléico ou aminoácido) que têm propriedades funcionais alteradas (por exemplo, imunogênicas) com relação ao fragmento inicial. Será apreciado que os motivos agora ou os quais se tornarão parte da técnica devem ser aplicados às seqüências de ácido nucléico ou aminoácido da Figura 1.

[000153] Conforme discutido aqui, modalidades da invenção reivindicada incluem polipeptídeos contendo menos do que a seqüência completa de aminoácidos de uma proteína de PSCA mostrada na Figura 1. Por exemplo, modalidades representativas da invenção compreendem peptídeos/proteínas tendo qualquer um de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 ou mais aminoácidos contínuos de uma proteína de PSCA mostrada na Figura 1.

[000154] Proteínas de PSCA-relacionadas são geradas usando tecnologia padrão de síntese de peptídeo ou usando métodos de clivagem química bem-conhecidos na técnica. Alternativamente, métodos recombinantes podem ser usados para gerar moléculas de ácido nucléico que codificam uma proteína de PSCA-relacionada. Em uma modalidade, moléculas de ácido nucléico proporcionam um meio para gerar fragmentos definidos de uma proteína de PSCA (ou variantes, homólogos ou análogos da mesma).

III.A.) Modalidades de Proteína Trazendo Motivo

[000155] Modalidades ilustrativas adicionais da invenção descrita aqui incluem polipeptídeos de PSCA compreendendo os resíduos de

aminoácido de um ou mais dos motivos biológicos contidos dentro de uma seqüência de polipeptídeo de PSCA apresentada na Figura 1. Vários motivos são conhecidos na técnica e uma proteína pode ser avaliada com relação à presença de tais motivos através de uma série de sites na Internet publicamente disponíveis (veja, por exemplo, endereços de URL: pfam.wustl.edu/; searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html; psort.ims.u-tokyo.ac.jp/; cbs.dtu.dk/; ebi.ac.uk/interpro/scan.html; expasy.ch/tools/scnpsit1.html; Epimatrix[®] e Epimer[®], Brown University, brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; e BIMAS, bimas.dcrn.nih.gov/).

[000156] Subseqüências trazendo motivo de todas as proteínas variantes de PSCA são apresentadas e identificadas na Tabelas V-XVIII e XXII-LI.

[000157] A Tabela IV(h) apresenta vários motivos que ocorrem freqüentemente baseado em buscas no pfam (veja endereço de URL pfam.wustl.edu/). As colunas da Tabela IV(h) listam (1) abreviação do nome do motivo, (2) identidade percentual encontrada entre os diferentes membros da família do motivo, (3) nome ou descrição do motivo e (4) função mais comum; informação de localização e está incluído se o motivo é relevante para localização.

[000158] Polipeptídeos compreendendo um ou mais dos motivos de PSCA discutidos acima são úteis na elucidação das características específicas de um fenótipo maligno em vista da observação de que os motivos de PSCA discutidos acima estão associados ao crescimento desregulado e porque a PSCA é superexpressa em determinados cânceres (veja, por exemplo, Tabela I). Quinase II de caseína, cAMP e quinase de proteína cAMP-dependente e Quinase de Proteína C, por exemplo, são enzimas conhecidas por estarem associadas ao desenvolvimento de fenótipo maligno (veja, por exemplo Chen *et al.*,

Lab Invest., 78(2): 165-174 (1998); Gaiddon *et al.*, Endocrinology 136(10): 4331-4338 (1995); Hall *et al.*, Nucleic Acids Research 24(6): 1119-1126 (1996); Peterziel *et al.*, Oncogene 18(46): 6322-6329 (1999) e O'Brian, Oncol. Rep. 5(2): 305-309 (1998)). Além disso, glicosilação e miristoilação são modificações de proteína também associadas ao câncer e progressão de câncer (veja, por exemplo Dennis *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1473(1): 21-34 (1999); Raju *et al.*, Exp. Cell Res. 235(1): 145-154 (1997)). Amidiação é outra modificação de proteína também associada ao câncer e progressão de câncer (veja, por exemplo Treston *et al.*, J. Natl. Câncer Inst. Monogr. (13): 169-175 (1992)).

[000159] Em outra modalidade, proteínas da invenção compreendem um ou mais dos epítomos imunorreativos identificados de acordo com métodos aceitos na técnica, tais como os peptídeos apresentados nas Tabelas V-XVIII e XXII-LI. Epítomos de CTL podem ser determinados usando algoritmos específicos para identificar peptídeos dentro de uma proteína de PSCA que são capazes de ligação ótima aos alelos de HLA especificados (por exemplo, Tabela IV; Epimatrix® e Epimer®, Brown University, URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; e BIMAS, URL bimas.dcrf.nih.gov/.) Além disso, processo para a identificação de peptídeos que têm afinidade de ligação suficiente por moléculas de HLA e os quais estão correlacionados por serem epítomos imunogênicos são bem-conhecidos na técnica e são realizados sem experimentação indevida. Além disso, processos para identificação de peptídeos que são epítomos imunogênicos são bem-conhecidos na técnica e são realizados sem experimentação indevida *in vitro* ou *in vivo*.

[000160] Também conhecidos na técnica são princípios para criação de análogos de tais epítomos de forma a modular a imunogenicidade. Por exemplo, pode-se começar com um epítomo que traz um motivo de

CTL ou HTL (veja, por exemplo, os motivos/supermotivos da Classe I do HLA e da Classe II do HLA da Tabela IV). O epítopo é análogo através de substituição de um aminoácido em uma das posições especificadas e substituição do mesmo por outro aminoácido especificado para essa posição. Por exemplo, com base nos resíduos definidos na Tabela IV, pode-se substituir um resíduo prejudicial em favor de qualquer outro resíduo, tal como um resíduo preferido; substituir um resíduo menos preferido por um resíduo preferido; ou substituir um resíduo preferido que ocorre naturalmente por outro resíduo preferido. Substituições podem ocorrer nas posições âncora primárias ou em outras posições no peptídeo; veja, por exemplo, Tabela IV.

[000161] Uma variedade de referências reflete a técnica com relação à identificação e geração de epítomos em uma proteína de interesse, bem como análogos da mesma. Veja, por exemplo, 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): 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.

[000162] Modalidades relacionadas da invenção incluem polipeptídeos compreendendo combinações dos diferentes motivos apresentados na(s) Tabela(s) IV(a), IV(b), IV(c), IV(d) e IV(h) e/ou um

ou mais dos epítomos de CTL previstos das Tabelas V-XVIII e XXII-LI e/ou um ou mais dos epítomos de HTL previstos das Tabelas XLVIII-LI e/ou um ou mais dos motivos de ligação a células T conhecidos na técnica. Modalidades preferidas não contêm inserções, deleções ou substituições dentro dos motivos ou dentro das seqüências intervenientes dos polipeptídeos. Além disso, modalidades as quais incluem uma série de resíduos de aminoácido N-terminais e/ou C-terminais sobre qualquer lado desses motivos podem ser desejáveis (por exemplo, para incluir uma maior porção da arquitetura do polipeptídeo na qual o motivo está localizado). Tipicamente, o número de resíduos de aminoácido N-terminais e/ou C-terminais sobre qualquer lado de um motivo está entre cerca de 1 a cerca de 100 resíduos de mamífero, de preferência 5 a cerca de 50 resíduos de aminoácido.

[000163] Proteínas de PSCA-relacionadas também são concretizadas de várias formas, de preferência na forma isolada. Uma molécula de proteína de PSCA purificada será substancialmente isenta de outras proteínas ou moléculas que prejudicam a ligação de PSCA a um anticorpo, células T ou outro ligante. A natureza e grau de isolamento e purificação dependerão do uso pretendido. Modalidades de proteínas de PSCA-relacionadas incluem proteínas de PSCA-relacionadas purificadas e proteínas de PSCA-relacionadas solúveis funcionais. Em uma modalidade, uma proteína de PSCA funcional solúvel ou fragmento da mesma retém a capacidade de se ligar através de um anticorpo, célula T ou outro ligante.

[000164] A invenção também proporciona proteínas de PSCA compreendendo fragmentos biologicamente ativos de uma seqüência de aminoácidos de PSCA mostrada na Figura 1. Tais proteínas exibem propriedades da proteína de PSCA inicial, tal como a capacidade de estimular a geração de anticorpos que se ligam especificamente a um

epítopo associado à proteína de PSCA inicial; serem ligadas através de tais anticorpos; estimular a ativação de HLT e/ou CTL; e/ou serem reconhecidas por HLT ou CTL que também se ligam especificamente à proteína inicial.

[000165] Polipeptídeos PSCA-relacionados que contêm estruturas particularmente interessantes podem ser previstos e/ou identificados usando vários métodos analíticos conhecidos na técnica incluindo, por exemplo, os métodos de análise de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf ou baseados em imunogenicidade. Fragmentos que contêm tais estruturas são particularmente úteis na geração de antianticorpos de PSCA subunidade-específicos ou células T ou na identificação de fatores celulares que se ligam à PSCA. Por exemplo, os perfis de hidrofiliabilidade podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Hopp, T.P. e Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828. Os perfis de hidropaticidade podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Kyte, J. e Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132. Os perfis de Resíduos Acessíveis Percentuais (%) podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Janin J., 1979, Nature 277: 491-492. Os perfis de Flexibilidade Média podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255. Os perfis de Beta-Giro podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1: 289-294.

[000166] Epítomos de CTL podem ser determinados usando algoritmos específicos para identificar peptídeos dentro de uma

proteína de PSCA que são capazes de ligação ótima a alelos de HLA especificados (por exemplo, através de uso do site SYFPEITHI na URL da World Wide Web syfpeithi.bmi-heidelberg.com/; as listagens na Tabela IV(A)-(E); Epimatrix® e Epimer®, Brown University, URL (brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); e BIMAS, URL bimas.dcrt.nih.gov/). Ilustrando isso, epítomos peptídicos de PSCA que são apresentados no contexto de moléculas da Classe I do MHC humano, por exemplo, HLA-A1, A2, A3, A11, A24, B7 e B35, foram previstas (veja, por exemplo, Tabelas V-XVIII, XXII-LI). Especificamente, a seqüência de aminoácidos completa de uma proteína de PSCA e porções relevantes de outras variantes, isto é, para previsões da Classe I do HLA, 9 resíduos de flaqueamento sobre qualquer lado de uma mutação por pontos ou junção de éxon e, para previsões da Classe II do HLA, 14 resíduos de flaqueamento sobre o lado de uma mutação por pontos ou junção de éxon correspondendo a essa variante, foram colocados no algoritmo HLA Peptide Motif Search encontrado no web site Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) listado acima; além do site SYFPEITHI, na URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/.

[000167] O algoritmo de busca por motivo de peptídeo de HLA foi desenvolvido pelo Dr. Ken Parker baseado na ligação de seqüências peptídicas específicas na ranhura de moléculas da Classe I do HLA, em particular HLA-A2 (veja, por exemplo, 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)). Esse algoritmo permite a localização e classificação de peptídeos de 8-mer, 9-mer e 10-mer a partir de uma seqüência de proteína completa para ligação prevista ao HLA-A2, bem como numerosas outras moléculas da Classe I do HLA. Muitos peptídeos de ligação à classe I do HLA têm 8-, 9-, 10 ou 11-mers. Por exemplo, para

HLA-A2 da Classe I, os epítomos contêm, de preferência, uma leucina (L) ou metionina (M) na posição 2 e uma valina (V) ou leucina (L) no C-término (veja, por exemplo, Parker *et al.*, J. Immunol. 149: 3580-7 (1992)). Os resultados selecionados de peptídeos de ligação previstos à PSCA são mostrados nas Tabelas V-XVIII e XXII-LI aqui. Nas Tabelas V-XVIII e XXII-XLVIII, candidatos selecionados, de 9-mers e 10-mers, para cada membro da família são mostrados junto com sua localização, a seqüência de aminoácidos de cada peptídeo específico e um escore de ligação estimado. Nas Tabelas XLVIII-LI, candidatos selecionados, 15-mers, para cada membro da família são mostrados junto com sua localização, a seqüência de aminoácidos de cada peptídeo específico e um escore de ligação estimado. O escore de ligação corresponde à meia-vida estimada de dissociação de complexos contendo o peptídeo a 37°C em um pH de 6,5. Peptídeos com maior escore de ligação são previstos como sendo mais hermeticamente ligados à classe I do HLA sobre a superfície celular durante um maior período de tempo e, assim, representam os melhores alvos imunogênicos para reconhecimento de células T.

[000168] A ligação real de peptídeos a um alelo de HLA pode ser avaliada através de estabilização de expressão de HLA sobre a linhagem de células processamento de antígeno-defectiva T2 (veja, por exemplo, Xue *et al.*, Prostate 30: 73-8 (1997) e Peshwa *et al.*, Prostate 36: 129-38 (1998)). A imunogenicidade de peptídeos específicos pode ser avaliada *in vitro* através de estimulação de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (CTL) na presença de células apresentando antígeno, tais como células dendríticas.

[000169] Será apreciado que cada epítipo previsto pelo site BIMAS Epimer[®] e o site Epimatrix[®] ou especificado por motivos da classe I ou da classe II do HLA disponíveis na técnica ou os quais se tornarão parte de tal técnica, conforme apresentado na Tabela IV (ou

determinado usando o site na URL da World Wide Web syfpeithi.bmi-heidelberg.com/ ou BIMAS, bimas.dcrtnih.gov/) deve ser "aplicado" a uma proteína de PSCA de acordo com a invenção. Conforme usado nesse contexto, "aplicado" significa que uma proteína de PSCA é avaliada, por exemplo, visualmente, ou através de métodos de busca por padrões baseados em computador, conforme apreciado por aqueles versados na técnica relevante. Cada subsequência de uma proteína de PSCA de 8, 9, 10 ou 11 resíduos de aminoácido que traz um motivo da Classe I do HLA ou cada subsequência de 9 ou mais resíduos de aminoácido que traz um motivo da Classe II do HLA estão dentro do escopo da invenção.

II.B.) Expressão de Proteínas de PSCA-Relacionadas

[000170] Em uma modalidade descrita nos exemplos que seguem, a PSCA pode ser convenientemente expressa em células (tais como células 293T) transfectadas com um vetor de expressão comercialmente disponível, tal como um vetor de expressão CMV-acionado, que codifica a PSCA com uma expressão 6XHis e MYC C-terminal (pcDNA3,1/mycHIS, Invitrogen ou Tag5, GenHunter Corporation, Nashville TN). O vetor Tag5 proporciona um sinal de secreção de IgGK que pode ser usado para facilitar a produção de uma proteína de PSCA selecionada em células transfectadas. A PSCA HIS-tagged secretada no meio de cultura pode ser purificada, por exemplo, usando uma coluna de níquel, por meio de técnicas padrão.

II.C.) Modificações de Proteínas de PSCA-Relacionadas

[000171] Modificações de proteínas de PSCA-relacionadas, tais como modificações covalentes, estão incluídas dentro do escopo da presente invenção. Um tipo de modificação covalente inclui reação de resíduos de aminoácido ligados de um polipeptídeo de PSCA com um agente de derivatização orgânico que é capaz de reação com cadeias laterais selecionadas ou os resíduos N- ou C-terminais de uma

proteína de PSCA. Outro tipo de modificação covalente de um polipeptídeo de PSCA incluída dentro do escopo da presente invenção compreende alteração do padrão nativo de glicosilação de uma proteína do PSCA. Outro tipo de modificação covalente de PSCA compreende ligação de um polipeptídeo de PSCA a um de uma variedade de polímeros não proteináceos, por exemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol ou polioxialquilenos, da maneira apresentada nas Patentes U.S. N^{os} 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 ou 4.179.337.

[000172] Uma proteína de PSCA-relacionada da presente invenção também pode ser modificada para formar uma molécula quimérica compreendendo PSCA fundida a outro polipeptídeo ou seqüência de aminoácido heteróloga. Tal molécula quimérica pode ser sintetizada química ou recombinantemente. Uma molécula quimérica pode ter uma proteína da invenção fundida a outro antígeno tumor-associado ou fragmento do mesmo. Alternativamente, uma proteína de acordo com a invenção pode compreender uma fusão de fragmentos de uma seqüência de PSCA (aminoácido ou ácido nucléico) de modo que uma molécula é criada que não é, através de seu comprimento, diretamente homóloga à seqüência de aminoácido ou ácido nucléico mostrada na Figura 1. Tal molécula quimérica pode compreender múltiplos da mesma subseqüência de PSCA. Uma molécula quimérica pode compreender uma fusão de uma proteína de PSCA-relacionada com uma expressão de epítipo de polihistidina, a qual proporciona um epítipo ao qual níquel imobilizado pode se ligar seletivamente, com citocinas ou com fatores de crescimento. A expressão de epítipo geralmente é colocada no amino- ou carbóxi-término de uma proteína de PSCA. Em uma modalidade alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão de uma proteína de PSCA-relacionada com uma imunoglobulina ou uma região em particular de uma

imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também referida como uma "imunoadesina"), tal fusão poderia ser na região Fc de uma molécula de IgG. As fusões de Ig incluem, de preferência, a substituição de uma forma solúvel (domínio transmembrana deletado ou inativado) de um polipeptídeo de PSCA em lugar de pelo menos uma região variável dentro de uma molécula de Ig. Em uma modalidade preferida, a fusão de imunoglobulina inclui as regiões de dobradiça, CH2 e CH3 ou a dobradiça, CH1, CH2 e CH3 de uma molécula de IgG1. Para a produção de fusões de imunoglobulina veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.428.130, emitida em 27 de Junho de 1995.

II.D.) Usos de Proteínas de PSCA-Relacionadas

[000173] Uma proteína da invenção tem uma série de diferentes usos específicos. Uma vez que a PSCA é altamente expressa em câncer de próstata e outros, proteínas de PSCA-relacionadas são usadas em métodos que avaliam o estado dos produtos genéticos de PSCA em tecidos normais versus cancerígenos, desse modo, elucidando o fenótipo maligno. Tipicamente, polipeptídeos 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 contendo um ou mais motivos). Ensaios exemplificativos utilizam anticorpos ou células T objetivando proteínas de PSCA-relacionadas compreendendo os resíduos de aminoácido de um ou mais dos motivos biológicos contidos dentro de uma seqüência de polipeptídeo de PSCA de forma a avaliar as características dessa região em tecidos normais versus cancerígenos ou para estimular uma resposta imune ao epítipo. Alternativamente, proteínas de PSCA-relacionadas que contêm os resíduos de aminoácido de um ou mais dos motivos biológicos em uma proteína de PSCA são usados para selecionar fatores que

interagem com essa região do PSCA.

[000174] Fragmentos/subseqüências de proteína de PSCA são particularmente úteis na geração e caracterização de anticorpos domínio-específicos (por exemplo, anticorpos que reconhecem um epítopo extracelular ou intracelular de uma proteína de PSCA), para identificação de agentes ou fatores celulares que se ligam à PSCA ou um domínio estrutural particular da mesma e em vários contextos terapêuticos e diagnósticos incluindo, mas não limitado a, ensaios diagnósticos, vacinas contra câncer e métodos de preparo de tais vacinas.

[000175] As proteínas codificadas pelos genes de PSCA ou por análogos, homólogos ou fragmentos dos mesmos têm uma variedade de usos incluindo, mas não limitado a, geração de anticorpos e em métodos para identificação de ligantes e outros agentes e constituintes celulares que se ligam a um produto genético 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 no gerenciamento de cânceres humanos caracterizados por expressão de proteína de PSCA, tais como aqueles listados na Tabela I. Tais anticorpos podem ser expressos intracelularmente e usados em métodos de tratamento de pacientes com tais cânceres. Ácidos nucleicos ou proteínas de PSCA-relacionadas também são usados na geração de respostas de HTL ou CTL.

[000176] Vários ensaios imunológicos úteis para a detecção de proteínas de PSCA são usados incluindo, mas não limitado a, vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes enzima-ligados (ELISA), ensaios imunofluorescentes enzima-ligados (ELIFA), métodos imunocitoquímicos e similares. Anticorpos podem ser ligados e usados como reagentes de formação de imagem imunológicos

capazes de detecção de células que expressam PSCA (por exemplo, em métodos de formação de imagem por radiocintigrafia). Proteínas de PSCA também são particularmente úteis na geração de vacinas contra o câncer, conforme ainda descrito aqui.

IV.) Anticorpos de PSCA

[000177] Outro aspecto da invenção proporciona anticorpos que se ligam às proteínas de PSCA-relacionadas. Anticorpos preferidos se ligam especificamente a uma proteína de PSCA-relacionada e não se ligam (ou se ligam fracamente) a peptídeos ou proteínas que não são proteínas de PSCA-relacionadas sob condições fisiológicas. Nesse contexto, exemplos de condições fisiológicas incluem: 1) solução salina tamponada com fosfato; 2) solução salina tamponada com Tris contendo Tris a 25 mM e NaCl a 150 mM; ou solução salina normal (NaCl a 0,9%); 3) soro animal, tal como soro humano; ou 4) uma combinação de 1) a 3); essas reações ocorrem, de preferência, em um pH de 7,5, alternativamente na faixa de um pH de 7,0 a 8,0 ou, alternativamente, em uma faixa de um pH de 6,5 a 8,5; também, essas reações ocorrem em uma temperatura entre 4°C a 37°C. Por exemplo, anticorpos que se ligam à PSCA podem se ligar à proteínas de PSCA-relacionadas, tais como homólogos ou análogos das mesmas.

[000178] Os anticorpos de PSCA da invenção são particularmente úteis em ensaios diagnósticos e prognósticos e metodologias de formação de imagem em câncer (veja, por exemplo, Tabela I). Similarmente, tais anticorpos são úteis no tratamento, diagnóstico e/ou prognóstico de câncer de próstata e outros, até o ponto em que a PSCA também é expressa ou superexpressa nesses outros cânceres. Além disso, anticorpos intracelularmente expressos (por exemplo, anticorpos com cadeia simples) são terapeuticamente úteis no tratamento de cânceres nos quais a expressão de PSCA está envolvida, tais como câncer de próstata avançado ou metastático ou

outros cânceres avançados ou metastáticos.

[000179] A invenção também proporciona vários ensaios imunológicos úteis para a detecção e quantificação de PSCA e proteínas de PSCA-relacionadas mutantes. Tais ensaios podem compreender um ou mais anticorpos de PSCA capazes de reconhecimento e ligação a uma proteína de PSCA-relacionada, conforme apropriado. Esses ensaios são realizados dentro dos vários formatos de ensaio imunológico bem-conhecidos na técnica incluindo, mas não limitado a, vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunoabsorventes enzima-ligados (ELISA), ensaios imunofluorescentes enzima-ligados (ELIFA) e similares.

[000180] Ensaio de anticorpo não-imunológicos da invenção também compreendem ensaios de imunogenicidade a células T (inibitório ou estimulatório), bem como ensaios de ligação ao principal complexo de histocompatibilidade (MHC).

[000181] Além disso, métodos de formação de imagem imunológicos capazes de detecção de câncer de próstata e outros cânceres expressando PSCA também são proporcionados pela invenção incluindo, mas não limitado a, métodos de formação de imagem radiocintigráficos usando anticorpos de PSCA ligados. Tais ensaios são clinicamente úteis na detecção, monitoramento e prognóstico de cânceres que expressam PSCA, tal como câncer de próstata.

[000182] Anticorpos de PSCA também são usados em métodos para purificação de uma proteína de PSCA-relacionada e para o isolamento de homólogos de PSCA e moléculas relacionadas. Por exemplo, de purificação de uma proteína de PSCA-relacionada compreende incubação de um anticorpo de PSCA, o qual tenha sido acoplado a uma matriz sólida, com um lisato ou outra solução contendo uma proteína de PSCA-relacionada sob condições que permitem que o anticorpo de PSCA se ligue à proteína de PSCA-relacionada; lavagem

da matriz sólida para eliminar impurezas; e eluição da proteína de PSCA-relacionada do anticorpo acoplado. Outros usos de anticorpos de PSCA de acordo com a invenção incluem geração de anticorpos anti-idiotípicos que imitam uma proteína de PSCA.

[000183] Vários métodos para o preparo de anticorpos são bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, anticorpos podem ser preparados através de imunização de um hospedeiro mamífero adequado usando uma proteína de PSCA-relacionada, peptídeo ou fragmento em uma forma isolada ou imunoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press eds., Harlow e Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Além disso, proteínas de PSCA de fusão também podem ser usadas, tais como a proteína de fusão PSCA-GST. Em uma modalidade em particular, uma proteína de fusão GST compreendendo toda ou a maior parte de uma seqüência de aminoácidos da Figura 1 é produzida, então, usada como um imunogênio para gerar anticorpos apropriados. Em outra modalidade, uma proteína de PSCA-relacionada é sintetizada e usada como um imunogênio.

[000184] Além disso, métodos de imunização com DNA nu bem-conhecidos na técnica são usados (com ou sem proteína de PSCA-relacionada purificada ou células que expressam PSCA) para gerar uma resposta imune ao imunogênio codificado (para revisão, veja Donnelly *et al.*, 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

[000185] A seqüência de aminoácidos de uma proteína de PSCA conforme mostrado na Figura 1 pode ser analisada para selecionar regiões específicas de uma proteína de PSCA para geração de anticorpos. Por exemplo, análises de hidrofobicidade e hidrofiliidade de uma seqüência de aminoácidos de PSCA são usadas para identificar regiões hidrofílicas na estrutura do PSCA. Regiões de uma proteína de PSCA que mostram estrutura imunogênica, bem como

outras regiões e domínios, podem ser prontamente identificados usando vários outros métodos conhecidos na técnica, tais como análise de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf. Os perfis de hidrofiliidade podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Hopp, T.P. e Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828. Os perfis de hidropaticidade podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Kyte, J. e Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132. Os perfis de Resíduos Acessíveis Percentuais (%) podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Janin J., 1979, Nature 277: 491-492. Os perfis de Flexibilidade Média podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados usando o método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255. Os perfis de Beta-Giro podem ser gerados e fragmentos peptídicos imunogênicos identificados 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 escopo da presente invenção. Métodos preferidos para a geração de anticorpos de PSCA são ainda ilustrados por meio dos exemplos proporcionados aqui. Métodos para o preparo de uma proteína ou polipeptídeo para uso como um imunogênio são bem-conhecidos na técnica. Também bem-conhecidos na técnica são métodos para o preparo de conjugados imunogênicos de uma proteína com um veículo, tal como BSA, KLH ou outra proteína veículo. Em algumas circunstâncias, conjugação direta usando, por exemplo, reagentes de carbodiimida, são usados; em outros casos, reagentes de ligação, tais como aqueles fornecidos pela Pierce Chemical Co., Rockford, IL, são eficazes. A administração de um imunogênio de PSCA é,

freqüentemente, conduzida através de injeção durante um período de tempo e com uso de um adjuvante adequado, conforme é compreendido na técnica. Durante o esquema de imunização, as titulações de anticorpo podem ser tomadas para determinar a adequabilidade de formação de anticorpo.

[000186] Anticorpos monoclonais de PSCA podem ser produzidos através de vários meios bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, linhagens de células imortalizadas que secretam um anticorpo monoclonal são preparadas usando a tecnologia padrão de hibridoma de Kohler e Milstein ou modificações que imortalizam células B que produzem anticorpo, conforme é geralmente conhecido. Linhagens de células imortalizadas que secretam os anticorpos desejados são selecionadas através de imunoensaio no qual o antígeno é uma proteína de PSCA-relacionada. Quando a cultura de células imortalizada apropriada é identificada, as células podem ser expandidas e os anticorpos produzidos, quer a partir de culturas *in vitro* ou de fluido de ascita.

[000187] 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 enxertados com região de determinação de complementaridade (CDR) ou quiméricos originários de múltiplas espécies. Anticorpos de PSCA humanizados ou humanos também podem ser produzidos e são preferidos para uso em contextos terapêuticos. Métodos para humanização de anticorpos de murina e outros não-humanos através de substituição de uma ou mais das CDRs do anticorpo não-humano por seqüências de anticorpo humano correspondentes são bem-conhecidos (veja, por exemplo, Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*,

1988, Science 239: 1534-1536). Veja também Carter *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 e Sims *et al.*, 1993, J. Immunol. 151: 2296.

[000188] Métodos para produção de anticorpos monoclonais totalmente humanos incluem exposição do fago e métodos transgênicos (para revisão, veja Vaughan *et al.*, 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539). Anticorpos monoclonais de PSCA totalmente humanos podem ser gerados usando tecnologias de clonagem empregando grandes bibliotecas combinatoriais de gene de Ig humana (isto é, *exposição do fago*) (Griffiths e Hoogenboom, Building an in vitro immune system: human antibodies from *exposição do fago* libraries. Em: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and 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 de PSCA totalmente humanos também podem ser produzidos usando camundongos transgênicos manipulados para conter o loci do gene de imunoglobulina humana conforme descrito no Pedido de Patente PCT WO98/24893, Kucherlapati e Jakobovits *et al.*, publicada em 3 de Dezembro de 1997 (veja 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 *exposição do fago* e produz eficazmente anticorpos humanos autênticos de elevada afinidade.

[000189] A reatividade de anticorpos de PSCA com uma proteína de PSCA-relacionada pode ser estabelecida através de uma série de meios bem-conhecidos, incluindo Western blot, imunoprecipitação, análises por ELISA e FACS usando, conforme apropriado, proteínas

de PSCA-relacionadas, células que expressam PSCA ou extratos das mesmas. Um anticorpo de PSCA ou fragmento do mesmo pode ser ligado 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 quelador de metal ou uma enzima. Ainda, anticorpos biespecíficos específicos para dois ou mais epítopos de PSCA são gerados usando métodos geralmente conhecidos na técnica. Anticorpos homodiméricos também podem ser gerados através de métodos de ligação reticulada conhecidos na técnica (por exemplo, Wolff *et al.*, Câncer Res. 53: 2560-2565).

[000190] Em uma modalidade, a invenção proporciona anticorpos monoclonais identificados como Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.20, Ha1-4.121, Ha1-4.37 que foram enviados (via Federal Express) para a American Type Culture Collection (ATCC), Caixa Postal 1549, Manassas, VA 20108 em 04 de Maio de 2005 e atribuídos os Números de Acesso PTA-6698 e PTA-6703 e PTA-6699 e PTA-6700 e PTA-6701 e PTA-6702, respectivamente.

V.) Respostas Imunes Celulares à PSCA

[000191] O mecanismo através do qual células T reconhecem antígenos foi delineado. Composições de vacina de epítipo peptídico eficazes da invenção induzem a um produto terapêutico ou respostas imunes profiláticas em segmentos muito amplos da população mundial. Para uma compreensão do valor e eficácia das composições da invenção que induzem a respostas imunes celulares, uma rápida revisão da tecnologia imunologia-relacionada é proporcionada.

[000192] Um complexo de uma molécula do HLA e um antígeno peptídico atuam como o ligante reconhecido por células T HLA-restritas (Buus, S. *et al.*, Cell 47: 1071, 1986; Babbitt, B. P. *et al.*,

Nature 317: 359, 1985; Townsend, A. e Bodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7: 601, 1989; Germain, R. N., Annu. Rev. Immunol. 11: 403, 1993). Através de estudo de análogos de antígeno com um único aminoácido substituído e seqüenciamento dos peptídeos endogenamente ligados naturalmente processados, resíduos críticos que correspondem aos motivos requeridos para ligação específica à moléculas de antígeno do HLA foram identificados e são apresentados na Tabela IV (veja também, por exemplo, Southwood *et al.*, J. Immunol. 160: 3363, 1998; Rammensee *et al.*, Immunogenetics 41:178, 1995; Rammensee *et al.*, SYFPEITHI, acesso via a World Wide Web na URL (134,2,96,221/scripts.hlaserver.dll/home.htm); Sette, A. e Sidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10: 478, 1998; Engelhard, V. H., Curr. Opin. Immunol. 6:1 3, 1994; Sette, A. e Grey, H. M., Curr. Opin. Immunol. 4: 79, 1992; Sinigaglia, F. e Hammer, J. Curr. Biol. 6: 52, 1994; Ruppert *et al.*, Cell 74: 929-937, 1993; Kondo *et al.*, J. Immunol. 155: 4307-4312, 1995; Sidney *et al.*, J. Immunol. 157: 3480-3490, 1996; Sidney *et al.*, Humano Immunol. 45: 79-93, 1996; Sette, A. e Sidney, J. Immunogenetics, Novembro de 1999; 50(3-4): 201-12, Revisão).

[000193] Além disso, análises cristalográficas por raios X de complexos de HLA-peptídeo revelaram bolsas dentro da ranhura/agrupamento de ligação de peptídeo de moléculas do HLA as quais acomodam, de um modo alelo-específico, resíduos abrigados pelos ligantes peptídicos; esses resíduos, por sua vez, determinam a capacidade de ligação dos peptídeos nos quais eles estão presentes. (Veja, por exemplo, Madden, D.R. Annu. Rev. Immunol. 13: 587, 1995; Smith *et al.*, Immunity 4: 203, 1996; Fremont *et al.*, Immunity 8: 305, 1998; Stern *et al.*, Structure 2: 245, 1994; Jones e.Y. Curr. Opin. Immunol. 9: 75, 1997; Brown, J. H. *et al.*, Nature 364: 33, 1993; Guo, H. C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 8053, 1993; Guo, H. C. *et*

al., Nature 360: 364, 1992; Silver, M. L. *et al.*, Nature 360: 367, 1992; Matsumura, M. *et al.*, Science 257: 927, 1992; Madden *et al.*, Cell 70: 1035, 1992; Fremont, D. H. *et al.*, Science 257: 919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. e Wiley, D. C., J. Mol. Biol. 219: 277, 1991).

[000194] Conseqüentemente, a definição de motivos de ligação ao HLA alelo-específicos da classe I e da classe II ou supermotivos da classe II permite a identificação de regiões dentro de uma proteína que estão correlacionadas com a ligação a antígeno(s) do HLA em particular.

[000195] Assim, através de um processo de identificação de motivos do HLA, candidatos a vacinas baseadas em epítipo foram identificados; tais candidatos podem ser ainda avaliados através de ensaios de ligação de HLA-peptídeo para determinar a afinidade de ligação e/ou o período de tempo de associado do epítipo e sua molécula de HLA correspondente. Trabalho confirmatório adicional pode ser realizado para detectar, dentre esses candidatos à vacina, epítopos com características preferidas em termos de abrangência de população e/ou imunogenicidade.

[000196] Várias estratégias podem ser utilizadas para avaliar a imunogenicidade celular, incluindo:

- 1) Avaliação de culturas primárias de células T de indivíduo normais (veja, por exemplo, Wentworth, P. A. *et al.*, Mol. Immunol. 32: 603, 1995; Celis e. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2105, 1994; Tsai, V. *et al.*, J. Immunol. 158: 1796, 1997; Kawashima, I. *et al.*, Human Immunol. 59: 1, 1998). Esse procedimento envolve a estimulação de linfócitos de sangue periférico (PBL) de indivíduos normais com um peptídeo de teste na presença de células apresentando antígeno *in vitro* durante um período de várias semanas. Células T específicas para o peptídeo se tornam ativadas durante esse tempo e são detectadas usando, por exemplo, um ensaio com linfocina

ou liberação de ^{51}Cr envolvendo as células alvo sensibilizadas ao peptídeo.

2) Imunização de camundongos transgênicos para o HLA (veja, por exemplo, Wentworth, P. A. *et al.*, J. Immunol. 26: 97, 1996; Wentworth, P. A. *et al.*, Int. Immunol. 8: 651, 1996; Alexander, J. *et al.*, J. Immunol. 159: 4753, 1997). Por exemplo, em tais métodos, peptídeos em adjuvante incompleto de Freund são administrados subcutaneamente a camundongos transgênicos para o HLA. Várias semanas após imunização, os esplenócitos são removidos e cultivados *in vitro* na presença de peptídeo de teste durante aproximadamente uma semana. Células T peptídeo-específicas são detectadas usando, por exemplo, um ensaio de liberação de ^{51}Cr envolvendo as células alvo sensibilizadas ao peptídeo e células alvo expressando antígeno endogenamente gerado.

3) Demonstração de respostas de retorno de células T de indivíduos imunes que tenham sido eficazmente vacinados e/ou de pacientes cronicamente doentes (veja, por exemplo, Rehmann, B. *et al.*, J. Exp. Med. 181: 1047, 1995; Doolan, D. L. *et al.*, Immunity 7: 97, 1997; Bertoni, R. *et al.*, J. Clin. Invest. 100: 503, 1997; Threlkeld, S. C. *et al.*, J. Immunol. 159: 1648, 1997; Diepolder, H. M. *et al.*, J. Virol. 71: 6011, 1997). Conseqüentemente, respostas de *recall* são detectadas através de cultura de PBL de indivíduos que tenham sido expostos ao antígeno em virtude de doença e, assim, podem ter gerado uma resposta imune "naturalmente" ou de pacientes que foram vacinados contra o antígeno. PBL de indivíduos são cultivados *in vitro* durante 1-2 semanas na presença de peptídeo de teste mais células apresentando antígeno (APC) para permitir a ativação de células T de "memória", quando comparado com células T "simples". Ao final do período de cultura, a atividade de células T é detectada usando ensaios, incluindo liberação de ^{51}Cr envolvendo alvos peptídeo-

sensibilizados, proliferação de células T ou liberação de linfocina.

VI.) Animais Transgênicos para PSCA

[000197] Ácido nucléicos que codificam uma proteína de PSCA-relacionada também podem ser usados para gerar animais transgênicos ou "neutralizados", animais que, por sua vez, são úteis no desenvolvimento e seleção de reagentes terapeuticamente úteis. De acordo com técnicas estabelecidas, cDNA que codifica PSCA pode ser usado para clonar DNA genômico que codifica PSCA. As seqüências genômicas clonadas podem, então, ser usadas para gerar animais transgênicos contendo células que expressam DNA que codifica PSCA. Métodos para a geração de animais transgênicos, particularmente animais tais como camundongos ou ratos, se tornaram convencionais na técnica e são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. N^{os} 4.736.866 emitida em 12 de Abril de 1988 e 4.870.009 emitida em 26 de Setembro de 1989. Tipicamente, células em particular seriam objetivadas à incorporação do transgene de PSCA com intensificadores tecido-específicos.

[000198] Animais transgênicos que incluem uma cópia de um transgene que codifica PSCA podem ser usados para examinar o efeito de expressão aumentada de DNA que codifica PSCA. Tais animais podem ser usados como animais de teste para reagentes para conferir proteção, por exemplo, de condições patológicas associadas a sua superexpressão. De acordo com esse aspecto da invenção, um animal é tratado com um reagente e uma incidência reduzida de uma condição patológica, comparado com animais não tratados que abrigam o transgene, indicaria uma intervenção terapêutica potencial com relação à condição patológica.

[000199] Alternativamente, homólogos não-humanos de PSCA podem ser usados para construir um animal "neutralizados" para a PSCA que tem um gene defectivo ou alterado que codifica PSCA

como um resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno que codifica PSCA e DNA genômico alterado que codifica PSCA introduzido na célula embriônica do animal. Por exemplo, cDNA que codifica PSCA pode ser usado para clonar DNA genômico que codifica PSCA de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do DNA genômico que codifica PSCA pode ser deletada ou substituída por outro gene, tal como um gene que codifica um marcador selecionável que pode ser usado para monitorar a integração. Tipicamente, várias quilobases de DNA de flanqueamento inalteradas (ambas nas extremidades 5' e 3') estão incluídos no vetor (veja, por exemplo, Thomas e Capecchi, *Cell*, 51: 503 (1987) para uma descrição de vetores de recombinação homólogos). O vetor é introduzido em uma linhagem de células-tronco embriônica (por exemplo, através de eletroporação) e células nas quais o DNA introduzido foi homologamente recombinado com o DNA endógeno são selecionadas (veja, por exemplo, Li *et al.*, *Cell*, 69: 915 (1992)). As células selecionadas são, então, injetadas em um blastocisto de um animal (por exemplo, um camundongo ou rato) para formar quimeras de agregação (veja, por exemplo, Bradley em *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach* E. J. Robertson ed. (IRL, Oxford, 1987), páginas 113-152). Um embrião quimérico pode, então, ser implantando em um animal fêmea pseudo-prenhe e o embrião levado a termo para criar um animal "neutralizados". A prole trazendo o DNA homologamente recombinado em suas células germinativas pode ser identificada através de técnicas padrão e usada para procriar animais nos quais todas as células do animal contêm o DNA homologamente recombinado. Animais "neutralizados" podem ser caracterizados, por exemplo, por sua capacidade de defesa contra determinadas condições patológicas ou seu desenvolvimento de condições patológicas em virtude de ausência de um polipeptídeo de

PSCA.

VII.) Métodos para a Detecção de PSCA

[000200] Outro aspecto da presente invenção se refere a métodos para detecção de polinucleotídeos de PSCA e proteínas de PSCA-relacionadas, bem como métodos para identificação de uma célula que expressa PSCA. O perfil de expressão do PSCA torna a mesma um marcador diagnóstico para doença metastatizada. Conseqüentemente, o estado de produtos genéticos de PSCA proporciona informação útil para prever uma variedades de fatores, incluindo suscetibilidade à doença em estágio avançado, taxa de progressão e/ou agressividade do tumor. Conforme discutido em detalhes aqui, o estado de produtos genéticos de PSCA em amostras do paciente pode ser analisado através de uma variedade de protocolos que são bem-conhecidos na técnica, incluindo análise imunoistoquímica, a variedade de técnicas de Northern blotting, incluindo hibridização *in situ*, análise por RT-PCR (por exemplo, sobre amostras microdissecadas por captura a laser), análise de Western blot e análise de arranjo tecidual.

[000201] Mais particularmente, a invenção proporciona ensaios para a detecção de polinucleotídeos de PSCA em uma amostra biológica, tal como soro, osso, próstata e outros tecidos, urina, sêmen, preparados de células e similares. Polinucleotídeos detectáveis de PSCA incluem, por exemplo, um gene de PSCA ou fragmento do mesmo, mRNA de PSCA, mRNAs de variantes com união alternativas de PSCA e moléculas de DNA ou RNA recombinantes que contêm um polinucleotídeo de PSCA. Uma série de métodos para amplificação e/ou detecção da presença de polinucleotídeos de PSCA são bem-conhecidos na técnica e podem ser empregados na prática desse aspecto da invenção.

[000202] Em uma modalidade, um método para detecção de um mRNA de PSCA em uma amostra biológica compreende produção de

cDNA a partir da amostra através de transcrição reversa usando pelo menos um iniciador; amplificação do cDNA assim produzido usando um polinucleotídeo de PSCA como iniciadores sentido e antisentido para amplificar cDNAs de PSCA nos mesmos; e detecção da presença do cDNA de PSCA amplificado. Opcionalmente, a sequência do cDNA de PSCA amplificado pode ser determinada.

[000203] Em outra modalidade, um método de detecção de um gene de PSCA em uma amostra biológica compreende primeiro isolamento do DNA genômico da amostra; amplificação do DNA genômico isolado usando polinucleotídeos de PSCA como iniciadores sentido e antisentido; e detecção da presença do gene de PSCA amplificado. Qualquer número de combinações de sondas sentido e antisentido apropriadas pode ser projetado a partir de uma sequência de nucleotídeo de PSCA (veja, por exemplo, Figura 1) e usado para essa finalidade.

[000204] A invenção também proporciona ensaios para a detecção da presença de uma proteína de PSCA em um tecido ou outra amostra biológica, tal como soro, sêmen, osso, próstata, urina, preparados de células e similares. Métodos para a detecção de uma proteína de PSCA-relacionada também são bem-conhecidos e incluem, por exemplo, imunoprecipitação, análise imunoistoquímica, análise de Western blot, ensaios de ligação molecular, ELISA, ELIFA e similares. Por exemplo, um método de detecção da presença de uma proteína de PSCA-relacionada em uma amostra biológica compreende primeiro contato da amostra com um anticorpo de PSCA, um fragmento PSCA-reactivo do mesmo ou uma proteína recombinante contendo uma região de antígeno-ligação de um anticorpo de PSCA; e, então, detecção da ligação de proteína de PSCA-relacionada na amostra.

[000205] Métodos para identificação de uma célula que expressa PSCA também estão dentro do escopo da invenção. Em uma

modalidade, um ensaio para identificação de uma célula que expressa um gene de PSCA compreende detecção da presença de mRNA de PSCA na célula. Métodos para a detecção de mRNAs em particular em células são bem-conhecidos e incluem, por exemplo, ensaios de hibridização usando sondas de DNA complementar (tal como hibridização *in situ* usando ribo-sondas de PSCA ligadas, Northern blot e técnicas relacionadas) e vários ensaios de amplificação de ácido nucléico (tal como RT-PCR usando iniciadores complementares específicos para PSCA e outros tipos de métodos de detecção por amplificação tais como, por exemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA e similares). Alternativamente, um ensaio para identificação de uma célula que expressa um gene de PSCA compreende detecção da presença de proteína de PSCA-relacionada na célula ou secretada pela célula. Vários métodos para a detecção de proteínas são bem-conhecidos na técnica e são empregados para a detecção de proteínas de PSCA-relacionadas e células que expressam proteínas de PSCA-relacionadas.

[000206] Análise de expressão de PSCA também é uma ferramenta útil para a identificação e avaliação de agentes que modulam expressão do gene de PSCA. Por exemplo, expressão de PSCA é significativamente super-regulada em câncer de próstata e é expressa em cânceres dos tecidos listados na Tabela I. Identificação de uma molécula ou agente biológico que inibe a expressão ou super-expressão de PSCA em células cancerígenas é de valor terapêutico. Por exemplo, tal agente pode ser identificado através de uso de uma seleção que quantifica a expressão de PSCA através de RT-PCR, hibridização de ácido nucléico ou ligação de anticorpo.

VIII.) Métodos para Monitoramento do Estado de Genes PSCA-relacionados e Seus Produtos

[000207] A oncogênese é conhecida por ser um processo com

múltiplas etapas onde o crescimento celular se torna progressivamente desregulado e as células progridem de um estado fisiológico normal para pré-canceroso e, então, estados cancerosos (veja, por exemplo, Alers *et al.*, Lab Invest. 77(5): 437-438 (1997) e Isaacs *et al.*, Câncer Surv. 23: 19-32 (1995)). Nesse contexto, o exame de uma amostra biológica com relação à evidência de crescimento desregulado de células (tal como expressão anormal de PSCA em cânceres) permite a detecção precoce de tal fisiologia anormal, antes que um estado patológico tal como câncer tenha progredido para um estado em que as opções terapêuticas são mais limitadas e/ou o prognóstico é pior. Em tais exames, o estado de PSCA em uma amostra biológica de interesse pode ser comparado, por exemplo, ao estado de PSCA em uma amostra normal correspondente (por exemplo, uma amostra desse indivíduo ou, alternativamente, outro indivíduo que não é afetado pela patologia). Uma alteração no estado de PSCA na amostra biológica (quando comparado com a amostra normal) proporciona evidência de crescimento celular desregulado. Além do uso de uma amostra biológica que não é afetada pela patologia como uma amostra normal, também se pode usar um valor normativo predeterminado, tal como um nível de expressão de mRNA normal predeterminado (veja, por exemplo, Grever *et al.*, J. Comp. Neurol., 9 de Dezembro de 1996; 376(2): 306-14 e Patente U.S. Nº 5.837.501).

[000208] O termo "estado", nesse contexto, é usado de acordo com seu significado aceito na técnica e se refere à condição ou estado de um gene e seus produtos. Tipicamente, aqueles habilitados usam uma série de parâmetros para avaliar a condição ou estado de um gene e seus produtos. Esses incluem, mas não estão limitados, ao local de produtos genéticos expressos (incluindo o local de células que expressam PSCA), bem como o nível e atividade biológica de produtos genéticos expressos (tais como mRNA, polinucleotídeos e

polipeptídeos de PSCA). Tipicamente, uma alteração no estado do PSCA compreende uma alteração na localização do PSCA e/ou células que expressam PSCA e/ou um aumento no mRNA e/ou expressão de proteína de PSCA.

[000209] O estado de PSCA em uma amostra pode ser analisado através de uma série de meios bem-conhecidos na técnica incluindo, sem limitação, análise imunoistoquímica, hibridização *in situ*, análise por RT-PCR sobre amostras microdissecadas por captura a laser, análise por Western blot e análise de arranjos teciduais. Protocolos típicos para avaliação do estado de um gene e produtos genéticos de PSCA são encontrados, por exemplo, em Ausubel *et al* eds., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Unidades 2 (Northern Blotting), 4 (Southern Blotting), 15 (Immunoblotting) e 18 (Análise por PCR). Assim, o estado de PSCA em uma amostra biológica é avaliado através de vários métodos utilizados por aqueles versados na técnica incluindo, mas não limitado a, análise genômica de Southern (para examinar, por exemplo, perturbações em um gene de PSCA), análise de Northern e/ou análise por PCR do mRNA de PSCA (para examinar, por exemplo, alterações nas seqüências de polinucleotídeo ou níveis de expressão de mRNAs de PSCA) e análise de Western e/ou imunoistoquímica (para examinar, por exemplo, alterações em seqüências polipeptídicas, alterações na localização de polipeptídeo dentro de uma amostra, alteração nos níveis de expressão de proteínas de PSCA e/ou associações de proteínas de PSCA com parceiros de ligação polipeptídicos). Polinucleotídeos de PSCA detectáveis incluem, por exemplo, um gene de PSCA ou fragmento do mesmo, mRNA de PSCA, variantes com união alternativas, mRNAs de PSCA e moléculas de DNA ou RNA recombinantes contendo um polinucleotídeo de PSCA.

[000210] O perfil de expressão do PSCA torna a mesma um

marcador diagnóstico para doença local e/ou metastatizada e proporciona informação sobre o crescimento ou potencial oncogênico de uma amostra biológica. Em particular, o estado de PSCA proporciona informação útil para prever a suscetibilidade a estágios doentes em particular, progressão e/ou agressividade do tumor. A invenção proporciona métodos e ensaios para determinação do estado de PSCA e diagnóstico de cânceres que expressam PSCA, tais como cânceres dos tecidos listados na Tabela I. Por exemplo, em virtude do fato de o mRNA de PSCA ser altamente expresso em câncer de próstata e outros com relação ao tecido de próstata normal, ensaios que avaliam os níveis de transcritos de mRNA ou proteínas de PSCA em uma amostra biológica podem ser usados para diagnosticar uma doença associada à desregulação de PSCA e podem proporcionar informação prognóstica útil na definição de opções terapêuticas apropriadas.

[000211] O estado de expressão de PSCA proporciona informação, incluindo a presença, estágio e localização de células displásicas, pré-cancerígenas e cancerígenas, previsão da suscetibilidade a vários estágios da doença e/ou para medir a agressividade do tumor. Além disso, o perfil de expressão a torna útil como um reagente de formação de imagem para doença metastatizada. Conseqüentemente, um aspecto da invenção é dirigido a vários métodos prognósticos e diagnósticos moleculares para examinar o estado de PSCA em amostras biológicas, tais como aquelas de indivíduos sofrendo de ou que se suspeita sofrer de uma patologia caracterizada por crescimento celular desregulado, tal como câncer.

[000212] Conforme descrito acima, o estado de PSCA em uma amostra biológica pode ser examinado através de uma série de procedimentos bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, o estado de PSCA em uma amostra biológica tomada de um local específico no

corpo pode ser examinado através de avaliação da amostra com relação à presença ou ausência de células expressando PSCA (por exemplo, aquelas que expressam mRNAs ou proteínas de PSCA). Esse exame pode proporcionar evidência de crescimento celular desregulado, por exemplo, quando células que expressam PSCA são encontradas em uma amostra biológica que normalmente não contém tais células (tais como nódulos linfáticos), em virtude do fato de tais alterações no estado de PSCA em uma amostra biológica estarem, freqüentemente, associada ao crescimento celular desregulado. Especificamente, um indicador de crescimento celular desregulado é a metástase de células cancerígenas de um órgão de origem (tal como próstata) para uma área diferente do corpo (tal como um nódulo linfático). Nesse contexto, evidência de crescimento celular desregulado é importante, por exemplo, porque metástases ocultas em nódulos linfáticos podem ser detectadas em uma proporção substancial de pacientes com câncer de próstata e tais metástases estão associadas a agentes prognósticos conhecidos de progressão da doença (veja, por exemplo, Murphy *et al.*, Prostate 42(4): 315-317 (2000); Su *et al.*, Semin. Surg. Oncol. 18(1): 17-28 (2000) e Isentosman *et al.*, J Urol, Agosto de 1995, 154(2 Pt 1): 474-8).

[000213] Em um aspecto, a invenção proporciona métodos para monitoramento de produtos genéticos de PSCA através de determinação do estado de expressão produtos genéticos de PSCA por células de um indivíduo que se suspeita ter uma doença associada ao crescimento celular desregulado (tal como hiperplasia ou câncer) e, então, comparação do estado assim determinado com o estado de produtos genéticos de PSCA em uma amostra normal correspondente. A presença de produtos genéticos de PSCA anormais na amostra de teste com relação à amostra normal proporciona uma indicação da presença de crescimento celular desregulado dentro das células do

indivíduo.

[000214] Em outro aspecto, a invenção proporciona ensaios úteis na determinação da presença de câncer em um indivíduo compreendendo detecção de um aumento significativo no mRNA ou expressão de proteína de PSCA em uma amostra de célula ou tecido de teste com relação aos níveis de expressão na célula ou tecido normal correspondente. A presença de mRNA de PSCA pode, por exemplo, ser avaliada em tecidos incluindo, mas não limitado, aqueles listados na Tabela I. A presença de expressão de PSCA significativa em qualquer um desses tecidos é útil para indicar a emergência, presença e/ou gravidade de um câncer, uma vez que os tecidos normais correspondentes não expressam mRNA de PSCA ou o expressam em menores níveis.

[000215] Em uma modalidade relacionada, o estado de PSCA é determinado ao nível de proteína ao invés de a nível de ácido nucléico. Por exemplo, tal método compreende determinação do nível de expressão de proteína de PSCA por células em uma amostra de tecido de teste e comparação do nível assim determinado com o nível de expressão de PSCA em uma amostra normal correspondente. Em uma modalidade, a presença de proteína de PSCA é avaliada, por exemplo, usando métodos imunoistoquímicos. Anticorpos de PSCA ou parceiros de ligação capazes de detecção da expressão de proteína de PSCA são usados em uma variedade de formatos de ensaio bem-conhecidos na técnica para essa finalidade.

[000216] Em uma outra modalidade, pode-se avaliar o estado de seqüências de nucleotídeo e aminoácido de PSCA em um amostra biológica de forma a identificar perturbações na estrutura dessas moléculas. Essas perturbações podem incluir inserções, deleções, substituições e similares. Tais avaliações são úteis porque perturbações nas seqüências de nucleotídeo e aminoácido são observadas em um

grande número de proteínas associadas ao fenótipo de crescimento desregulado (veja, por exemplo, Marrogi *et al.*, 1999, J. Cutan. Pathol. 26(8): 369-378). Por exemplo, uma mutação na seqüência de PSCA pode ser indicativa da presença ou promoção de um tumor. Tais ensaios, portanto, têm valor diagnóstico e prognóstico onde uma mutação na PSCA indica uma perda potencial de função ou aumento no crescimento do tumor.

[000217] Uma ampla variedade de ensaios para observar perturbações em seqüências de nucleotídeo e aminoácidos são bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, o tamanho e estrutura de seqüências de ácido nucléico ou aminoácido de produtos genéticos de PSCA são observados através de protocolos de Northern, Southern, Western, PCR e seqüenciamento de DNA discutidos acima. Além disso, outros métodos para observar perturbações em seqüências de nucleotídeo e aminoácido, tal como análise de polimorfismo conformacional em fita simples, são bem-conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Patentes U.S. Nºs 5.382.510 emitida em 7 de Setembro de 1999 e 5.952.170 emitida em 17 de Janeiro de 1995).

[000218] Adicionalmente, pode-se examinar o estado de metilação de um gene de PSCA em uma amostra biológica. Desmetilação e/ou hipermetilação anormal das ilhas de CpG em regiões regulatórias 5' do gene freqüentemente ocorrem em células imortalizadas e transformadas e podem resultar em expressão alterada de vários genes. Por exemplo, hipermetilação por promotor da glutathione 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 genômica mais freqüentemente 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 intraepitelial prostática de alto grau (PIN) (Brooks *et al.*, Câncer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7: 531-536). Em outro exemplo, a expressão do gene tumor-específico LAGE-I (o qual não é expresso em próstata normal, mas é expresso em 25-50% dos cânceres de próstata) é induzida através de deóxi-azacitidina em células linfoblastóides, sugerindo que a expressão tumorigênica é em virtude de desmetilação (Lethe *et al.*, Int. J. Câncer 76(6): 903-908 (1998)). Uma variedade de ensaios para examinar o estado de metilação de um gene são bem-conhecidos na técnica. Por exemplo, pode-se utilizar abordagens de hibridização de Southern, enzimas de restrição metilação-sensíveis que não podem clivar seqüências que contêm sítios de CpG metilados para avaliar o estado de metilação de ilhas de CpG. Além disso, MSP (PCR metilação-específica) pode fazer rapidamente um perfil do estado de metilação de todos os sítios de CpG presentes em uma ilha de CpG de um determinado gene. Esse procedimento envolve modificação inicial de DNA através de bissulfato de sódio (o qual converterá todas as citosinas não metiladas em uracila), seguido por amplificação usando iniciadores específicos para DNA metilado versus não metilado. Protocolos envolvendo interferência na metilação também podem ser encontrados, por exemplo, em Current Protocols in Molecular Biology, Unidade 12, Frederick M. Ausubel *et al* eds., 1995.

[000219] Amplificação de gene é outro método para avaliar o estado de PSCA. Amplificação de gene é medida em uma amostra diretamente, por exemplo, através de Southern blotting ou Northern blotting convencional, para quantificar a transcrição de mRNA (Thomas, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201 5205), dot blotting (análise de DNA) ou hibridização *in situ*, usando uma sonda apropriadamente ligada, baseado nas seqüências proporcionadas aqui. Alternativamente, anticorpos são empregados os quais

reconhecem duplas específicas, incluindo duplas de DNA, duplas de RNA e duplas híbridas de DNA/RNA ou duplas de proteína de DNA. Os anticorpos, por sua vez, são ligados e o ensaio realizada 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.

[000220] Tecido que sofreu biópsia ou sangue periférico pode ser, convenientemente, ensaiado com relação à presença de células cancerígenas usando, por exemplo, Northern, dot blot ou análise por RT-PCR para detectar a expressão de PSCA. A presença de mRNA de PSCA amplificável por RT-PCR proporciona uma indicação da presença de câncer. Ensaio de RT-PCR são bem-conhecidos na técnica. Ensaio de detecção por RT-PCR para células tumorígenas em sangue periférico estão atualmente sendo avaliados para uso no diagnóstico e tratamento de uma série de tumores sólidos humanos. No campo de câncer de próstata, esses incluem ensaios de 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; Heston *et al.*, 1995, Clin. Chem. 41: 1687-1688).

[000221] Um outro aspecto da invenção é uma avaliação da suscetibilidade que um indivíduo tem de desenvolver câncer. Em uma modalidade, um método para prever a suscetibilidade ao câncer compreende detecção de mRNA de PSCA ou proteína de PSCA em uma amostra de tecido, sua presença indicando suscetibilidade ao câncer, pelo fato de que o grau de expressão de mRNA de PSCA se correlaciona com o grau de suscetibilidade. Em uma modalidade específica, a presença de PSCA em tecido de próstata ou outro é examinada, com a presença de PSCA na amostra fornecendo uma indicação de suscetibilidade ao câncer de próstata (ou a emergência ou existência de um tumor de próstata). Similarmente, pode-se avaliar

a integridade de seqüências de nucleotídeo e aminoácido de PSCA em uma 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 em produtos genéticos de PSCA na amostra é uma indicação de suscetibilidade ao câncer (ou da emergência ou existência de um tumor).

[000222] A invenção também compreende métodos para medir a agressividade do tumor. Em uma modalidade, um método para medir a agressividade de um tumor compreende determinação do nível de expressão mRNA de PSCA ou proteína de PSCA por células tumorígenas, comparação de tecido normal tomado do mesmo indivíduo ou uma amostra de referência de tecido normal, pelo que o grau de expressão de mRNA de PSCA ou proteína de PSCA na amostra de tumor com relação à amostra normal indica o grau de agressividade. Em uma modalidade específica, a agressividade de um tumor é avaliada através de determinação da extensão até a qual a PSCA é expressa em células tumorígenas, com maiores níveis de expressão indicando tumores mais agressivos. Outra modalidade é avaliação da integridade de seqüências de nucleotídeo e aminoácido de PSCA em uma 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.

[000223] Outra modalidade da invenção é dirigida a métodos para observar a progressão de uma malignidade em um indivíduo com o tempo. Em uma modalidade, métodos para observar a progressão de uma malignidade em um indivíduo com o tempo compreendem determinação do nível de mRNA de PSCA ou proteína de PSCA expresso por células em uma amostra do tumor, comparação do nível

assim determinado com o nível de mRNA de PSCA ou proteína de PSCA expresso em uma amostra de tecido equivalente tomada do mesmo indivíduo em um momento diferente, em que o grau de mRNA de PSCA ou expressão de proteína de PSCA na amostra de tumor com o tempo proporciona informação sobre a progressão do câncer. Em uma modalidade específica, a progressão de um câncer é avaliada determinando-se a expressão de PSCA em células tumorígenas com o tempo, onde expressão aumentada com o tempo indica uma progressão do câncer. Também, pode-se avaliar a integridade de seqüências de nucleotídeo e aminoácido de PSCA em uma 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 câncer.

[000224] 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 modalidade da invenção é dirigida a métodos para observar uma coincidência entre a expressão do gene de PSCA e produtos genéticos de PSCA (ou perturbações no gene de PSCA e produtos genéticos de PSCA) e um fator que está associado à malignidade, como um meio para diagnosticar e prognosticar o estado de uma amostra de tecido. Uma ampla variedade de fatores associados à malignidade podem ser utilizados, tais como a expressão de genes associados à malignidade (por exemplo, expressão de PSA, PSCA e PSM para câncer de próstata, etc.), bem como observações citológicas a grosso (veja, 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 observar uma coincidência entre a expressão de

um gene de PSCA e produtos genéticos de PSCA (ou perturbações no gene de PSCA ou produtos genéticos de PSCA) e outro fator que está associado à malignidade são úteis, por exemplo, porque a presença de um conjunto de fatores específicos que coincide com a doença proporciona informação crucial para diagnóstico e prognóstico do estado de uma amostra de tecido.

[000225] Em uma modalidade, métodos para observar uma coincidência entre a expressão de um gene de PSCA e produtos genéticos de PSCA (ou perturbações no gene de PSCA ou produtos genéticos de PSCA) e outro fator associado à malignidade requerem detecção da superexpressão de mRNA ou proteína de PSCA em uma amostra de tecido, detecção da superexpressão de mRNA ou proteína PSA em uma amostra de tecido (ou expressão de PSCA ou PSM) e observação de uma coincidência de superexpressão de mRNA ou proteína de PSCA e mRNA ou proteína PSA (ou expressão de PSCA ou PSM). Em uma modalidade específica, a expressão de mRNA de PSCA e PSA em tecido de próstata é examinada, onde a coincidência de superexpressão de mRNA de PSCA e PSA na amostra indica a existência de câncer de próstata, suscetibilidade ao câncer de próstata ou a emergência ou estado de um tumor de próstata.

[000226] Métodos para a detecção e quantificação da expressão de mRNA ou proteína de PSCA são descritos aqui e tecnologias padrões de detecção e quantificação de ácido nucléico e proteína são bem-conhecidas na técnica. Métodos padrão para a detecção e quantificação de mRNA de PSCA incluem hibridização *in situ* usando ribo-sondas de PSCA ligadas, Northern blot e técnicas relacionadas usando sondas de polinucleotídeo de PSCA, análise por RT-PCR usando iniciadores específicos para PSCA e outros métodos de detecção do tipo amplificação tais como, por exemplo, DNA ramificado, SISBA, TMA e similares. Em uma modalidade específica,

RT-PCR semi-quantitativa é usada para detectar e quantificar expressão de mRNA de PSCA. Qualquer um de uma série de iniciadores capazes de amplificar a PSCA pode ser usado para essa finalidade incluindo, mas não limitado, aos vários conjuntos de iniciadores especificamente descritos aqui. Em uma modalidade específica, anticorpos monoclonais ou policlonais especificamente reativos com a proteína de PSCA do tipo silvestre podem ser usados como um ensaio imunoistoquímico do tecido que sofreu biópsia.

IX.) Identificação de Moléculas Que Interagem Com PSCA

[000227] Uma proteína de PSCA e seqüências de ácido nucléico descritas aqui permitem que aqueles versados na técnica identifiquem proteínas, pequenas moléculas e outros agentes que interagem com PSCA, bem como vias ativadas pela PSCA através de qualquer um de uma variedade de protocolos aceitos na técnica. Por exemplo, pode-se utilizar um dos assim denominados sistemas de contenção de interação (também referidos como o "ensaio com dois híbridos"). Em tais sistemas, moléculas interagem e reconstituem um fator de transcrição o qual direciona a expressão de um gene repórter, quando do que a expressão do gene repórter é ensaiada. Outros sistemas identificam interações proteína-proteína *in vivo* através de reconstituição de um ativador transcricional eucariota. Veja, por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 5.955.280 emitida em 21 de Setembro de 1999, 5.925.523 emitida em 20 de Julho de 1999, 5.846.722 emitida em 8 de Dezembro de 1998 e 6.004.746 emitida em 21 de Dezembro de 1999. Algoritmos também estão disponíveis na técnica para previsões genoma-baseadas de função de proteínas (veja, por exemplo, Marcotte *et al.*, Nature 402: 4 de Novembro de 1999, 83-86).

[000228] Alternativamente, pode-se selecionar bibliotecas de peptídeo para identificar moléculas que interagem com seqüências de proteína de PSCA. Em tais métodos, peptídeos que se ligam à PSCA

são identificados através de seleção de bibliotecas que codificam uma coleção aleatória ou controlada de aminoácidos. Peptídeos codificados pelas bibliotecas são expressos como proteínas de fusão de proteínas do envoltório de bacteriófagos, os artigos de bacteriófago são, então, selecionados contra uma proteína de PSCA.

[000229] Conseqüentemente, peptídeos tendo uma ampla variedade de usos, tais como reagentes terapêuticos, prognósticos ou diagnósticos, são assim identificados sem qualquer informação prévia sobre a estrutura da molécula do ligante ou receptor esperada. Bibliotecas de peptídeo típicas e métodos de seleção que podem ser usados para identificar moléculas que interagem com seqüências da proteína de PSCA são descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. Nºs 5.723.286 emitida em 3 de Março de 1998 e 5.733.731 emitida em 31 de Março de 1998.

[000230] Alternativamente, linhagens de células que expressam PSCA são usadas para identificar interações proteína-proteína mediada pela PSCA. Tais interações podem ser examinadas usando técnicas de imunoprecipitação (veja, por exemplo, Hamilton B.J. *et al*/ Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261: 646-51). A proteína de PSCA pode ser imunoprecipitada de linhagens de células expressando PSCA usando antianticorpos de PSCA. Alternativamente, anticorpos contra His-expressão podem ser usados em uma linhagem de células manipulada para expressar fusões de PSCA e uma His-expressão (vetores mencionados acima). O complexo imunoprecipitado pode ser examinado com relação à associação da proteína através de procedimentos tais como Western blotting, rotulação com ³⁵S-metionina de proteínas, micro-seqüenciamento de proteína, coloração com prata e eletroforese em gel bidimensional.

[000231] Pequenas moléculas e ligantes que interagem com PSCA podem ser identificados através de modalidades relacionadas de tais

ensaios de seleção. Por exemplo, pequenas moléculas podem ser identificadas as quais interferem com a função da proteína, incluindo moléculas que interferem com a capacidade do PSCA de mediar a fosforilação e desfosforilação, interação com moléculas de DNA ou RNA como uma indicação de regulação de ciclos celulares, sinalização de mensageiro secundário ou tumorigênese. Similarmente, pequenas moléculas que modulam o canal de íons PSCA-relacionado bomba de proteína ou funções de comunicação celular são identificadas e usadas para tratar pacientes que têm um câncer que expressa PSCA (veja, por exemplo, Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes* 2ª Ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992). Além disso, ligantes que regulam a função do PSCA podem ser identificados baseado em sua capacidade de se ligar à PSCA e ativar uma estrutura repórter. Métodos típicos são discutidos, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.928.868 emitida em 27 de Julho de 1999 e incluem métodos para formação de ligantes híbridos nos quais pelo menos um ligante é uma pequena molécula. Em uma modalidade ilustrativa, células manipuladas para expressar uma proteína de fusão de PSCA e uma proteína de DNA-ligação são usadas para co-expressar uma proteína de fusão de um ligante híbrido/pequena molécula e uma proteína ativadora de transcrição de uma biblioteca de cDNA. As células ainda contêm um gene repórter, a expressão do qual está condicionada à proximidade das primeira e segunda proteínas de fusão uma com a outra, um evento que ocorre somente se o ligante híbrido se liga aos sítios alvo sobre ambas as proteínas híbridas. Aquelas células que expressam o gene repórter são selecionadas e pequenas moléculas desconhecidas ou o ligante desconhecido é identificado. Esse método proporciona um meio de identificação de moduladores os quais ativam ou inibem a PSCA.

[000232] Uma modalidade da presente invenção compreende um

método de seleção de uma molécula que interage com uma seqüência de aminoácidos de PSCA mostrada na Figura 1 compreendendo as etapas de contato de uma população de moléculas com uma seqüência de aminoácidos de PSCA, permitir que a população de moléculas e a seqüência de aminoácidos de PSCA interajam sob condições que facilitam uma interação, então, separação das moléculas que não interagem com a seqüência de aminoácidos de PSCA de moléculas que interagem. Em uma modalidade específica, o método ainda compreende purificação, caracterização e identificação de uma molécula que interage com a seqüência de aminoácidos de PSCA. A molécula identificada pode ser usada para modular a função realizada pela PSCA. Em uma modalidade preferida, a seqüência de aminoácidos de PSCA é contatada com uma biblioteca de peptídeos.

X.) Métodos e Composições Terapêuticas

[000233] A identificação de PSCA como uma proteína que normalmente é expressa em um conjunto restrito de tecidos, mas a qual é também expressa em cânceres tais como aqueles listados na Tabela I, abre uma série de abordagens terapêuticas para o tratamento de tais cânceres.

[000234] De nota, terapias antitumor objetivadas têm sido úteis mesmo quando a proteína objetivada é expressa sobre tecidos normais, mesmo em tecidos de órgãos vitais normais. Um órgão vital é aquele necessário para sustentar a vida, tal como o coração ou cólon. Um órgão não-vital é aquele que pode ser removido, quando do que o indivíduo ainda é capaz de sobreviver. Exemplos de órgãos não-vitais são ovário, mama e próstata.

[000235] Por exemplo, Herceptin® é um produto farmacêutico aprovado pela FDA que consiste em um anticorpo o qual é imuno-reativo com uma proteína variadamente conhecida como HER2, HER2/neu e erb-b-2. Ele é comercializado pela Genentech e tem sido

um agente antitumor de sucesso comercial. As vendas do Herceptin® atingiram quase \$400 milhões em 2002. O Herceptin® é o tratamento para câncer de mama metastático HER2-positivo. Contudo, a expressão de HER2 não está limitada a tais tumores. A mesma proteína é expressa em uma série de tecidos normais. Em particular, sabe-se que a HER2/neu está presente em rim e coração normais, assim, esses tecidos estão presentes em todos os recipientes humanos do Herceptin®. A presença de HER2/neu em rim normal é também confirmada por Latif, Z. *et al.*, B.J.U. International (2002) 89: 5-9. Conforme mostrado nesse artigo (o qual avaliou se o carcinoma de células renais seria uma indicação preferida para anticorpos anti-HER2, tal como Herceptin®), proteína e mRNA são produzidos em tecidos renais benignos. Notavelmente, a proteína HER2/neu foi fortemente expressa em tecido renal benigno.

[000236] Apesar do fato de que a HER2/neu é expressa em tecidos vitais tais como coração e rim, o Herceptin® é uma droga muito útil aprovada pela FDA e de sucesso comercial. O efeito do Herceptin® sobre o tecido cardíaco, isto é, "cardiotoxicidade", tem sido meramente um efeito colateral ao tratamento. Quando pacientes foram tratados com Herceptin® apenas, cardiotoxicidade significativa ocorre em um percentual muito baixo de pacientes. Para minimizar a cardiotoxicidade, existe um requisito de entrada mais rigoroso para o tratamento com HER2/neu. Fatores tal como predisposição à condição cardíaca são avaliados antes que o tratamento possa ocorrer.

[000237] De nota particular, embora o tecido do rim seja indicado como exibindo expressão normal, possivelmente mesmo expressão maior do que o tecido cardíaco, o rim não tem efeito colateral apreciável ao Herceptin® até o momento. Além disso, dos diversos conjuntos de tecidos normais nos quais a HER2 é expressa, há muito pouca ocorrência de qualquer efeito colateral. Apenas o tecido

cardíaco tem manifestado qualquer efeito colateral apreciável em geral. Um tecido tal como rim, onde a expressão de HER2/neu é especialmente notável, não tem sido a base de qualquer efeito colateral.

[000238] Além disso, efeitos terapêuticos favoráveis foram encontrados com terapias antitumor que objetivam o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); Erbitux (ImClone). EGFR também é expresso em numerosos tecidos normais. Existem poucos efeitos colaterais em tecidos normais após o uso de produtos terapêuticos anti-EGFR. Um efeito colateral geral que ocorre com o tratamento com EGFR é uma rachadura grave da pele observada em 100% dos pacientes que sofrem tratamento.

[000239] Assim, a expressão de uma proteína alvo em tecido normal, mesmo em tecido normal vital, não diminui a utilidade de um agente de objetivação para uma proteína como um produto terapêutico para determinados tumores nos quais uma proteína também é superexpressa. Por exemplo, expressão em órgãos vitais não é, em si, prejudicial. Além disso, órgãos considerados como dispensáveis, tais como a próstata e ovário, podem ser removidos sem afetar a mortalidade. Finalmente, alguns órgãos vitais não são afetados pela expressão em órgãos normais em virtude de um imunoprivilégio. Órgãos imunoprivilegiados são órgãos que são protegidos do sangue por uma barreira sangue-órgão e, assim, não são acessíveis à imunoterapia. Exemplos de órgãos imunoprivilegiados são o cérebro e testículo.

[000240] Conseqüentemente, abordagens terapêuticas que inibem a atividade de uma proteína de PSCA são úteis para pacientes sofrendo de um câncer que expressa PSCA. Essas abordagens terapêuticas geralmente falham em três classes. A primeira classe modula a função de PSCA, uma vez que ela se refere ao crescimento de células

tumorígenas, levando à inibição ou retardo do crescimento de células tumorígenas ou induzindo sua morte. A segunda classe compreende vários métodos para inibição da ligação ou associação de uma proteína de PSCA com seu parceiro de ligação ou com outras proteínas. A terceira classe compreende uma variedade de métodos para inibição da transcrição de um gene de PSCA ou tradução de mRNA de PSCA.

X.A.) Vacinas Anti-Câncer

[000241] A invenção proporciona vacinas anticâncer compreendendo uma proteína de PSCA-relacionada ou ácido nucléico PSCA-relacionado. Em vista da expressão de PSCA, vacinas contra o câncer impedem e/ou tratam cânceres que expressam PSCA com efeitos mínimos ou nenhum sobre tecidos não-alvo. O uso de um antígeno tumorígeno em uma vacina que gera respostas humorais célula-mediadas como terapia anti-câncer é bem-conhecido na técnica e tem sido empregado em câncer de próstata usando PSMA humano e imunogênios PAP de roedores (Hodge *et al.*, 1995, Int. J. Câncer 63: 231-237; Fong *et al.*, 1997, J. Immunol. 159: 3113-3117).

[000242] Tais métodos podem ser prontamente praticados empregando uma proteína de PSCA-relacionada ou uma molécula de ácido nucléico que codifica PSCA e vetores recombinantes capazes de expressar e apresentar o imunogênio PSCA (o qual, tipicamente, compreende uma série de epítomos de células T ou anticorpo). Aqueles versados na técnica compreenderão que uma ampla variedade de sistemas de vacina para a distribuição de epítomos imunorreativos são conhecidos na técnica (veja, por exemplo, Heryln *et al.*, Ann Med, Fevereiro de 1999, 31(1): 66-78; Maruyama *et al.*, Câncer Immunol Immunother, Junho de 2000, 49(3): 123-32). Resumidamente, tais métodos de geração de uma resposta imune (por exemplo, célula-mediada e/ou humoral) em um mamífero

compreendem as etapas de: exposição do sistema imune do mamífero a um epítopo imunorreativo (por exemplo, um epítopo presente em uma proteína de PSCA mostrada na Figura 1 ou análogo ou homólogo da mesma), de modo que o mamífero gera uma resposta imune que é específica para esse epítopo (por exemplo, gera anticorpos que reconhecem especificamente esse epítopo).

[000243] A proteína de PSCA inteira, regiões imunogênicas ou epítopos das mesmas podem ser combinados e distribuídos através de vários meios. Tais composições de vacina podem incluir, por exemplo, lipopeptídeos (por exemplo, Vitiello, A. *et al.*, J. Clin. Invest. 95: 341, 1995), composições de peptídeo encapsuladas em microesferas de (poli)DL-lactídeo-co-glicolídeo ("PLG") (veja, por exemplo Eldridge *et al.*, Molec. Immunol. 28: 287-294, 1991; Alonso *et al.*, Vaccine 12: 299-306, 1994; Jones *et al.*, Vaccine 13: 675-681, 1995), composições de peptídeo contidas em complexos de estimulação imune (ISCOMS) (veja, por exemplo, Takahashi *et al.*, Nature 344: 873-875, 1990; Hu *et al.*, Clin Exp Immunol. 113: 235-243, 1998), sistemas peptídicos de antígenos múltiplos (MAPs) (veja, por exemplo, Tam, J. P., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85: 5409-5413, 1988; Tam, J.P., J. Immunol. Métodos 196: 17-32, 1996), peptídeos formulados como peptídeos multivalentes; peptídeos para uso em sistemas de distribuição balística, tipicamente peptídeos cristalizados, vetores de distribuição viral (Perkus, M. E. *et al.*, Em: Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E. ed., página 379, 1996; Chakrabarti, S. *et al.*, Nature 320: 535, 1986; Hu, S. L. *et al.*, Nature 320: 537, 1986; Kieny, M.-P. *et al.*, AIDS Bio/Technology 4: 790, 1986; Top, F. H. *et al.*, J. Infect. Dis. 124: 148, 1971; Chanda, P. K. *et al.*, Virology 175: 535, 1990), artigos de origem viral ou sintética (por exemplo, Kofler, N. *et al.*, J. Immunol. Methods 192: 25, 1996; Eldridge, J. H. *et al.*, Sem. Hematol. 30: 16, 1993; Falo, L. D., Jr. *et al.*,

Nature Med. 7: 649, 1995), adjuvantes (Warren, H. S., Vogel, F. R. e Chedid, L. A. Annu. Rev. Immunol. 4: 369, 1986; Gupta, R. K. *et al.*, Vaccine 11: 293, 1993), lipossomas (Reddy, R. *et al.*, J. Immunol. 148: 1585, 1992; Rock, K. L., Immunol. Today 17: 131, 1996) ou cDNA nu ou absorvido em partículas (Ulmer, J. B. *et al.*, Science 259: 1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A. e Webster, R. G., Vaccine 11: 957, 1993; Shiver, J. W. *et al.*, Em: Concepts in vaccine development, Kaufmann, S. H. E. ed., página 423, 1996; Cease, K. B. e Berzofsky, J. A., Annu. Rev. Immunol. 12: 923, 1994 e Eldridge, J. H. *et al.*, Sem. Hematol. 30: 16, 1993). Tecnologia de distribuição toxina-objetivada, também conhecida como objetivação receptor-mediada, tal como aquela da Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts) também pode ser usada.

[000244] Em pacientes com câncer PSCA-associado, as composições de vacina da invenção também podem ser usadas em conjunto com outros tratamentos usados para câncer, por exemplo, cirurgia, quimioterapia, terapias com drogas, terapias de radiação, etc., incluindo uso em combinação com adjuvantes imunes, tais como IL-2, IL-12, GM-CSF e similares.

Vacinas Celulares:

[000245] Epítomos de CTL podem ser determinados usando algoritmos específicos para identificar peptídeos dentro das proteínas de PSCA que se ligam correspondendo a alelos do HLA (veja, por exemplo, Tabela IV; Epimer[®] e Epimatrix[®], Brown University (URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); e, BIMAS, (URL bimas.dcrt.nih.gov/; SYFPEITHI at URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/). Em uma modalidade preferida, um imunogênio PSCA contém uma ou mais seqüências de aminoácido identificadas usando métodos bem-conhecidos na técnica, tais como as seqüências mostradas nas Tabelas V-XVIII e XXII-LI ou um peptídeo de 8, 9, 10

ou 11 aminoácidos especificado por um motivo/supermotivo da Classe I do HLA (por exemplo, Tabela IV (A), Tabela IV (D) ou Tabela IV (E)) e/ou um peptídeo de pelo menos 9 aminoácidos que compreende motivo/supermotivo da Classe II do HLA (por exemplo, Tabela IV (B) ou Tabela IV (C)). Conforme é apreciado na técnica, a ranhura de ligação da Classe I do HLA é essencialmente fechada terminalmente, de modo que apenas peptídeos de um tamanho particular podem se adaptar na ranhura e serem ligados; geralmente, epítomos da Classe I do HLA têm 8, 9, 10 ou 11 aminoácidos de comprimento. Em contraste, a ranhura de ligação da Classe II do HLA é essencialmente aberta terminalmente; portanto, um peptídeo de cerca de 9 ou mais aminoácidos pode ser ligado através de uma molécula da Classe II do HLA. Em virtude das diferenças na ranhura de ligação entre as Classes I e II do HLA, motivos da Classe I do HLA têm um comprimento específico, isto é, a posição dois de um motivo da Classe I é o segundo aminoácido em uma direção amino para carboxila do peptídeo. As posições de aminoácido em um motivo da Classe II são relativas apenas umas com relação às outras, não ao peptídeo em geral, isto é, aminoácidos adicionais podem ser presos ao amino e/ou carbóxi-término de uma seqüência trazendo motivo. Epítomos da Classe II do HLA têm, freqüentemente, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 ou 25 aminoácidos de comprimento ou mais do que 25 aminoácidos.

[000246] Uma ampla variedade de métodos para a geração de uma resposta imune em um mamífero são conhecidos na técnica (por exemplo, como a primeira etapa na geração de hibridomas). Métodos de geração de uma resposta imune em um mamífero compreendem exposição do sistema imune do mamífero a um epítopo imunogênico sobre uma proteína (por exemplo, uma proteína de PSCA) de modo que uma resposta imune é gerada. Uma modalidade típica consiste

em um método para geração de uma resposta imune à PSCA em um hospedeiro, através de contato do hospedeiro com uma quantidade suficiente de pelo menos um epítipo de célula T citotóxica ou célula B de PSCA ou análogo do mesmo; e pelo menos um intervalo periódico, após o que, recontato do hospedeiro com o epítipo de célula T citotóxica ou célula B de PSCA ou análogo do mesmo. Uma modalidade específica consiste em um método de geração de uma resposta imune contra uma proteína de PSCA-relacionada ou um peptídeo multiepitópico feito pelo homem compreendendo: administração de imunogênio PSCA (por exemplo, uma proteína de PSCA ou um fragmento peptídico da mesma, uma proteína de fusão de PSCA ou análogo, etc.) em um preparado de vacina a um ser humano ou outro mamífero. Tipicamente, tais preparados de vacina ainda contêm um adjuvante adequado (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 6.146.635) ou um epítipo auxiliar universal, tal como o peptídeo PADRETM (Epimmune Inc., San Diego, CA; veja, por exemplo, Alexander *et al.*, J. Immunol. 2000 164(3); 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, Immunity 1994 1(9): 751-761 e Alexander *et al.*, Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92). Um método alternativo compreende geração de uma resposta imune em um indivíduo contra um imunogênio PSCA através de: administração, *in vivo* ao músculo ou pele do corpo do indivíduo, de uma molécula de DNA que compreende uma seqüência de DNA que codifica um imunogênio PSCA, a seqüência de DNA operativamente ligada a seqüências regulatórias as quais controlam a expressão da seqüência de DNA; em que a resposta imune é gerada contra o imunogênio (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.962.428). Opcionalmente, um facilitador de vacina genética, tal como lipídios aniônicos; saponinas; lecitinas; compostos estrogênicos; alquilas inferiores hidroxiladas; sulfóxido de dimetila; e uréia também é administrado. Além disso, um anticorpo antiidiotípico

pode ser administrado, o qual imita a PSCA, de forma a gerar uma resposta ao antígeno alvo.

Vacinas de Ácido nucléico:

[000247] Composições de vacina da invenção incluem modalidades mediadas por ácido nucléico. RNA ou DNA que codifica a(s) proteína(s) da invenção pode ser administrado a um paciente. Métodos de imunização genética podem ser empregados para gerar respostas humorais profiláticas e terapêuticas e respostas imunes celulares dirigidas contra células cancerígenas expressando PSCA. Estruturas compreendendo DNA que codifica uma proteína de PSCA-relacionada/imunogênio e seqüências regulatórias apropriadas podem ser injetadas diretamente no músculo ou pele de um indivíduo, de modo que as células do músculo ou pele captem a estrutura e expressem a proteína de PSCA/imunogênio codificado. Alternativamente, a vacina compreende uma proteína de PSCA-relacionada. Expressão do imunogênio proteína de PSCA-relacionada resulta na geração de imunidade celular e humores terapêutica ou profilática contra células que trazem uma proteína de PSCA. Vários métodos de imunização genética profilática e terapêutica conhecidos na técnica podem ser usados (para revisão, veja informação e referencias publicadas no endereço da Internet genweb.com). Distribuição baseada em ácido nucléico é descrita, por exemplo, em Wolff *et al.*, Science 247: 1465 (1990), bem como nas Patentes U.S. N^{os} 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; WO 98/04720.

Exemplos de tecnologias de distribuição baseadas em DNA incluem "DNA nu", distribuição facilitada (bipivicaína, polímeros, peptídeo-mediada), complexos de lipídios catiônicos e distribuição partícula-mediada ("pistola de gene") ou pressão-mediada (veja, por exemplo, Patente U.S. N^o 5.922.687).

[000248] Para fins de imunização terapêutica ou profilática, as proteínas da invenção podem ser expressas via vetores virais ou bacterianos. Sistemas de distribuição de gene virais que podem ser usados na prática da invenção incluem, mas não estão limitados a, vaccinia, varíola, canaripox, adenovírus, influenza, poliovírus, vírus adeno-associado, lentivírus e vírus sindbis (veja, por exemplo, Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663; Tsang *et al* J. Natl. Câncer Inst. 87: 982-990 (1995)). Sistemas de distribuição não-virais também podem ser empregados através de introdução de DNA nu que codifica uma proteína de PSCA-relacionada no paciente (por exemplo, intramuscularmente ou intradermicamente) para induzir a uma resposta antitumor.

[000249] O vírus da vaccinia é usado, por exemplo, como um vetor para expressar as seqüências de nucleotídeo que codificam os peptídeos da invenção. Quando de introdução em um hospedeiro, o vírus da vaccinia recombinante expressa um peptídeo imunogênico da proteína e, desse modo, estimula a uma resposta imune do hospedeiro. Vetores de vaccinia e métodos úteis em protocolos de imunização são descritos, por exemplo, na Patente U.S. Nº 4.722.848. Outro vetor é BCG (Bacille Calmette Guerin). Vetores de BCG são descritos em Stover *et al.*, Nature 351: 456-460 (1991). Uma ampla variedade de outros vetores úteis para administração ou imunização terapêutica dos peptídeos da invenção, por exemplo, vetores adeno- e adenovírus-associados, vetores retrovirais, vetores de *Salmonella typhi*, vetores da toxina de antrax destoxificada e similares, serão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição aqui.

[000250] Assim, sistemas de distribuição de gene são usados para distribuir uma molécula de ácido nucléico PSCA-relacionada. Em uma modalidade, o cDNA de PSCA humana de comprimento total é empregado. Em outra modalidade, as moléculas de PSCA de ácido

nucléico que codificam linfócitos T citotóxicos específicos (CTL) e/ou epítopos de anticorpo são empregados.

Vacinas *Ex vivo*

[000251] Várias estratégias *ex vivo* também podem ser empregados para gerar uma resposta imune. Uma abordagem envolve o uso de células apresentando antígeno (APCs), tais como células dendríticas (DC) para apresentar antígeno de PSCA ao sistema imune de um paciente. Células dendríticas expressam moléculas das Classes I e II do MHC, o co-estimulador B7 e IL-2 e são, assim, células apresentam antígeno altamente especializadas. Em câncer de próstata, células dendríticas autólogas pulsadas com peptídeos do antígeno da membrana próstata (PSMA) estão sendo usadas em um experimento clínico com I Fase para estimular o sistema imune de pacientes com câncer de próstata (Tjoa *et al.*, 1996, Prostate 28: 65-69; Murphy *et al.*, 1996, Prostate 29: 371-380). Assim, células dendríticas podem ser usadas para apresentar peptídeos de PSCA a células T no contexto de moléculas das classes I ou II do MHC. Em uma modalidade, células dendríticas autólogas são pulsadas com peptídeos de PSCA capazes de ligação a moléculas da classe I e/ou da classe II do MHC. Em outra modalidade, células dendríticas são pulsadas com a proteína de PSCA completa. Ainda outra modalidade envolve a manipulação da superexpressão de um gene de PSCA em células dendríticas usando vários vetores de implementação conhecidos na técnica, tais como adenovírus (Arthur *et al.*, 1997, Câncer Gene Ther. 4: 17-25), retrovírus (Henderson *et al.*, 1996, Câncer Res. 56: 3763-3770), lentivírus, vírus adeno-associado, transfecção de DNA (Ribas *et al.*, 1997, Câncer Res. 57: 2865-2869) ou transfecção com RNA tumor-derivado (Ashley *et al.*, 1997, J. Exp. Med. 186: 1177-1182). Células que expressam PSCA também podem ser manipuladas para expressar moduladores imunes, tal como GM-CSF, e usadas como

agentes de imunização.

X.B.) PSCA Como um Alvo para Terapia Anticorpo-Baseada

[000252] PSCA é um alvo atraente para estratégias terapêuticas anticorpo-baseadas. Uma série de estratégias com anticorpo são conhecidas na técnica para objetivação de moléculas extracelulares e intracelulares (veja, por exemplo, morte mediada por complemento e ADCC, bem como o uso de intracorporos). Em virtude do fato de a PSCA ser expressa por células cancerígenas de várias linhagens com relação às células normais correspondentes, a administração sistêmica de composições imunorreativas com a PSCA são preparadas, as quais exibem sensibilidade excelente sem efeitos tóxicos, não-específicos e/ou não-objetivados causados pela ligação da composição imunorreativa a órgãos e tecidos não-alvo. Anticorpos especificamente reativos com domínios de PSCA são úteis para tratar cânceres expressando PSCA sistemicamente, quer como conjugados com uma toxina ou agente terapêutico ou como anticorpos nus capazes de inibir a proliferação ou função celular.

[000253] Anticorpos de PSCA podem ser introduzidos em um paciente de modo que o anticorpo se liga à PSCA e modula uma função, tal como uma interação com um parceiro de ligação e, conseqüentemente, media a destruição das células tumorígenas e/ou inibe o crescimento de células tumorígenas. Mecanismos pelos quais tais anticorpos exercem um efeito terapêutico resultante podem incluir citólise complemento-mediada, citotoxicidade células anticorpo-dependente, modulação da função fisiológica do PSCA, inibição da ligação a ligante ou vias de transdução de sinal, modulação de diferenciação da célula tumorígena, alteração dos perfis de fator de angiogênese do tumor e/ou apoptose. Exemplos incluem Rituxan® para Linfoma Não-Hodgkins, Herceptin® para câncer de mama metastático Erbitux® para câncer colorretal.

[000254] Aqueles versados na técnica compreenderão que anticorpos podem ser usados para objetivar e se ligar especificamente a moléculas imunogênicas, tal como uma região imunogênica de uma seqüência de PSCA mostrada na Figura 1. Além disso, aqueles habilitados compreenderão que é rotina conjugar anticorpos a agentes citotóxicos (veja, por exemplo, Slevers *et al* Blood 93: 11 3678-3684 (1 de Junho de 1999)). Quando agentes citotóxicos e/ou terapêuticos são distribuídos diretamente às células, tal como através de conjugação dos mesmos a anticorpos específicos para uma molécula expressa por essa célula (por exemplo, PSCA), o agente citotóxico exercerá seu efeito biológico conhecido (isto é, citotoxicidade) sobre essa célula.

[000255] Uma ampla variedade de composições e métodos para uso de conjugados de agente citotóxico-anticorpo para matar células são conhecidos na técnica. No contexto de cânceres, métodos típicos requerem a administração, a um animal tendo um tumor, de uma quantidade biologicamente eficaz de um conjugado compreendendo um agente citotóxico e/ou terapêutico selecionado ligado a um agente alvo (por exemplo, um antianticorpo de PSCA) que se liga a um marcador (por exemplo, PSCA) expresso, acessível à ligação ou localizado sobre as superfícies celulares. Uma modalidade típica é um método de distribuição de um agente citotóxico e/ou terapêutico a uma célula expressando PSCA compreendendo conjugação do agente citotóxico a um anticorpo que se liga especificamente a um epítipo de PSCA e exposição da célula ao conjugado de anticorpo-agente. Outra modalidade ilustrativa é um método de tratamento de um indivíduo que se suspeita estar sofrendo de um câncer metastatizado compreendendo uma etapa de administração parenteral, ao referido indivíduo, de uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz resultante de um anticorpo conjugado a um agente citotóxico e/ou terapêutico.

[000256] Imunoterapia do câncer usando antianticorpos de PSCA pode ser feita de acordo com várias abordagens que têm sido usadas com sucesso no tratamento de outros tipos de câncer incluindo, mas não limitado a, câncer de cólon (Arlen *et al.*, 1998, Crit. Rev. Immunol. 18: 133-138), mieloma múltiplo (Ozaki *et al.*, 1997, Blood 90: 3179-3186, Tsunenari *et al.*, 1997, Blood 90: 2437-2444), câncer gástrico (Kasprzyk *et al.*, 1992, Câncer Res. 52: 2771-2776), linfoma de células B (Funakoshi *et al.*, 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93-101), leucemia (Zhong *et al.*, 1996, Leuk. Res. 20: 581-589), câncer colorretal (Moun *et al.*, 1994, Câncer Res. 54: 6160-6166; Velders *et al.*, 1995, Câncer Res. 55:4398-4403) e câncer de mama (Shepard *et al.*, 1991, J. Clin. Immunol. 11: 117-127). Algumas abordagens terapêuticas envolvem conjugação de anticorpo nu a uma toxina ou radioisótopo, tal como a conjugação de Y⁹¹ ou I¹³¹ a anti-CD20 anticorpos (por exemplo, ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp. ou Bexxar[®], Coulter Pharmaceuticals), respectivamente, enquanto que outras envolvem a co-administração de anticorpos e outros agentes terapêuticos, tais como Herceptin[®] (TrastuzumAb) com paclitaxel (Genentech, Inc.). O anticorpos podem ser conjugados a um agente terapêutico. Para tratar câncer de próstata, por exemplo, anticorpos de PSCA podem ser administrados em conjunto com radiação, quimioterapia ou ablação hormonal. Também, anticorpos podem ser conjugados a uma toxina, tal como calicheamicina (por exemplo, Mylotarg[®], Wyeth-Ayerst, Madison, NJ, um anticorpo IgG₄ kappa recombinante humanizado conjugado ao antibiótico antitumor) ou um maytansinóide (por exemplo, Pró-droga Tumor-Ativada baseada em taxano, TAP, Platform, ImunoGen, Cambridge, MA; veja também, por exemplo, Patente US 5.416.064) ou Auristatina E (Nat Biotechnol., Julho de 2003; 21(7): 778-84, (Seattle Genetics)).

[000257] Embora a terapia com anticorpo de PSCA seja útil em todos

os estágios de câncer, a terapia com anticorpo pode ser particularmente apropriada em cânceres avançados ou metastáticos. O tratamento com a terapia com anticorpo da invenção é indicado para pacientes que receberam um ou mais ciclos de quimioterapia. Alternativamente, terapia com anticorpo da invenção é combinada com um produto quimioterapêutico ou regime de radiação para pacientes que não receberam tratamento quimioterapêutico. Adicionalmente, a terapia com anticorpo pode permitir o uso de dosagens reduzidas de quimioterapia concomitante, particularmente para pacientes que não toleram a toxicidade do agente quimioterapêutico muito bem. Fan *et al* (Câncer Res. 53: 4637-4642, 1993), Prewett *et al* (International J. of Onco. 9: 217-224, 1996) e Hancock *et al* (Câncer Res. 51: 4575-4580, 1991) descrevem o uso de vários anticorpos junto com agentes quimioterapêuticos.

[000258] Embora a terapia com anticorpo de PSCA seja útil em todos os estágios de câncer, a terapia com anticorpo pode ser particularmente apropriada em cânceres avançados ou metastáticos. O tratamento com a terapia com anticorpo da invenção é indicado para pacientes que receberam um ou mais ciclos de quimioterapia. Alternativamente, terapia com anticorpo da invenção é combinada com um produto quimioterapêutico ou regime de radiação para pacientes que não receberam tratamento quimioterapêutico. Adicionalmente, a terapia com anticorpo pode permitir o uso de dosagens reduzidas de quimioterapia concomitante, particularmente para pacientes que não toleram a toxicidade do agente quimioterapêutico muito bem.

[000259] Pacientes com câncer podem ser avaliados com relação à presença e nível de expressão de PSCA, de preferência usando avaliações imunoistoquímicas de tecido do tumor, formação de imagem quantitativa de PSCA ou outras técnicas que indicam confiavelmente a presença e grau de expressão de PSCA. Análise

imunoistoquímica de biópsias de tumor ou espécimes cirúrgicas é preferida para essa finalidade. Métodos para análise imunoistoquímica de tecidos de tumor são bem-conhecidos na técnica.

[000260] Anticorpos monoclonais anti-PSCA que tratam câncer de próstata e outros incluem aqueles que iniciam uma resposta imune potente contra o tumor ou aqueles que são diretamente citotóxicos. A esse respeito, anticorpos monoclonais (MAbs) anti-PSCA podem estimular a lise de células tumorígenas através de mecanismos de citotoxicidade celular complemento-dependente ou anticorpo-dependente (ADCC), ambos os quais requerem uma porção Fc intacta da molécula de imunoglobulina para interação com os sítios receptores de Fc em células efetadoras sobre as proteínas complementares; além disso, anti-MAbs de PSCA que exercem um efeito biológico direto sobre o crescimento do tumor são úteis para tratar cânceres que expressam PSCA. Mecanismos através dos quais os MAbs citotóxicos atuam diretamente incluem: inibição do crescimento celular, modulação da diferenciação celular, modulação dos perfis de fator de angiogênese de tumor e a indução de apoptose. O(s) mecanismo(s) através do(s) qual(is) um anti-MAb de PSCA exerce um efeito antitumor é(são) avaliado(s) usando qualquer um de uma série de ensaios *in vitro* que avaliam a morte celular, tais como ADCC, ADMMC, lise de células complemento-mediada e assim por diante, conforme é geralmente conhecido na técnica.

[000261] Em alguns pacientes, o uso de anticorpos monoclonais de murina ou outros não-humanos ou MAbs quiméricos de ser humano/camundongo pode induzir a respostas imunes moderadas a fortes contra o anticorpo não-humano. Isso pode resultar em eliminação do anticorpo de circulação e eficácia reduzida. Na maioria dos casos, tal resposta imune pode levar à formação extensiva de complexos imunes os quais, potencialmente, podem causar

insuficiência renal. Conseqüentemente, os anticorpos monoclonais preferidos usados nos métodos terapêuticos da invenção são aqueles que são totalmente humanos ou humanizados e que se ligam especificamente ao antígeno PSCA alvo com elevada afinidade, mas exibem baixa ou nenhuma antigenicidade no paciente.

[000262] Métodos terapêuticos da invenção consideram a administração de anti-MAbs de PSCA simples, bem como combinações ou coquetéis, de preferência de diferentes MAbs. Tais coquetéis de MAb podem ter determinadas vantagens, na medida em que eles contenham MAbs que objetivam diferentes epítomos, explorem diferentes mecanismos efetadores ou combinem diretamente MAbs citotóxicos com MAbs que contam com funcionalidade efetadora imune. Tais MAbs em combinação podem exibir efeitos terapêuticos sinérgico. Além disso, anti-MAbs de PSCA podem ser administrados concomitantemente com outras modalidades terapêuticas incluindo, mas não limitado a, vários agentes quimioterapêuticos, bloqueadores de androgênio, moduladores imunes (por exemplo, IL-2, GM-CSF), cirurgia ou radiação. Os anti-MAbs de PSCA são administrados em sua forma "nu" ou não conjugada ou podem ter um agente terapêutico conjugado aos mesmos.

[000263] Formulações de antianticorpo de PSCA são administradas através de qualquer via adequada capaz de distribuição dos anticorpos a uma célula tumorigena. Vias de administração incluem, mas não estão limitadas a, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumor, intradérmica e similares. O tratamento geralmente envolve administração repetida do preparado de antianticorpo de PSCA, através de uma via de administração aceitável, tal como injeção intravenosa (IV), tipicamente em uma dose na faixa de cerca de 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 ou 25 mg/kg de peso corporal. Em geral, doses na faixa de 10-1000 mg

de MAb por semana são eficazes e bem toleradas.

[000264] Baseado em experiência clínica com o MAb Herceptin® no tratamento de câncer de mama metastático, uma dose de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal do paciente IV, seguido por doses semanais de cerca de 2 mg/kg IV do preparado de anti-MAb de PSCA, representa um regime de dosagem aceitável. De preferência, a dose de carga inicial é administrada como uma infusão de 90 minutos ou mais. A dose de manutenção periódica é administrada como uma infusão de 30 minutos ou mais, contanto que a dose inicial tenha sido bem tolerada. Conforme apreciado por aqueles versados na técnica, vários fatores podem influenciar o regime de dose ideal em um caso em particular. Tais fatores incluem, por exemplo, a afinidade de ligação e meia-vida do Ab ou MAbs usados, o grau de expressão de PSCA no paciente, a extensão do antígeno de PSCA protegido em circulação, o nível de concentração de anticorpo em estado uniforme desejado, a frequência de tratamento e a influência do agente quimioterapêutico ou outros usados em combinação com o método de tratamento da invenção, bem como o estado de saúde de um paciente em particular.

[000265] Opcionalmente, os pacientes deverão ser avaliados com relação aos níveis de PSCA em uma determinada amostra (por exemplo, os níveis de antígeno PSCA em circulação e/ou células que expressam PSCA) de forma a auxiliar na determinação do regime de dosagem mais eficaz, etc. Tais avaliações são também usadas para fins de monitoramento no decorrer da terapia e são úteis para medir o sucesso terapêutico em combinação com a avaliação de outros parâmetros (por exemplo, citologia da urina e/ou níveis de ImunoCyt em terapia de câncer de bexiga ou, por analogia, dos níveis de PSA no soro em terapia de câncer de próstata).

[000266] Antianticorpos de PSCA anti-idiotípicos também podem ser

usados em terapia anticâncer como uma vacina para induzir a uma resposta imune em células expressando uma proteína de PSCA-relacionada. Em particular, a geração de anticorpos anti-idiotípicos é bem-conhecida na técnica; essa metodologia pode ser prontamente adaptada para gerar antianticorpos anti-idiotípicos de PSCA que imitam um epítipo sobre uma proteína de PSCA-relacionada (veja, por exemplo, Wagner *et al.*, 1997, *Hybridoma* 16: 33-40; Foon *et al.*, 1995, *J. Clin. Invest.* 96: 334-342; Herlyn *et al.*, 1996, *Câncer Immunol. Immunother.* 43: 65-76). Tais anticorpos antiidiotípicos podem ser usados em estratégias de vacinas contra o câncer.

[000267] Um objetivo da presente invenção é proporcionar anticorpos de PSCA os quais inibem ou retardam o crescimento de células tumorígenas expressando PSCA. Um outro objetivo da presente invenção é proporcionar métodos para inibir a angiogênese e outras funções biológicas e, desse modo, reduzir o crescimento de tumor em mamíferos, de preferência seres humanos, usando tais anticorpos de PSCA e, em particular, usando tais anticorpos de PSCA combinados com radiação e quimioterapia ou ambos.

[000268] Em uma modalidade, existe sinergia quando tumores, incluindo tumores humanos, são tratados com anticorpos de PSCA em conjunto com agentes quimioterapêuticos ou radiação ou combinações dos mesmos. Em outras palavras, a inibição de crescimento do tumor por um anticorpo de PSCA é intensificada mais do que o esperado quando combinado com agentes quimioterapêuticos ou radiação ou combinações dos mesmos. Sinergia também pode ser mostrada, por exemplo, através de maior inibição do crescimento de tumor com tratamento combinado do que seria esperado de um tratamento com apenas anticorpos de PSCA ou o efeito aditivo de tratamento com um anticorpo de PSCA e um agente quimioterapêutico ou radiação. De preferência, sinergia é demonstrada através de remissão do câncer,

onde a remissão não é esperada a partir de tratamento com um anticorpo de PSCA nu ou com tratamento usando uma combinação aditiva de um anticorpo de PSCA e um agente quimioterapêutico ou radiação.

[000269] O método para inibição de crescimento de células tumorígenas usando um anticorpo de PSCA e uma combinação de quimioterapia ou radiação ou ambos compreende administração do anticorpo de PSCA antes, durante ou após início da quimioterapia ou terapia de radiação, bem como qualquer combinação dos mesmos (isto é, antes e durante, antes e após, durante e após ou antes, durante e após início da quimioterapia e/ou terapia de radiação). Por exemplo, o anticorpo de PSCA é, tipicamente, administrado entre 1 e 60 dias, de preferência entre 3 e 40 dias, mais preferivelmente entre 5 e 12 dias antes de início da terapia de radiação e/ou quimioterapia. Contudo, dependendo do protocolo de tratamento e das necessidades específicas do paciente, o método é realizado de maneira que proporcione o tratamento mais eficaz e, por fim, prolongue a vida do paciente.

[000270] A administração dos agentes quimioterapêuticos pode ser realizada através de uma variedade de formas, incluindo sistemicamente através das vias parenteral e enteral. Em uma modalidade, o anticorpo de PSCA e o agente quimioterapêutico são administrados como moléculas distintas. Em outra modalidade, o anticorpo de PSCA é preso, por exemplo, através de conjugação, a um agente quimioterapêutico. (Veja o Exemplo intitulado "Experimentos Clínicos Humanos para o Tratamento e Diagnóstico de Carcinomas Humanos Através de Uso de Antianticorpos de PSCA Humanos *in vivo*") e (veja seção intitulada "PSCA Como um Alvo para Terapia Anticorpo-Baseada"). Exemplos particulares de agentes quimioterapêuticos ou quimioterapia incluem cisplatina, dacarbazina

(DTIC), dactinomicina, mecloretamina (mostarda de nitrogênio), estreptozocina, ciclofosfamida, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU), doxorubicina (adriamicina), daunorubicina, procarbazona, mitomicina, etoposídeo de citarabina, metotrexato, 5-fluorouracila, vinblastina, vincristina, bleomicina, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotero), aldesleucina, asparaginase, busulfan, carboplatina, cladribina, dacarbazina, floxuridina, fludarabina, hidróxiuréia, ifosfamida, interferon alfa, leuprolida, megestrol, melfalan, mercaptopurina, plicamicina, mitotano, pegaspargase, pentostatina, pipobroman, plicamicina, estreptozocina, tamoxifeno, teniposídeo, testolactona, tioguanina, tiotepa, mostarda de uracila, vinorelbina, clorambucil, taxol e combinações dos mesmos.

[000271] A fonte de radiação usada em combinação com um anticorpo de PSCA pode ser externa ou interna ao paciente que está sendo tratado. Quando a fonte é externa ao paciente, a terapia é conhecida como terapia de radiação com feixe externo (EBRT). Quando a fonte de radiação é interna ao paciente, o tratamento é denominado braquiterapia (BT).

[000272] A radiação é administrada de acordo com técnicas padrão bem-conhecidas usando equipamento padrão fabricado para essa finalidade, tal como AECL Theratron e Varian Clinac. A dose de radiação depende de numerosos fatores, conforme é bem-conhecido na técnica. Tais fatores incluem o órgão que estão sendo tratado, os órgãos saudáveis na via de radiação que poderiam ser inadvertidamente afetados de modo adverso, a tolerância do paciente pela terapia de radiação e a área do corpo que precisa de tratamento. A dose estará, tipicamente, entre 1 e 100 Gy e, mais particularmente, entre 2 e 80 Gy. Algumas doses que têm sido reportadas incluem 35 Gy à coluna espinhal, 15 Gy aos rins, 20 Gy ao fígado e 65-80 Gy à próstata. Deve ser enfatizado, contudo, que a invenção não está

limitada a qualquer dose em particular. A dose será determinada pelo médico que prescreve o tratamento de acordo com fatores particulares em uma determinada situação, incluindo os fatores mencionados acima.

[000273] A distância entre a fonte de radiação externa e o ponto de entrada no paciente pode ser qualquer distância que representa um equilíbrio aceitável entre as células alvo mortas e minimização de efeitos colaterais. Tipicamente, a fonte da radiação externa está entre 70 e 100 cm do ponto de entrada no paciente.

[000274] Braquiterapia é geralmente realizada colocando a fonte de radiação no paciente. Tipicamente, a fonte de radiação é colocada aproximadamente 0-3 cm do tecido que está sendo tratado. Técnicas conhecidas incluem braquiterapia intersticial, intercavitária e superficial. As sementes radioativas podem ser implantadas permanente ou temporariamente. Alguns átomos radioativos típicos que têm sido usados em implantes permanentes incluem radio, cério-137 e irídio-192. Alguns átomos radioativos que têm sido usados em braquiterapia incluem amerício-241 e ouro-198. A dose de radiação para braquiterapia pode ser a mesma conforme mencionado acima para terapia de radiação por feixe externo. Além dos fatores mencionados acima para determinação da dose de terapia de radiação por feixe externo, a natureza do átomo radioativo usado também é levada em conta na determinação da dose de braquiterapia.

X.C.) PSCA Como um Alvo para Respostas Imunes Celulares

[000275] Vacinas e métodos de preparo de vacina que contêm uma quantidade imunogenicamente eficaz de um ou mais peptídeos de HLA-ligação conforme descrito aqui são outras modalidades da invenção. Além disso, vacinas de acordo com a invenção abrangem composições de um ou mais dos peptídeos reivindicados. Um peptídeo pode estar presente em uma vacina individualmente.

Alternativamente, o peptídeo pode existir como um homopolímero compreendendo cópias múltiplas do mesmo peptídeo ou como um heteropolímero de vários peptídeos. Polímeros têm a vantagem de reação imunológica aumentada e, onde diferentes epítomos peptídicos são usados para compor o polímero, a capacidade adicional de induzir a anticorpos e/ou CTLs que reagem com diferentes determinantes imunogênicos do organismo patogênico ou peptídeo tumor-relacionado objetivado para uma resposta imune. A composição pode ser uma região que ocorre naturalmente de um antígeno ou pode ser preparada, por exemplo, recombinantemente ou através de síntese química.

[000276] Veículos que podem ser usados com as vacinas da invenção são bem-conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, tiroglobulina, albuminas, tal como albumina de soro humano, toxóide do tétano, poliaminoácidos, tais como poli L-lisina, ácido poli L-glutâmico, influenza, proteína do núcleo do vírus de hepatite B e similares. As vacinas podem conter um diluente fisiologicamente tolerável (isto é, aceitável), tal como água ou solução salina, de preferência solução salina tamponada com fosfato. As vacinas também incluem, tipicamente, um adjuvante. Adjuvantes tais como adjuvante incompleto de Freund, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio ou alume são exemplos de materiais bem-conhecidos na técnica. Adicionalmente, conforme descrito aqui, respostas de CTL podem ser produzidas através de conjugação dos peptídeos da invenção a lipídios, tal como tripalmitoil -S- glicerilcisteinil seril- serina (P₃CSS). Além disso, verificou-se que um adjuvante, tal como um oligonucleotídeo contendo citosina - fosforotiolada - guanina (CpG) sintética, aumenta as respostas de CTL 10 a 100 vezes (veja, por exemplo, Davila e Celis, J. Immunol. 165: 539-547 (2000)).

[000277] Quando de imunização com uma composição peptídica de

acordo com a invenção, via injeção, aerossol, oral, transdérmica, transmucosal, intrapleural, intratecal ou outras vias adequadas, o sistema imune do hospedeiro responde à vacina através de produção de grandes quantidades de CTLs e/ou HTLs específicos para o antígeno desejado. Conseqüentemente, o hospedeiro se torna pelo menos parcialmente imune ao desenvolvimento posterior de células que expressam ou superexpressam antígeno PSCA ou deriva pelo menos algum benefício terapêutico quando o antígeno foi tumor-associado.

[000278] Em algumas modalidades, pode ser desejável combinar os componentes peptídicos da classe I com componentes que induzem ou facilitam a neutralização de anticorpo e/ou respostas de células T auxiliares dirigidas ao antígeno alvo. Uma modalidade preferida de tal composição compreende epítomos da classe I e da classe II de acordo com a invenção. Uma modalidade alternativa de tal composição compreende epítomos da classe I e/ou da classe II de acordo com a invenção junto com um epítomo de HLT de reação cruzada, tal como a molécula PADRE® (Epimmune, San Diego, CA) (descrita, por exemplo, na Patente U.S. Número 5.736.142).

[000279] A vacina da invenção também pode incluir células que apresentam antígeno (APC), tais como células dendríticas (DC), como um veículo para apresentar peptídeos da invenção. Composições de vacina podem ser criadas *in vitro*, após imobilização e coleta da célula dendrítica, pelo que o carregamento de células dendríticas ocorre *in vitro*. Por exemplo, células dendríticas são transfectadas, por exemplo, com um minigene de acordo com a invenção ou são pulsadas com peptídeos. A célula dendrítica pode, então, ser administrada a um paciente para estimular respostas imunes *in vivo*. As composições de vacina baseadas em DNA ou peptídeo também podem ser administradas *in vivo* em combinação com mobilização de células

dendríticas, pelo que o carregamento de células dendríticas ocorre *in vivo*.

[000280] De preferência, os seguintes princípios são utilizados quando de seleção de um conjunto de epítomos para inclusão em uma composição poliepitópica para uso em uma vacina ou para seleção de epítomos distintos a serem incluídos em uma vacina e/ou serem codificados por ácidos nucleicos, tal como um minigene. É preferido que cada um dos seguintes princípios seja equilibrado de forma a compor a seleção. Os epítomos múltiplos a serem incorporados em uma determinada composição de vacina podem, mas não precisam, ser de seqüência contínua no antígeno nativo do qual os epítomos são derivados.

1) Epítomos são selecionados os quais, quando de administração, imitam respostas imunes que tenham sido observadas como estando correlacionadas à eliminação do tumor. Para a classe I do HLA, isso inclui 3-4 epítomos que se originam de pelo menos um antígeno tumor-associado (TAA). Para a classe II do HLA, raciocínio similar é empregado; novamente, 3-4 epítomos são selecionados de pelo menos um TAA (veja, por exemplo, Rosenberg *et al.*, Science 278: 1447-1450). Epítomos de um TAA podem ser usados em combinação com epítomos de um ou mais TAAs adicionais para produzir uma vacina que objetiva tumores com padrões variados de expressão de TAAs freqüentemente expressos.

2) Epítomos são selecionados que têm a afinidade de ligação requerida estabelecida como estando correlacionada à imunogenicidade: para a classe I do HLA, uma IC₅₀ de 500 nM ou menos, freqüentemente 200 nM ou menos; para a classe II, uma IC₅₀ de 1000 nM ou menos.

3) Peptídeos trazendo supermotivo suficientes ou um conjunto suficiente de peptídeos trazendo motivo alelo-específico são

selecionados para proporcionar uma ampla abrangência de população. Por exemplo, é preferível ter pelo menos 80% de abrangência de população. Uma análise de Monte Carlo, uma avaliação estatística conhecida na técnica, pode ser empregada para avaliar a amplitude ou redundância de abrangência de população.

4) Quando de seleção de epítomos de antígenos câncer-relacionados, freqüentemente é útil selecionar análogos porque o paciente pode ter desenvolvido tolerância ao epítomo nativo.

5) De relevância particular são epítomos referidos como "epítomos agrupados". Epítomos agrupados ocorrem onde pelo menos dois epítomos se sobrepõem em uma determinada seqüência peptídica. Uma seqüência peptídica agrupada pode compreender epítomos de células B, classe I do HLA e/ou classe II do HLA. Quando de fornecimento de epítomos agrupados, um objetivo geral é proporcionar o maior número de epítomos por seqüência. Assim, um aspecto é evitar o fornecimento de um peptídeo que é muito mais longo do que o amino término do epítomo amino terminal e o carbóxi término do epítomo carbóxi terminal no peptídeo. Quando de fornecimento de uma seqüência multi-epitópica, tal como uma seqüência compreendendo epítomos agrupados, geralmente é importante selecionar a seqüência de forma a assegurar que ela não tem propriedades biológicas ou patológicas prejudiciais.

6) Se uma proteína poliepitópica é criada ou quando de criação de um minigene, um objetivo é gerar o menor peptídeo que abrange os epítomos de interesse. Esse princípio é similar, se não o mesmo, que aquele empregado quando de seleção de um polipeptídeo compreendendo epítomos agrupados. Contudo, com um peptídeo poliepitópico artificial, o objetivo de minimização do tamanho é equilibrado contra a necessidade de integrar quaisquer seqüências espaçadoras entre os epítomos na proteína poliepitópica. Resíduos de

aminoácido espaçadores podem, por exemplo, ser introduzidos para evitar epítomos juncionais (um epítomo reconhecido pelo sistema imune, não presente no antígeno alvo e criado apenas pela justaposição artificial de epítomos) ou para facilitar a clivagem entre epítomos e, desse modo, intensificar a apresentação de epítomo. Epítomos juncionais são geralmente evitados porque o recipiente pode gerar uma resposta imune a esse epítomo não-nativo. De preocupação particular é um epítomo juncional que é um "epítomo dominante". Um epítomo dominante pode levar a tal resposta zelosa, pelo fato de que respostas imunes a outros epítomos são diminuídas ou suprimidas.

7) Onde as seqüências de variantes múltiplas da mesma proteína alvo estão presentes, epítomos peptídicos potenciais também podem ser selecionados com base em sua conservação. Por exemplo, um critério para conservação pode definir que a seqüência toda de um peptídeo de ligação à classe I do HLA ou o núcleo de 9-mer inteiro de um peptídeo de ligação da classe II seja conservado em um determinado percentual das seqüências avaliadas para um antígeno proteína-específico.

X.C.1.) Vacinas de Minigene

[000281] Uma série de diferentes abordagens estão disponíveis as quais permitem a distribuição simultânea de epítomos múltiplos. Ácidos nucléicos que codificam os peptídeos da invenção são uma modalidade particularmente útil da invenção. Epítomos para inclusão em um minigene são, de preferência, selecionados de acordo com as diretrizes apresentadas na seção anterior. Um meio preferido de administração de ácidos nucléicos que codificam os peptídeos da invenção usa estrutura dos minigenes que codificam um peptídeo compreendendo um ou mais epítomos múltiplos da invenção.

[000282] O uso de minigenes de epítomos múltiplos é descrito abaixo e em Ishioka *et al.*, J. Immunol. 162: 3915-3925, 1999; An, L. e

Whitton, J. L., J. Virol. 71: 2292, 1997; Thomson, S. A. *et al.*, J. Immunol. 157: 822, 1996; Whitton, J. L. *et al.*, J. Virol. 67: 348, 1993; Hanke, R. *et al.*, Vacina 16: 426, 1998. Por exemplo, um plasmídeo de DNA com epítomos múltiplos que codifica epítomos trazendo motivo e/ou supermotivo derivados de PSCA, o epítomo de células T auxiliar universal PADRE® ou epítomos de HTL múltiplos de PSCA (veja, por exemplo, Tabelas V-XVIII e XXII a LI) e uma seqüência sinalizadora de translocação no retículo endoplasmático podem ser manipulados. Uma vacina também pode compreender epítomos que são derivados de outros TAAs.

[000283] A imunogenicidade de um minigene multi-epitópico pode ser confirmada em camundongos transgênicos para avaliar a magnitude de indução de respostas de CTL contra os epítomos testados. Ainda, a imunogenicidade de epítomos DNA-codificados *in vivo* pode ser correlacionada com as respostas de linhagens CTL-específicas *in vitro* contra células alvo transfectadas com o plasmídeo de DNA. Assim, esses experimentos podem mostrar que o minigene serve para: 1) gerar uma resposta de CTL e 2) que os CTLs induzidos reconhecem células que expressam os epítomos codificados.

[000284] Por exemplo, para criar uma seqüência de DNA que codifica os epítomos selecionados (minigene) para expressão em células humanas, as seqüências de aminoácido dos epítomos podem ser traduzidas inversamente. Uma tabela de uso de codon humano pode ser usada para orientar a escolha para cada aminoácido. Essas seqüências de DNA que codificam epítomo podem ser diretamente unidas de modo que, quando traduzidas, uma seqüência polipeptídica contínua é criada. Para otimizar a expressão e/ou imunogenicidade, elementos adicionais podem ser incorporados no design do minigene. Exemplos de seqüências de aminoácido que podem ser traduzidas inversamente e incluídas na seqüência do minigene incluem: epítomos

da classe I do HLA, epítomos da classe II do HLA, epítomos de anticorpo, uma seqüência sinalizadora de ubiquitinação e/ou um sinal de objetivação ao retículo endoplasmático. Além disso, a apresentação ao HLA de epítomos de CTL e HTL pode ser melhorada através de inclusão de seqüências de flanqueamento sintéticas (por exemplo, polialanina) ou que ocorrem naturalmente adjacentes aos epítomos de CTL ou HTL; esses peptídeos maiores compreendendo o(s) epítomo(s) estão dentro do escopo da invenção.

[000285] A seqüência do minigene pode ser convertida ao DNA através de montagem de oligonucleotídeos que codificam fitas positivas e negativas do minigene. Oligonucleotídeos de sobreposição (30-100 bases de comprimento) podem ser sintetizados, fosforilados, purificados e anelados sob condições apropriadas usando técnicas bem-conhecidas. As extremidades dos oligonucleotídeos podem ser unidas, por exemplo, usando DNA ligase T4. Esse minigene sintético que codifica o polipeptídeo do epítomo pode, então, ser clonado em um vetor de expressão desejado.

[000286] Seqüências regulatórias padrão bem-conhecidas por aqueles versados na técnica são, de preferência, incluídas no vetor para assegurar expressão nas células alvo. Vários elementos de vetor são desejáveis: um promotor com um sítio de clonagem a jusante para inserção do minigene; um sinal de poliadenilação para término eficaz de transcrição; uma origem de replicação de *E. coli*; e um marcador selecionável em *E. coli* (por exemplo, resistência à ampicilina ou canamicina). Numerosos promotores podem ser usados para essa finalidade, por exemplo, o promotor do citomegalovírus humano (hCMV). Veja, por exemplo, Patentes U.S. N^{os} 5.580.859 e 5.589.466 para outras seqüências promotoras adequadas.

[000287] Modificações de vetor adicionais podem ser desejadas para otimizar a expressão do minigene e imunogenicidade. Em alguns

casos, íntrons são requeridos para expressão eficaz do gene e um ou mais íntrons sintéticos ou que ocorrem naturalmente poderiam ser incorporados na região transcrita do minigene. A inclusão de seqüências de estabilização de mRNA e seqüências para replicação em células de mamífero pode também ser considerada para aumentar a expressão do minigene.

[000288] Uma vez que o vetor de expressão é selecionado, o minigene é clonado na região de poliligante a jusante do promotor. Esse plasmídeo é transformado em uma cepa de *E. coli* apropriado e o DNA é preparado usando técnicas padrão. Orientação e a seqüência de DNA do minigene, bem como todos os outros elementos incluídos no vetor, são confirmados usando mapeamento de restrição e análise de seqüência de DNA. Células bacterianas abrigando o plasmídeo correto podem ser armazenadas como um banco de células mestre e um banco de células de trabalho.

[000289] Além disso, seqüências imunoestimulatórias (ISSs ou CpGs) parecem exercer um papel na imunogenicidade de vacinas de DNA. Essas seqüências podem ser incluídas no vetor fora da seqüência de codificação do minigene, se desejado, para intensificar a imunogenicidade.

[000290] Em algumas modalidades, um vetor de expressão bicistrônico o qual permite a produção de epítomos minigene-codificados e uma segunda proteína (incluída para intensificar ou diminuir a imunogenicidade) pode ser usado. Exemplos de proteínas ou polipeptídeos que poderiam intensificar benéficamente a resposta imune se co-expressos incluem citocinas (por exemplo, IL-2, IL-12, GM-CSF), moléculas que induzem à citocina (por exemplo, LelF), moléculas co-estimulatórias ou para respostas de HLT, proteínas de ligação pan-DR (PADRE® Epimmune, San Diego, CA). Epítomos auxiliares (HTL) podem ser unidos aos sinais de objetivação

intracelulares e expressos separadamente dos epítomos de CTL expressos; isso permite direcionamento dos epítomos de HTL a um compartimento celular diferente daquele dos epítomos de CTL. Se requerido, isso poderia facilitar a entrada mais eficaz de epítomos de HTL na via da classe II do HLA, desse modo, melhorando a indução de HLT. Em contraste à indução de HTL ou CTL, especificamente diminuição da resposta imune através de co-expressão de moléculas imunossupressoras (por exemplo, TGF- β) pode ser benéfica em determinadas doenças.

[000291] Quantidades terapêuticas de DNA de plasmídeo podem ser produzidas, por exemplo, através de fermentação em *E. coli*, seguido por purificação. Alíquotas do banco de células de trabalho são usadas para inocular meio de crescimento e crescidas até saturação em frascos agitadores ou em um bio-reator de acordo com técnicas bem-conhecidas. DNA de plasmídeo pode ser purificado usando tecnologias padrão de biosseparação, tais como resinas de troca de ânions em fase sólida fornecidas pela QIAGEN, Inc. (Valencia, Califórnia). Se requerido, DNA superbobinado pode ser isolado de formas abertas circulares e lineares usando eletroforese em gel ou outros métodos.

[000292] DNA de plasmídeo purificado pode ser preparado para injeção usando uma variedade de formulações. A mais simples dessas é reconstituição de DNA liofilizado em solução salina tamponada com fosfato estéril (PBS). Essa abordagem, conhecida como "DNA nu", é atualmente usada para administração intramuscular (IM) em experimentos clínicos. Para maximizar os efeitos imunoterapêuticos das vacinas de DNA de minigene, um método alternativo para formulação de DNA de plasmídeo purificado pode ser desejável. Uma variedade de métodos foram descritos e novas técnicas podem se tornar disponíveis. Lipídios catiônicos, glicolipídios e lipossomas

fusogênicos também podem ser usados na formulação (veja, por exemplo, conforme descrito pelo WO 93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, *BioTechniques* 6(7): 682 (1988); Pat. U.S. Nº 5.279.833; WO 91/06309; e Felgner *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84: 7413 (1987). Além disso, peptídeos e compostos referidos coletivamente como compostos protetores, interativos, de não- condensação (PINC) também poderiam estar em complexo com DNA de plasmídeo purificado para influenciar variáveis tais como estabilidade, dispersão intramuscular ou tráfego a órgãos ou tipos de células específicos.

[000293] Sensibilização da célula alvo pode ser usada como um ensaio funcional para expressão e apresentação à classe I do HLA de epítomos de CTL minigene-codificados. Por exemplo, o DNA de plasmídeo é introduzido em uma linhagem de célula de mamífero que é adequada como um alvo para ensaios de liberação de cromo em CTL. O método de transfecção usado será dependente da formulação final. Eletroporação pode ser usada para DNA "nu", enquanto que lipídios catiônicos permitem transfecção direta *in vitro*. Um plasmídeo expressando proteína fluorescente verde (GFP) pode ser co-transfectado para permitir enriquecimento de células transfectadas usando seleção de células fluorescência-ativada (FACS). Essas células são, então, ligadas como cromo-51 (^{51}Cr) e usadas como células alvo para linhagens de CTL epítomo-específicas; citólise, detectada através de liberação de ^{51}Cr , indica a produção e apresentação, ao HLA, de epítomos de CTL minigene-codificados. Expressão de epítomos de HTL pode ser avaliada de maneira análoga usando ensaios para avaliar a atividade de HTL.

[000294] A imunogenicidade *in vivo* é uma segunda abordagem para a testagem funcional de formulações de DNA de minigene. Camundongos transgênicos expressando proteínas do HLA humanas apropriadas são imunizados com o produto de DNA. A dose e via de

administração são formulação-dependentes (por exemplo, IM para DNA em PBS, intraperitoneal (i.p.) para DNA em complexo com lipídios). Vinte e um dias após imunização, esplenócitos são coletados e reestimulados durante uma semana na presença de peptídeos que codificam cada epítopo que está sendo testado. Após o que, para células efetadoras de CTL, ensaios são conduzidos para citólise de células alvo peptídeo-carregadas, ^{51}Cr -ligadas usando técnicas padrão. A lise de células alvo que foram sensibilizadas por HLA carregado com epítomos peptídicos, correspondendo aos epítomos minigene-codificados, demonstra a função da vacina de DNA para a indução *in vivo* de CTLs. A imunogenicidade dos epítomos de HLT é confirmada em camundongos transgênicos de maneira análoga.

[000295] Alternativamente, os ácidos nucléicos podem ser administrados usando distribuição balística, conforme descrito, por exemplo, na Patente U.S. Nº 5.204.253. Usando essa técnica, artigos compreendidos unicamente de DNA são administrados. Em uma outra modalidade alternativa, o DNA pode ser aderido aos artigos, tais como artigos de ouro.

[000296] Minigenes também podem ser distribuídos usando outros sistemas de distribuição bacterianos ou virais bem-conhecidos na técnica, por exemplo, uma estrutura de expressão que codifica epítomos da invenção pode ser incorporada em um vetor viral, tal como vaccinia.

X.C.2.) Combinações de Peptídeos de CTL com Peptídeos Auxiliares

[000297] As composições de vacina compreendendo peptídeos de CTL da invenção podem ser modificadas, por exemplo, equiparadas, para proporcionar atributos desejados, tal como meia-vida aperfeiçoada no soro, abrangência aumentada de população ou imunogenicidade intensificada.

[000298] Por exemplo, a capacidade de um peptídeo de induzir à

atividade de CTL pode ser intensificada através de ligação do peptídeo a uma seqüência a qual contém pelo menos um epítopo que é capaz de induzir a uma resposta de célula T auxiliar. Embora um peptídeo de CTL possa ser diretamente ligado a um peptídeo T auxiliar, freqüentemente conjugados de epítopo de CTL/epítopo de HTL são ligados por uma molécula espaçadora. O espaçador é, tipicamente, compreendido de moléculas neutras relativamente pequenas, tais como aminoácidos ou miméticos de aminoácido, as quais são substancialmente não carregadas sob condições fisiológicas. Os espaçadores são, tipicamente, selecionados, por exemplo, de Ala, Gly ou outros espaçadores neutros de aminoácidos não polares ou aminoácidos polares neutros. Será compreendido que o espaçador opcionalmente presente não precisa estar compreendido nos mesmos resíduos e, assim, pode ser um hetero- ou homo-oligômero. Quando presente, o espaçador usualmente terá pelo menos um ou dois resíduos, mais usualmente três a seis resíduos e algumas vezes 10 ou mais resíduos. O epítopo peptídico de CTL pode ser ligado ao epítopo peptídico auxiliar T diretamente ou via um espaçador no amino ou carbóxi termino do peptídeo de CTL. O amino término do peptídeo imunogênico ou do peptídeo T auxiliar pode ser acilado.

[000299] Epítomos peptídicos de HTL também podem ser modificados para alterar suas propriedades biológicas. Por exemplo, eles podem ser modificados para incluir D-aminoácidos para aumentar sua resistência às proteases e, assim, aumentar sua meia-vida no soro ou eles podem ser conjugados a outras moléculas tais como lipídios, proteínas, carboidratos e similares para aumentar sua atividade biológica. Por exemplo, um peptídeo T auxiliar pode ser conjugado a uma ou mais cadeias de ácido palmítico no amino ou carbóxi término.

X.C.3.) Combinações de Peptídeos de CTL com Agentes que Produzem Células T

[000300] Em algumas modalidades, pode ser desejável incluir nas composições farmacêuticas da invenção pelo menos um componente o qual produz linfócitos B ou linfócitos T. Lipídios foram identificados como agentes capazes de produzir CTL *in vivo*. Por exemplo, resíduos de ácido palmítico podem ser presos aos grupos ϵ - e α - amino de um resíduo de lisina e, então, ligados, por exemplo, via um ou mais resíduos de ligação, tais como Gly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser ou semelhante, ao peptídeo imunogênico. O peptídeo lipidado pode, então, ser administrado diretamente em uma minicélula ou partícula, incorporado em um lipossoma ou emulsificado em um adjuvante, por exemplo, adjuvante incompleto de Freund. Em uma modalidade preferida, uma composição imunogênica particularmente eficaz compreende ácido palmítico preso aos grupos ϵ - e α - amino de Lys, a qual é preso via ligação, por exemplo, Ser-Ser, ao amino término do peptídeo imunogênico.

[000301] Como outro exemplo de produção lipídica de respostas de CTL, lipoproteínas de *E. coli*, tal como tripalmitoil -S- gliceril cisteinil seril- serina (P₃CSS), podem ser usadas para produzir CTL vírus-específico quando covalentemente presas a um peptídeo apropriado (veja, por exemplo, Deres *et al.*, Nature 342: 561, 1989). Peptídeos da invenção podem ser acoplados à P₃CSS, por exemplo, e o lipopeptídeo administrado a um indivíduo para produzir especificamente uma resposta imune ao antígeno alvo. Além disso, em virtude da indução de neutralização, anticorpos também podem ser produzidos com epítomos P₃CSS-conjugados, duas de tais composições podem ser combinadas para estimular mais eficazmente respostas humorais e célula-mediadas.

X.C.4.) Composições de Vacina Compreendendo DC Pulsadas com Peptídeos de CTL e/ou HTL

[000302] Uma modalidade de uma composição da vacina de acordo

com a invenção compreende administração *ex vivo* de um coquetel de peptídeos trazendo epítipo à PBMC ou DC isoladas das mesmas, a partir do sangue do paciente. Um produto farmacêutico para facilitar a coleta de DC pode ser usado, tal como Progenipoietin® (Pharmacia-Monsanto, St. Louis, MO) ou GM-CSF/IL-4. Após pulsação da DC com peptídeos e antes de reinfusão nos pacientes, as DC são lavadas para remover os peptídeos não ligados. Nessa modalidade, a vacina compreende DCs peptídeo-pulsadas as quais apresentam os epítopos peptídicos pulsados em complexo com moléculas do HLA sobre suas superfícies.

[000303] As DCs podem ser pulsadas *ex vivo* com um coquetel de peptídeos, alguns dos quais estimulam respostas de CTL à PSCA. Opcionalmente, um peptídeo de célula T auxiliar (HTL), tal como um peptídeo da classe II do HLA frouxamente restrito artificial, pode ser incluído para facilitar a resposta de CTL. Assim, a vacina de acordo com a invenção é usada para tratar um câncer o qual expressa ou superexpressa a PSCA.

X.D.) Imunoterapia Adotiva

[000304] Peptídeos PSCA-relacionados antigênicos são usados para estimular uma resposta de CTL e/ou HTL *ex vivo*, também. As células de CTL ou HLT resultantes podem ser usadas para tratar tumores em pacientes que não respondem à outras formas convencionais de terapia ou não respondem a um peptídeo ou ácido nucléico em uma vacina terapêutica de acordo com a invenção. Respostas de CTL ou HLT *ex vivo* a um antígeno em particular são induzidas através de incubação em cultura tecidual do paciente ou células precursoras de CTL ou HTL geneticamente compatíveis junto com uma fonte de células que apresentam antígeno (APC), tal como células dendríticas, e o peptídeo imunogênico apropriado. Após um tempo de incubação apropriado (tipicamente cerca de 7-28 dias) no qual as células

precursoras são ativadas e expandidas em células efetadoras, as células são infundidas novamente no paciente, onde elas destruirão (CTL) ou facilitarão a destruição (HTL) de sua célula alvo específica (por exemplo, uma célula tumorigena). Células dendríticas transfectadas também podem ser usadas como células que apresentam antígeno.

X.E.) Administração de Vacinas para Fins Terapêuticos ou Profiláticos

[000305] Produtos farmacêuticos e composições de vacina da invenção são, tipicamente, usados para tratar e/ou impedir um câncer que expressa ou superexpressa PSCA. Em aplicações terapêuticas, composições de peptídeo e/ou ácido nucléico são administradas a um paciente em uma quantidade suficiente para estimular uma resposta eficaz de célula B, CTL e/ou HTL ao antígeno e curar ou pelo menos interromper parcialmente ou diminuir os sintomas e/ou complicações. Uma quantidade adequada para obter isso é definida como "dose terapeuticamente eficaz". Quantidades eficazes para esse uso dependerão, por exemplo, da composição administrada em particular, da maneira de administração, do estágio e gravidade da doença que está sendo tratada, do peso e estado geral de saúde do paciente e do julgamento do médico.

[000306] Para composições farmacêuticas, os peptídeos imunogênicos da invenção ou DNA que codifica os mesmos são geralmente administrados a um indivíduo já tendo um tumor que expressa PSCA. Os peptídeos ou DNA que codifica os mesmos podem ser administrados individualmente ou como fusões de uma ou mais seqüências peptídicas. Os pacientes podem ser tratados com os peptídeos imunogênicos separadamente ou em conjunto com outros tratamentos, tal como cirurgia, conforme apropriado.

[000307] Para uso terapêutico, administração geralmente deverá começar ao primeiro diagnóstico de câncer PSCA-associado. Isso é

seguido por doses de reforço até que os sintomas sejam pelo menos substancialmente eliminados e durante um período após isso. A modalidade da composição de vacina (isto é, incluindo, mas não limitado a, modalidades tais como peptídeos, coquetéis, polipeptídeos poliepitópicos, minigenes ou CTLs TAA-específicos ou células dendríticas pulsadas) distribuída ao paciente pode variar de acordo com o estágio da doença ou o estado de saúde do paciente. Por exemplo, em um paciente com um tumor que expressa PSCA, a vacina compreendendo CTL PSCA-específico pode ser mais eficaz na morte de células tumorígenas em pacientes com doença avançada do que modalidades alternativas.

[000308] Geralmente, é importante proporcionar uma quantidade do epítipo peptídico distribuído através de um modo de administração suficiente para estimular eficazmente uma resposta de célula T citotóxica; composições as quais estimular respostas de célula T auxiliar também podem ser fornecidas de acordo com essa modalidade da invenção.

[000309] A dosagem para uma imunização terapêutica inicial geralmente ocorre em uma faixa de dosagem unitária onde o valor mínimo é cerca de 1, 5, 50, 500 ou 1.000 µg e o valor máximo é cerca de 10.000; 20.000; 30.000; ou 50.000 µg. Valores de dosagem para um ser humano oscilam, tipicamente, de cerca de 500 µg a cerca de 50.000 µg para pacientes de 70 quilogramas. Dosagens de reforço de entre cerca de 1,0 µg a cerca de 50.000 µg do peptídeo com relação a um regime de reforço durante semanas a meses podem ser administradas, dependendo da resposta e condição do paciente, conforme determinado através de medição da atividade específica de CTL e HTL obtida a partir de sangue do paciente. A administração deverá continuar até que pelo menos os sintomas clínicos ou testes de laboratório indiquem que a neoplasia tenha sido eliminada ou reduzida

e durante um período após isso. As dosagens, vias de administração e esquemas de dose são ajustados de acordo com metodologias conhecidas na técnica.

[000310] Em determinadas modalidades, os peptídeos e composições da presente invenção são empregados em estados doentes graves, isto é, situações que ameaçam a vida ou que ameaçam potencialmente a vida. Em tais casos, como um resultado das quantidades mínimas de substâncias estranhas e a natureza não tóxica relativa dos peptídeos em composições preferidas da invenção, é possível e pode ser desejável pelo médico que prescreve o tratamento, administrar excessos substanciais dessas composições peptídicas com relação a essas quantidades de dosagem estabelecidas.

[000311] As composições de vacina da invenção também podem ser usadas puramente como agentes profiláticos. Geralmente, a dosagem para uma imunização profilática inicial geralmente ocorre em uma faixa de dosagem unitária onde o valor mínimo é cerca de 1, 5, 50, 500 ou 1000 µg e o valor máximo é cerca de 10.000; 20.000; 30.000; ou 50.000 µg. Valores de dosagem para um ser humano oscilam, tipicamente, de cerca de 500 µg a cerca de 50.000 µg para um paciente de 70 quilogramas. Isso é seguido por doses de reforço de entre cerca de 1,0 µg a cerca de 50.000 µg do peptídeo administrados em intervalos definidos de cerca de quatro semanas a seis meses após a administração inicial da vacina. A imunogenicidade da vacina pode ser avaliada através de medição da atividade específica de CTL e HTL obtida a partir de uma amostra de sangue do paciente.

[000312] As composições farmacêuticas para tratamento terapêutico se destinam à administração parenteral, tópica, oral, nasal, intratecal ou local (por exemplo, como um creme ou pomada tópica). De preferência, as composições farmacêuticas são administradas

parenteralmente, por exemplo, intravenosamente, subcutaneamente, intradermicamente ou intramuscularmente. Assim, a invenção proporciona composições para administração parenteral as quais compreendem uma solução dos peptídeos imunogênicos dissolvidos ou suspensos em um veículo aceitável, de preferência um veículo aquoso.

[000313] Uma variedade de veículos aquosos pode ser usada, por exemplo, água, água tamponada, solução salina a 0,8%, glicina a 0,3%, ácido hialurônico e similares. Essas composições podem ser esterilizadas através de técnicas de esterilização convencionais bem-conhecidas ou podem ser filtradas estéreis. As soluções aquosas resultantes podem ser acondicionadas para uso como estão ou liofilizadas, os preparados liofilizados sendo combinados com uma solução estéril antes de administração.

[000314] As composições podem conter substâncias auxiliares farmacêuticamente aceitáveis, conforme requerido, para se aproximar das condições fisiológicas, tais como agentes de tamponamento e ajuste de pH, agentes de ajuste de tonicidade, agentes de umedecimento, conservantes e similares, por exemplo, acetato de sódio, lactato de sódio, cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, monolaurato de sorbitan, oleato de trietanolamina, etc.

[000315] A concentração dos peptídeos da invenção nas formulações farmacêuticas pode variar amplamente, isto é, de menos do que cerca de 0,1%, usualmente em ou pelo menos cerca de 2% a tanto quanto 20% a 50% ou mais em peso e será selecionada primariamente pelos volumes de fluido, viscosidades, etc. de acordo com o modo de administração selecionado em particular.

[000316] Uma forma de dose unitária humana da composição é, tipicamente, incluída em uma composição farmacêutica que compreende uma dose unitária humana de um veículo aceitável. Em

uma modalidade, um veículo aquoso é administrado em um volume/quantidade que é conhecido por aqueles versados na técnica a ser usado para administração de tais composições a seres humanos (veja, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 17ª Edição, A. Gennaro Editor, Mack Publishing Co. Easton, Pensilvânia, 1985). Por exemplo, uma dose de peptídeo para imunização inicial pode ser de cerca de 1 a cerca de 50.000 µg, geralmente 100-5.000 µg, para um paciente de 70 kg. Por exemplo, para ácidos nucleicos, uma imunização inicial pode ser realizada usando um vetor de expressão na forma de ácido nucleico nu administrado IM (ou SC ou ID) nas quantidades de 0,5-5 mg em locais múltiplos. O ácido nucleico (0,1 a 1000 µg) também pode ser administrado usando uma pistola de gene. Após um período de incubação de 3-4 semanas, uma dose de reforço é, então, administrada. O reforço pode ser vírus fowlpox recombinante administrado em uma dose de $5 \cdot 10^7$ a $5 \cdot 10^9$ pfu.

[000317] Para anticorpos, um tratamento geralmente envolve administração repetida do preparado antianticorpo de PSCA, através de uma via aceitável de administração, tal como injeção intravenosa (IV), tipicamente em uma dose na faixa de cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg de peso corporal. Em geral, doses na faixa de 10-500 mg de MAb por semanas são eficazes e bem toleradas. Além disso, uma dose de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal do paciente IV, seguido por doses semanais de cerca de 2 mg/kg IV do preparado de anti-MAb de PSCA representa um regime de dosagem aceitável. Conforme apreciado por aqueles versados na técnica, vários fatores podem influenciar a dose ideal em um caso em particular. Tais fatores incluem, por exemplo, meia-vida de uma composição, a afinidade de ligação de um Ab, a imunogenicidade de uma substância, o grau de expressão de PSCA no paciente, a extensão do antígeno PSCA protegido em circulação, o nível de

concentração em estado uniforme desejado, a frequência de tratamento e a influência dos agentes quimioterapêuticos ou outros usados em combinação com o método de tratamento da invenção, bem como o estado de saúde de um paciente em particular. Doses unitárias humanas preferidas não limitativas são, por exemplo, 500µg - 1mg, 1mg - 50mg, 50mg - 100mg, 100mg - 200mg, 200mg - 300mg, 400mg - 500mg, 500mg - 600mg, 600mg - 700mg, 700mg - 800mg, 800mg - 900mg, 900mg - 1g ou 1mg - 700mg. Em determinadas modalidades, a dose está na faixa de 2-5 mg/kg de peso corporal, por exemplo, com acompanhamento em doses semanais de 1-3 mg/kg; 0,5 mg, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/kg de peso corporal seguido, por exemplo, por duas, três ou quatro semanas de doses semanais; 0,5 - 10 mg/kg de peso corporal, por exemplo, seguido por duas, três ou quatro semanas por doses semanais; 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 mg/m² de área corporal semanalmente; 1-600mg m² de área corporal semanalmente; 225-400 mg/m² de área corporal semanalmente; essas doses podem ser seguidas de doses semanais durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 ou mais semanas.

[000318] Em uma modalidade, formas de dose unitária humanas de polinucleotídeos compreendem uma faixa de dosagem adequada ou quantidade eficaz que proporciona qualquer efeito terapêutico. Conforme apreciado por aqueles versados na técnica, um efeito terapêutico depende de uma série de fatores, incluindo a seqüência do polinucleotídeo, peso molecular do polinucleotídeo e via de administração. Dosagens são, geralmente, selecionadas pelo médico ou outro profissional de saúde de acordo com uma variedade de parâmetros conhecidos na técnica, tais como gravidade dos sintomas, história do paciente e similares. Geralmente, para um polinucleotídeo de cerca de 20 bases, uma faixa de dosagem pode ser selecionada, por exemplo, de um limite mínimo independentemente selecionado, tal

como cerca de 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 ou 500 mg/kg até um limite máximo independentemente selecionado maior do que o limite mínimo de cerca de 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 ou 10.000 mg/kg. Por exemplo, a dose pode ser cerca de qualquer um dos seguintes: 0,1 a 100 mg/kg, 0,1 a 50 mg/kg, 0,1 a 25 mg/kg, 0,1 a 10 mg/kg, 1 a 500 mg/kg, 100 a 400 mg/kg, 200 a 300 mg/kg, 1 a 100 mg/kg, 100 a 200 mg/kg, 300 a 400 mg/kg, 400 a 500 mg/kg, 500 a 1000 mg/kg, 500 a 5000 mg/kg ou 500 a 10.000 mg/kg. Geralmente, vias de administração parenterais podem requerer doses maiores de polinucleotídeo comparado com aplicação mais direta do nucleotídeo ao tecido doente, assim como polinucleotídeo de maior comprimento.

[000319] Em uma modalidade, formas de dose unitária humanas de células T compreendem uma faixa de dosagem adequada ou quantidade capaz de proporcionar qualquer efeito terapêutico. Conforme apreciado por aqueles versados na técnica, um efeito terapêutico depende de uma série de fatores. Dosagens são geralmente selecionadas pelo médico ou outro profissional de saúde de acordo com uma variedade de parâmetros conhecidos na técnica, tal como gravidade dos sintomas, história do paciente e similares. Uma dose pode ser cerca de 10^4 células a cerca de 10^6 células, cerca de 10^6 células a cerca de 10^8 células, cerca de 10^8 a cerca de 10^{11} células ou cerca de 10^8 a cerca de 5×10^{10} células. A dose também pode ser cerca de 10^6 células/m² a cerca de 10^{10} células/m² ou cerca de 10^6 células/m² a cerca de 10^8 células/m².

[000320] A(s) proteína(s) da invenção e/ou ácidos nucleicos que codificam a(s) proteína(s) também podem ser administrados via lipossomas, os quais também podem servir para: 1) objetivar a(s) proteína(s) a um tecido em particular, tal como tecido linfóide; 2)

objetivar seletivamente a células doentes; ou 3) aumentar a meia-vida da composição peptídica. Lipossomas incluem emulsões, espumas, micelas, monocamadas insolúveis, cristais líquidos, dispersões fosfolipídicas, camadas lamelares e similares. Nesses preparados, o peptídeo a ser distribuído é incorporado como parte de um lipossoma, sozinho ou em conjunto com uma molécula a qual se liga a um receptor prevalente entre células linfóides, tal como anticorpos monoclonais os quais se ligam ao antígeno CD45 ou com outras composições terapêuticas ou imunogênicas. Assim, lipossomas cheios ou decorados com um peptídeo desejado da invenção podem ser dirigidos ao local das células linfóides, onde os lipossomas, então, distribuem as composições peptídicas. Lipossomas para uso de acordo com a invenção são formados a partir de lipídios padrão que formam vesículas, os quais geralmente incluem fosfolipídios neutros e negativamente carregados e um esterol, tal como colesterol. A seleção de lipídios é geralmente orientada levando-se em conta, por exemplo, o tamanho do lipossoma, labilidade ácida e estabilidade dos lipossomas na corrente sangüínea. Uma variedade de métodos estão disponíveis para o preparo de lipossomas, conforme descrito, por exemplo, em Szoka *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9: 467 (1980) e Patentes U.S. N^{os} 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 e 5.019.369.

[000321] Para objetivação de células do sistema immune, um ligante a ser incorporado no lipossoma pode incluir, por exemplo, anticorpos ou fragmentos dos mesmos específicos para determinantes na superfície celular das células do sistema imune desejadas. Uma suspensão lipossômica contendo um peptídeo pode ser administrada intravenosamente, localmente, topicamente, etc. em uma dose a qual varia de acordo, *inter alia*, com a maneira de administração, o peptídeo que está sendo distribuído e o estágio da doença que está sendo tratada.

[000322] Para composições sólidas, veículos sólidos não tóxicos convencionais podem ser usados os quais incluem, por exemplo, graus farmacêuticos de manitol, lactose, amido, estearato de magnésio, sacarina sódica, talco, celulose, glicose, sacarose, carbonato de magnésio e similares. Para administração oral, uma composição não tóxica farmacêuticamente aceitável é formada através de incorporação de qualquer um dos excipientes normalmente empregados, tais como aqueles veículos previamente listados e geralmente 10-95% de ingrediente ativo, isto é, um ou mais peptídeos da invenção e mais preferivelmente em uma concentração de 25%-75%.

[000323] Para administração em aerossol, peptídeos imunogênicos são, de preferência, fornecidos na forma finamente dividida com um tensoativo e propelente. Percentuais típicos de peptídeos são cerca de 0,01%-20% em peso, de preferência cerca de 1%-10%. O tensoativo deve, naturalmente, ser não tóxico e de preferência solúvel no propelente. Representativos de tais agentes são os ésteres ou ésteres parciais de ácidos graxos contendo de cerca de 6 a 22 átomos de carbono, tais como ácido capróico, octanóico, láurico, palmítico, esteárico, linoléico, linolênico, olestérico e oléico com um álcool poliídrico alifático ou seu anidrido cíclico. Ésteres misturados, tais como glicerídeos misturados ou naturais, podem ser empregados. O tensoativo por constituir cerca de 0,1%-20% em peso da composição, de preferência cerca de 0,25-5%. O equilíbrio da composição é, comumente, propelente. Um veículo também pode ser incluído, conforme desejado, por exemplo, com lecitina para distribuição intranasal.

XI.) Modalidades Diagnósticas e Prognósticas de PSCA.

[000324] Conforme descrito aqui, polinucleotídeos de PSCA, polipeptídeos, células T citotóxicas reativas (CLT), células T auxiliares

reativas (HTL) e anticorpos antipolipeptídeo são usados em ensaios diagnósticos, prognósticos e terapêuticos bem-conhecidos que examinam condições associadas com crescimento celular desregulado, tal como câncer, em particular os cânceres listados na Tabela I (veja, por exemplo, ambos os padrões de expressão tecidual, bem como sua superexpressão em determinados cânceres, conforme descrito, por exemplo, no Exemplo intitulado "Análise de Expressão de PSCA em Tecidos Normais e Espécimes de Pacientes").

[000325] PSCA pode ser equiparada a um antígeno PSA associada à próstata, o marcador arquétipo que tem sido usado pelos médicos durante anos para identificar e monitorar a presença de câncer de próstata (veja, 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. Câncer Inst. 91(19): 1635-1640(1999)). Uma variedade de outros marcadores diagnósticos também são usados em contextos similares, incluindo p53 e K-ras (veja, por exemplo, Tulchinsky *et al.*, Int J Mol Med, Julho de 1999, 4(1): 99-102 e Minimoto *et al.*, Câncer Detect Prev 2000; 24(1): 1-12). Portanto, a presente descrição de polinucleotídeos e polipeptídeos de PSCA (bem como sondas de polinucleotídeo de PSCA e antianticorpos de PSCA usados para identificar a presença dessas moléculas) e suas propriedades permite que aqueles versados na técnica utilizem essas moléculas em métodos que são análogos àqueles usados, por exemplo, em uma variedade de ensaios diagnósticos dirigidos ao exame de condições associadas ao câncer.

[000326] Modalidades típicas de métodos diagnósticos os quais utilizam os polinucleotídeos, polipeptídeos de PSCA, células T reativas e anticorpos são análogas àqueles métodos de ensaios diagnósticos bem-estabelecidos os quais empregam, por exemplo, polinucleotídeos de PSCA, polipeptídeos, células T reativas e anticorpos. Por exemplo,

polinucleotídeos de PSCA são usados como sondas (por exemplo, em análise de Northern, veja, por exemplo, Sharief *et al.*, Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3): 567-74(1994)) e iniciadores (por exemplo em análise de PCR, veja, por exemplo, Okegawa *et al.*, J. Urol. 163(4): 1189-1190 (2000)) para observar a presença e/ou o nível de mRNAs de PSCA. Em métodos de monitoramento de superexpressão de PSA ou de metástase de câncer de próstata, os polinucleotídeos de PSCA descritos aqui podem ser utilizados da mesma forma para detectar superexpressão de PSCA ou a metástase de câncer de próstata e outros que expressam esse gene. Alternativamente, polipeptídeos de PSCA são usados para gerar anticorpos específicos para PSA, os quais podem, então, ser usados para observar a presença e/ou o nível de proteínas de PSCA em métodos para monitorar superexpressão de proteína de PSCA (veja, por exemplo, Stephan *et al.*, Urology 55(4): 560-3 (2000)) ou a metástase de células de próstata (veja, por exemplo, Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-7 (1996)), os polipeptídeos de PSCA descritos aqui podem ser utilizados para gerar anticorpos para uso na detecção de superexpressão de PSCA ou a metástase de células de próstata e células de outros cânceres expressando esse gene.

[000327] Especificamente, em virtude do fato de metástases envolverem o movimento de células cancerígenas de um órgão de origem (tal como o pulmão ou glândula prostática, etc.) para uma área diferente do corpo (tal como um nódulo linfático), ensaios os quais examinam uma amostra biológica com relação à presença de células expressando polinucleotídeos e/ou polipeptídeos de PSCA podem ser usados para proporcionar evidência de metástase. Por exemplo, quando uma amostra biológica de tecido que normalmente não contém células expressando PSCA (nódulo linfático) é verificada como contendo células que expressam PSCA, tal como a expressão de

PSCA observada em xenoenxertos LAPC4 e LAPC9 isolados de nódulo linfático e metástase óssea, respectivamente, essa descoberta é indicativa de metástase.

[000328] Alternativamente, polinucleotídeos e/ou polipeptídeos de PSCA podem ser usados para proporcionar evidência de câncer, por exemplo, quando se verifica que células em uma amostra biológica que normalmente não expressam PSCA ou expressam PSCA em um nível diferente expressam PSCA ou têm uma expressão aumentada de PSCA (veja, por exemplo, a expressão de PSCA nos cânceres listados na Tabela I e em amostras de pacientes, 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 tecido-limitado (além do PSCA), tal como PSA, PSCA etc. (veja, por exemplo, Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-237 (1996)).

[000329] O uso de imunoistoquímica para identificar a presença de um polipeptídeo de PSCA dentro de uma seção tecidual pode indicar um estado alterado de determinadas células dentro desse tecido. É bem-compreendido na técnica que a capacidade de um anticorpo de se localizar a um polipeptídeo que é expresso em células cancerígenas é uma forma de diagnosticar a presença de doença, estágio da doença, progressão e/ou agressividade do tumor. Tal anticorpo também pode detectar uma distribuição alterada do polipeptídeo dentro das células cancerígenas, quando comparado com tecido não-maligno correspondente.

[000330] O polipeptídeo de PSCA e composições imunogênicas também são úteis em vista do fenômeno de localização de proteína subcelular alterado em estados doentes. Alteração de células do estado normal para doente causa alterações na morfologia celular e é freqüentemente associada a alterações na localização/distribuição

subcelular de proteína. Por exemplo, proteínas da membrana celular que são expressas de maneira polarizada em células normais podem ser alteradas em doença, resultando em distribuição de uma proteína de uma maneira não-polar sobre a superfície celular inteira.

[000331] O fenômeno de localização de proteína subcelular alterada em um estado doentio foi demonstrado com expressão de proteína MUC1 e Her2 através do uso de meios imunoistoquímicos. Células epiteliais normais têm uma distribuição apical típica de MUC1 além de alguma localização supranuclear da glicoproteína, enquanto que lesões malignas freqüentemente demonstram um padrão de coloração apolar (Diaz *et al.*, The Breast Journal, 7; 40-45 (2001); Zhang *et al.*, Clinical Câncer Research, 4; 2669-2676 (1998); Cao *et al.*, The Journal of Hystochemistry and Cytochemistry, 45: 1547-1557 (1997)). Além disso, epitélio de mama normal é negativo para proteína Her2 ou exibe apenas uma distribuição basolateral, enquanto que células malignas podem expressar uma proteína sobre a superfície celular inteira (De Potter *et al.*, International Journal of Câncer, 44; 969-974 (1989); McCormick *et al.*, 117; 935-943 (2002)). Alternativamente, a distribuição de uma proteína pode ser alterada de uma superfície para incluir expressão citoplásmica difusa no estado doentio. Tal exemplo pode ser observado com MUC1 (Diaz *et al.*, The Breast Journal, 7: 40-45 (2001)).

[000332] Alteração na localização/distribuição de uma proteína na célula, conforme detectado através de métodos imunoistoquímicos, também pode proporcionar informação valiosa referente ao favorecimento de determinadas modalidades de tratamento. Esse último ponto é ilustrado por uma situação onde uma proteína pode ser intracelular em tecido normal, mas está na superfície celular em células malignas; a localização na superfície celular torna as células favoravelmente passíveis de regimes de diagnóstico e tratamento

anticorpo-baseados. Quando tal alteração da localização da proteína ocorre para PSCA, uma proteína de PSCA e respostas imunes relacionadas à mesma são muito úteis. Conseqüentemente, a capacidade de determinar se a alteração da localização subcelular da proteína ocorreu para 24P4C12 torna a proteína de PSCA e respostas imunes relacionadas à mesma muito úteis. O uso de composições de PSCA permite que aqueles versados na técnica tomem decisões diagnósticas e terapêuticas importantes.

[000333] Reagentes imunoistoquímicos específicos o PSCA são também úteis para detectar metástases de tumores que expressam PSCA quando polipeptídeo aparece em tecidos onde o PSCA normalmente não é produzido.

[000334] Assim, polipeptídeos e anticorpos de PSCA resultantes de respostas imunes aos mesmos são úteis em uma variedade de contextos importantes, tais como fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos conhecidos por aqueles versados na técnica.

[000335] Fragmentos de polinucleotídeo de PSCA e variantes de polinucleotídeo são empregados por aqueles habilitados para uso em métodos de monitoramento de PSA, fragmentos de polinucleotídeos de PSCA e variantes de polinucleotídeo são usados de maneira análoga. Em particular, polinucleotídeos de PSCA típicos usados em métodos de monitoramento de PSA são sondas ou iniciadores os quais consistem em fragmentos da seqüência de cDNA de PSA. Ilustrando isso, iniciadores usados para amplificar por PCR um polinucleotídeo de PSCA devem incluir menos do que a seqüência de PSA inteira para funcionar na reação em cadeia de polimerase. No contexto de tais reações de PCR, versados na técnica geralmente amplificam diferentes porções de um polinucleotídeo de interesse ou otimizam reações de amplificação (veja, por exemplo, Caetano-

Anolles, G. *Biotechniques* 25(3): 472-476, 478-480 (1998); Robertson *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 98: 121-154 (1998)). Ilustração adicional do uso de tais fragmentos é fornecida no Exemplo intitulado "Análise de Expressão de PSCA em Tecidos Normais e Espécimes de Pacientes", onde um fragmento de polinucleotídeo de PSCA é usado como uma sonda para mostrar a expressão de RNAs de PSCA em células cancerígenas. Além disso, seqüências de polinucleotídeo variantes são, tipicamente, usadas como iniciadores e sondas para os mRNAs correspondentes em PCR e análise de Northern (veja, por exemplo, Sawai *et al.*, *Fetal Diagn. Ther.*, Novembro-Dezembro de 1996, 1(6): 407-13 e *Current Protocols in Molecular Biology*, Volume 2, Unidade 2, Frederick M. Ausubel *et al* eds., 1995)). Fragmentos de polinucleotídeo e variantes são úteis nesse contexto onde eles são capazes de ligação a uma seqüência de polinucleotídeo alvo (por exemplo, um polinucleotídeo de PSCA mostrado na Figura 1 ou variante da mesma) sob condições de elevada estringência.

[000336] Além disso, polipeptídeos de PSCA 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 monitoramento de PSA. Fragmentos de polipeptídeo de PSCA e análogos ou variantes de polipeptídeo também podem ser usados de maneira análoga. Essa prática de uso de fragmentos de polipeptídeo ou variantes de polipeptídeo para gerar anticorpos (tais como anticorpos anti-PSA ou células T) é típica na técnica, com uma ampla variedade de sistemas, tais como proteínas de fusão, sendo usados pelos praticantes (veja, 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 arquitetura com a qual um anticorpo ou célula T é reativa. Tipicamente, aqueles versados na técnica criam uma variedade de diferentes fragmentos

polipeptídicos que podem ser usados de forma a gerar respostas imunes específicas para diferentes porções de um polipeptídeo de interesse (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.840.501 e Patente U.S. Nº 5.939.533). Por exemplo, pode ser preferível utilizar um polipeptídeo compreendendo um dos motivos biológicos de PSCA discutidos aqui ou uma subsequência trazendo motivo a qual é prontamente identificada por aqueles versados na técnica baseado em motivos disponíveis na técnica. Fragmentos de polipeptídeo, variantes ou análogos são, tipicamente, úteis nesse contexto, contanto que eles compreendam um epítopo capaz de gerar um anticorpo ou célula T específica para uma sequência polipeptídica alvo (por exemplo, um polipeptídeo de PSCA mostrado na Figura 1).

[000337] Conforme mostrado aqui, os polinucleotídeos de PSCA e polipeptídeos (bem como sondas de polinucleotídeo de PSCA e antianticorpos de PSCA ou células T usados para identificar a presença dessas moléculas) exibem propriedades específicas que tornam as mesmas úteis no diagnóstico de cânceres, tais como aqueles listados na Tabela I. Ensaaios diagnósticos que medem a presença de produtos genéticos de PSCA de forma a avaliar a presença ou início de uma condição doentia descrita aqui, tal como câncer de próstata, são usados para identificar pacientes para medidas preventivas ou monitoramento 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 a PSA em situações onde, por exemplo, um diagnóstico definido de metástase de origem prostática não pode ser feito com base em um teste quanto ao PSA apenas (veja, por exemplo, Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-237 (1996)) e, conseqüentemente, materiais tais como polinucleotídeos de PSCA e polipeptídeos (bem como as sondas de polinucleotídeo de PSCA e

antianticorpos de PSCA usados para identificar a presença dessas moléculas) precisam ser empregados para confirmar uma metástase de origem prostática.

[000338] Finalmente, além de seu uso em ensaios diagnósticos, os polinucleotídeos de PSCA descritos aqui têm uma série de outras utilidades, tais como seu uso na identificação de anormalidades cromossômicas associadas à oncogenética na região cromossômica à qual o gene de PSCA se mapeia (veja o Exemplo intitulado "Mapeamento Cromossômico de PSCA" abaixo). Além de seu uso em ensaios diagnósticos, uma proteína de PSCA-relacionada e polinucleotídeos descritos aqui têm outras utilidades, tal como seu uso na análise forense de tecidos de origem desconhecida (veja, por exemplo, Takahama K Forensic Sci Int, 28 de Junho de 1996; 80(1-2): 63-9).

[000339] Adicionalmente, proteínas de PSCA-relacionadas ou polinucleotídeos da invenção podem ser usados para tratar uma condição patológica caracterizada por superexpressão de PSCA. Por exemplo, a seqüência de aminoácido ou ácido nucléico da Figura 1 ou fragmentos das mesmas podem ser usados para gerar uma resposta imune a um antígeno PSCA. Anticorpos ou outras moléculas que reagem com PSCA podem ser usados para modular a função dessa molécula e, desse modo, proporcionar um benefício terapêutico final.

XII.) Inibição de Função de Proteína de PSCA

[000340] A invenção inclui vários métodos e composições para inibição da ligação de PSCA a seu parceiro de ligação ou sua associação com outra(s) proteína(s), bem como métodos para inibição de função de PSCA.

XII.A) Inibição de PSCA Com Anticorpos Intracelulares

[000341] Em uma abordagem, um vetor recombinante que codifica anticorpos com cadeia simples que se liga especificamente a PSCA é

introduzido em células expressando PSCA via tecnologias de transferência de gene. Conseqüentemente, o antianticorpo de PSCA com cadeia simples codificado é expresso intracelularmente, se liga à proteína de PSCA e, desse modo, inibe sua função. Métodos para manipulação de tal anticorpo intracelular com cadeia simples são bem-conhecidos. Tais anticorpos intracelulares, também conhecidos como "intracorpos", são especificamente objetivados a um compartimento em particular dentro da célula, fornecendo o controle onde a atividade inibitória do tratamento está focalizada. Essa tecnologia tem sido aplicada com sucesso na técnica (para revisão, veja Richardson e Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13). Foi mostrado que intracorpos eliminam virtualmente a expressão de outros receptores abundantes na superfície celular (veja, por exemplo, Richardson *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli *et al.*, 1994, J. Biol. Chem. 269: 23931-23936; Deshane *et al.*, 1994, Gene Ther. 1: 332-337).

[000342] Anticorpos com cadeia simples compreendem os domínios variáveis das cadeias pesada e leve unidos por um polipeptídeo ligante flexível e são expressos como um polipeptídeo simples. Opcionalmente, anticorpos com cadeia simples são expressos como um fragmento da região variável de cadeia simples unido a uma região constante de cadeia leve. Sinais de tráfego intracelular bem-conhecidos são manipulados em vetores de polinucleotídeo recombinantes que codificam tais anticorpos com cadeia simples de forma a objetivar precisamente o intracorpo ao compartimento intracelular desejado. Por exemplo, intracorpos objetivados ao retículo endoplasmático (ER) são manipulados para incorporar um peptídeo líder e, opcionalmente, um sinal de retenção no ER C-terminal, tal como um motivo de aminoácido KDEL. Intracorpos destinados a exercer atividade no núcleo são manipulados para incluir um sinal de localização nuclear. Porções lipídicas são unidas aos intracorpos de

forma a prender o intracampo ao lado citosólico da membrana plasmática. Intracampos também podem ser manipulados para exercer função no citosol. Por exemplo, intracampos citosólicos são usados para capturar fatores dentro do citosol, desse modo, impedindo os mesmos de serem transportados para seu destino celular natural.

[000343] Em uma modalidade, intracampos são usados para capturar PSCA no núcleo, desse modo, impedindo sua atividade dentro do núcleo. Sinais de objetivação nuclear são manipulados em tais intracampos de PSCA de forma a obter a objetivação desejada. Tais intracampos de PSCA são projetados para se ligar especificamente a um domínio de PSCA em particular. Em uma outra modalidade, intracampos citosólicos que se ligam especificamente a uma proteína de PSCA são usados para impedir que o PSCA obtenha acesso ao núcleo, desse modo, impedindo o mesmo de exercer qualquer atividade biológica dentro do núcleo (por exemplo, impedindo o PSCA de formar complexos de transcrição com outros fatores).

[000344] De forma a direcionar especificamente a expressão de tais intracampos à células em particular, a transcrição do intracampo é colocada sob o controle regulatório de um promotor e/ou intensificador tumor-específico apropriado. De forma a objetivar a expressão do intracampo especificamente à próstata, por exemplo, o promotor e/ou promotor/intensificador de PSA pode ser utilizado (veja, por exemplo, Patente U.S. Nº 5.919.652 emitida em 6 de Julho de 1999).

XII.B.) Inibição de PSCA com Proteínas Recombinantes

[000345] Em uma outra abordagem, moléculas recombinantes se ligam a PSCA e, desse modo, inibem a função do PSCA. Por exemplo, essas moléculas recombinantes inibem ou impedem o PSCA de acessar/se ligar a seu(s) parceiro(s) de ligação ou se associar com outra(s) proteína(s). Tais moléculas recombinantes podem, por exemplo, conter a(s) parte(s) reativa(s) de uma molécula de anticampo

PSCA-específico. Em uma modalidade em particular, a ligação do domínio de ligação de PSCA ao parceiro de PSCA é manipulada em uma proteína de fusão dimérica, pelo que a proteína de fusão compreende dois domínios de ligação de ligante de PSCA ligados à porção Fc de uma IgG humana, tal como IgG₁ humana. Tal porção IgG pode conter, por exemplo, os domínios CH₂ e CH₃ e a região de dobradiça, mas não o domínio CH₁. Tais proteínas de fusão diméricas são administradas na forma solúvel a pacientes sofrendo de câncer associado à expressão de PSCA, pelo que a proteína de fusão dimérica se liga especificamente a PSCA e bloqueia a interação do PSCA com um parceiro de ligação. Tais proteínas de fusão diméricas são ainda combinadas em proteínas multiméricas usando tecnologias conhecidas de ligação de anticorpo.

XII.C.) Inibição de Transcrição ou Tradução de PSCA

[000346] A presente invenção também compreende vários métodos e composições para inibição da transcrição do gene de PSCA. Similarmente, a invenção também proporciona métodos e composições para inibição da tradução de mRNA de PSCA em proteína.

[000347] Em uma abordagem, um método de inibição da transcrição do gene de PSCA compreende contato do gene de PSCA com um polinucleotídeo antisentido de PSCA. Em uma outra abordagem, um método de inibição de tradução de mRNA de PSCA compreende contato de um mRNA de PSCA com um polinucleotídeo antisentido. Em outra abordagem, uma ribozima PSCA-específica é usada para clivar uma mensagem de PSCA, desse modo, inibindo a tradução. Tais métodos baseados em ribozima e antisentido também podem ser dirigidos às regiões regulatórias do gene de PSCA, tal como elementos intensificadores e/ou promotores de PSCA. Similarmente, proteínas capazes de inibição de um fator de transcrição de gene de

PSCA são usadas para inibir a transcrição de mRNA de PSCA. Os vários polinucleotídeos e composições úteis nos métodos antes mencionados foram descritos acima. O uso de moléculas antisentido e ribozimas para inibir a transcrição e tradução é bem-conhecido na técnica.

[000348] Outros fatores que inibem a transcrição de PSCA através de interferência com a ativação transcricional de PSCA são também úteis para tratar cânceres expressando PSCA. Similarmente, fatores que interferem com o processamento de PSCA são úteis para tratar cânceres que expressam PSCA. Métodos de tratamento de câncer utilizando tais fatores também estão dentro do escopo da invenção.

XII.D.) Considerações Gerais para Estratégias Terapêuticas

[000349] Tecnologias de transferência de gene e terapia genética podem ser usadas para distribuição de moléculas de polinucleotídeo terapêuticas a células tumorígenas que sintetizam PSCA (isto é, antisentido, ribozimas, polinucleotídeos que codificam intracópos e outras moléculas inibitórias de PSCA). Várias abordagens de terapia genética são conhecidas na técnica. Vetores recombinantes que codificam polinucleotídeos antisentido de PSCA, ribozimas, fatores capazes de interferir com a transcrição de PSCA e assim por diante, podem ser distribuídos para objetivar células tumorígenas usando tais abordagens de terapia genética.

[000350] As abordagens terapêuticas acima podem ser combinadas com qualquer uma de uma variedade de regimes cirúrgicos, de quimioterapia ou terapia de radiação. As abordagens terapêuticas da invenção podem permitir o uso de dosagens reduzidas de quimioterapia (ou outras terapias) e/ou administração menos freqüente, uma vantagem para todos os pacientes e particularmente para aqueles que não toleram a toxicidade do agente quimioterapêutico também.

[000351] A atividade antitumor de uma composição em particular (por exemplo, antisentido, ribozima, intracampo) ou uma combinação de tais composições, pode ser avaliada usando vários sistemas de ensaio *in vivo* e *in vitro*. Ensaios *in vitro* que avaliam a atividade terapêutica incluem ensaios de crescimento de células, ensaios em ágar macio e outros ensaios indicativos de atividade de promoção de tumor, ensaios de ligação capazes de determinação da extensão até a qual uma composição terapêutica final inibirá a ligação de PSCA a um parceiro de ligação, etc.

[000352] *In vivo*, o efeito de uma composição terapêutica de PSCA pode ser avaliado em um modelo animal adequado. Por exemplo, modelos de câncer de próstata xenogênicos podem ser usados, em que explantes de câncer de próstata humana ou tecidos de xenoenxerto passados são introduzidos em animais imunocomprometidos, tais como camundongos nus ou SCID (Klein *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por exemplo, o Pedido de Patente PCT WO98/16628 e a Patente U.S. 6.107.540 descrevem vários modelos de xenoenxerto de câncer de próstata humano capazes de recapitular o desenvolvimento dos tumores primários, micrometástase e a formação de metástases osteoblásticas características de doença em estágio tardio. A eficácia pode ser prevista usando ensaios que medem a inibição da formação de tumor, regressão de tumor ou metástase e similares.

[000353] Ensaios *in vivo* que avaliam a promoção de apoptose são úteis na avaliação de composições terapêuticas. Em um experimento, xenoenxertos de camundongos trazendo tumor tratados com a composição terapêutica podem ser examinados com relação à presença de focos apoptóticos e comparados com camundongos trazendo xenoenxerto de controle não tratados. A extensão até a qual focos apoptóticos são encontrados nos tumores dos camundongos

tratados proporciona uma indicação da eficácia terapêutica da composição.

[000354] As composições terapêuticas usadas na prática dos métodos precedentes podem ser formuladas em composições farmacêuticas compreendendo um veículo adequado para um método de distribuição desejado. Veículos adequados incluem, mas não estão limitados a, qualquer um de uma série de veículos farmacêuticos padrão, tais como soluções salinas tamponadas com fosfato estéreis, água bacteriostática e similares (veja, de modo geral, Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª Edição, A. Osal. ed., 1980).

[000355] Formulações terapêuticas podem ser solubilizadas e administradas através de qualquer via capaz de distribuição da composição terapêutica ao local de tumor. Vias de administração potencialmente eficazes incluem, mas não estão limitadas a, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intra-órgão, ortotópica e similares. Uma formulação preferida para injeção intravenosa compreende a composição terapêutica em uma solução de água bacteriostática conservada, água não conservada estéril e/ou diluída em cloreto de polivinila ou sacos de polietileno contendo cloreto de sódio estéril a 0,9% para injeção, USP. Preparados de proteína terapêutica podem ser liofilizados e armazenados como pós estéreis, de preferência sob vácuo e, então, reconstituídos em água bacteriostática (contendo, por exemplo, um conservante de álcool benzílico) ou em água estéril antes de injeção.

[000356] Dosagens e protocolos de administração para o tratamento de cânceres usando os métodos precedentes variarão com o método e o câncer alvo e geralmente dependerão de uma série de outros fatores apreciados na técnica.

XIII) Identificação, Caracterização e Uso de Moduladores de PSCA Métodos para Identificar e Usar Moduladores

[000357] Em uma modalidade, seleção é realizada para identificar moduladores que induzem ou suprimem um perfil de expressão em particular, suprimem ou induzem a vias específicas, de preferência gerando o fenótipo associado pelo mesmo. Em outra modalidade, tendo identificado genes diferencialmente expressos importantes em um estado em particular, seleções são realizadas para identificar moduladores que alteram a expressão de genes individuais, quer aumentando ou diminuindo. Em outra modalidade, seleção é realizada para identificar moduladores que alteram uma função biológica do produto de expressão de um gene diferencialmente expresso. Novamente, tendo identificado a importância de um gene em um estado em particular, seleções são realizadas para identificar agentes que se ligam e/ou modulam a atividade biológica do produto genético.

[000358] Além disso, seleções são feitas por genes que são induzidos em resposta a um agente candidato. Após identificação de um modulador (um que suprime um padrão de expressão de câncer, levando a um padrão de expressão normal ou um modulador de um gene de câncer que leva à expressão do gene como em um tecido normal), uma seleção é realizada para identificar genes que são especificamente modulados em resposta ao agente. Comparação dos perfis de expressão entre o tecido normal e tecido de câncer agente-tratado revela genes que não são expressos em tecido normal ou tecido de câncer, mas são expressos em tecido agente-tratado e vice-versa. Essas seqüências agente-específicas são identificadas e usadas pelos métodos descritos aqui para genes ou proteínas de câncer. Em particular, essas seqüências e as proteínas que elas codificam são usadas na marcação ou identificação de células agente-tratadas. Além disso, anticorpos são estimulados contra as proteínas agente-induzidas e usados para objetivar novos produtos terapêuticos à amostra de tecido de câncer tratada.

Ensaio de Identificação e Seleção Modulador-Relacionados:Ensaio Expressão de Gene-Relacionados

[000359] Proteínas, ácidos nucleicos e anticorpos da invenção são usados em ensaios de seleção. As proteínas, anticorpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas e células câncer-associados contendo essas seqüências são usados em ensaios de seleção, tais como avaliação do efeito de candidatos à droga em um "perfil de expressão de gene", perfil de expressão de polipeptídeos ou alteração de função biológica. Em uma modalidade, os perfis de expressão são usados, de preferência em conjunto com técnicas de seleção de elevado rendimento, para permitir monitoramento de expressão de genes após tratamento com um agente candidato (por exemplo, Davis, GF *et al.*, J Biol Screen 7: 69 (2002); Zlokarnik *et al.*, Science 279: 84-8 (1998); Heid, Genome Res 6: 986-94. 1996).

[000360] As proteínas de câncer, anticorpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas e células contendo as proteínas de câncer modificadas ou nativas ou genes são usados em ensaios de seleção. Isto é, a presente invenção compreende métodos para seleção de composições as quais modulam o fenótipo de câncer ou uma função fisiológica de uma proteína de câncer da invenção. Isso é feito sobre o gene em si ou através de avaliação do efeito de candidatos à droga sobre um "perfil de expressão do gene" ou função biológica. Em uma modalidade, perfis de expressão são usados, de preferência em conjunto com técnicas de seleção de elevado rendimento, para permitir monitoramento após tratamento com um agente candidato; veja Zlokarnik, *supra*.

[000361] Uma variedade de ensaios são executados dirigidos aos genes e proteínas da invenção. Ensaio são realizados sobre um ácido nucleico individual ou a nível de proteína. Isto é, tendo identificado um gene particular como super-regulado em câncer,

compostos de teste são selecionados com relação à capacidade de modular a expressão do gene ou com relação à ligação à proteína de câncer da invenção. "Modulação", nesse contexto, inclui um aumento ou uma diminuição na expressão do gene. A quantidade preferida de modulação dependerá da alteração original da expressão do gene em tecido normal versus sofrendo de câncer, com alterações de pelo menos 10%, de preferência 50%, mais preferivelmente 100-300% e, em algumas modalidades, 300-1000% ou mais. Assim, se um gene exibe um aumento de 4 vezes no tecido cancerígeno comparado com um tecido normal, uma diminuição de cerca de quatro vezes é, freqüentemente, desejada; similarmente, uma diminuição de 10 vezes no tecido cancerígeno comparado com tecido normal tendo um valor alvo de um aumento de 10 vezes na expressão pelo composto de teste é, freqüentemente, desejado. Moduladores que exarcebam o tipo de expressão de gene observado em câncer também são úteis, por exemplo, como um alvo super-regulado em outras análises.

[000362] A quantidade de expressão de gene é monitorada usando sondas de ácido nucléico e a quantificação dos níveis de expressão do gene ou, alternativamente, um produto genético em si é monitorado, por exemplo, através do uso de anticorpos à proteína de câncer e imunoenaios padrão. Proteômica e técnicas de separação também permitem a quantificação da expressão.

Monitoramento de Expressão para Identificar Compostos que Modificam a Expressão do Gene

[000363] Em uma modalidade, monitoramento da expressão do gene, isto é, um perfil de expressão, é monitorado simultaneamente para uma série de entidades. Tais perfis envolverão, tipicamente, um ou mais dos genes na Figura 1. Nessa modalidade, por exemplo, sondas de ácido nucléico de câncer são presas à biolascas para detectar e quantificar seqüências de câncer em uma célula em

particular. Alternativamente, PCR pode ser usada. Assim, uma série, por exemplo, cavidades de uma lâmina de microtitulação, pode ser usada com iniciadores distribuídos em cavidades desejadas. Uma reação de PCR pode, então, ser realizada e analisada para cada cavidade.

[000364] Monitoramento da expressão é realizado para identificar compostos que modificam a expressão de uma ou mais seqüências câncer-associadas, por exemplo, uma seqüência de polinucleotídeo apresentada na Figura 1. Geralmente, um modulador de teste é adicionado às células antes da análise. Além disso, seleções são também proporcionadas para identificar agentes que modulam o câncer, modulam as proteínas de câncer da invenção, se ligam a uma proteína de câncer da invenção ou interferem com a ligação de uma proteína de câncer da invenção e um anticorpo ou outro parceiro de ligação.

[000365] Em uma modalidade, métodos de seleção de elevado rendimento envolvem fornecimento de uma biblioteca contendo um grande número de compostos terapêuticos em potencial (compostos candidatos). Tais "bibliotecas químicas combinatoriais" são, então, selecionadas em um ou mais ensaios para identificar aqueles membros da biblioteca (espécies ou subclasses químicas em particular) que mostram uma atividade característica desejada. Os compostos assim identificados podem servir como "compostos de partida" convencionais, como compostos para seleção ou como produtos terapêuticos.

[000366] Em determinadas modalidades, bibliotecas combinatoriais de moduladores em potencial são selecionadas com relação à capacidade de se ligar a um polipeptídeo de câncer ou modular a atividade. Convencionalmente, novas entidades químicas com propriedades úteis são geradas através de identificação de um

composto químico (denominado um "composto de partida") com alguma propriedade ou atividade desejada, por exemplo, inibição de atividade, criando variantes do composto de partida e avaliando a propriedade e atividade desses compostos variantes. Frequentemente, métodos de seleção de elevado rendimento (HTS) são empregados em tal análise.

[000367] Conforme observado acima, monitoramento de expressão do gene é, convenientemente, usada para testar moduladores candidatos (por exemplo, proteína, ácido nucléico ou pequena molécula). Após o agente candidato ter sido adicionado e as células deixadas incubar durante um período, a amostra contendo uma seqüência alvo a ser analisada é, por exemplo, adicionada a uma biolasca.

[000368] Se requerido, a seqüência alvo é preparada usando técnicas conhecidas. Por exemplo, uma amostra é tratada para submeter as células à lise, usando tampões de lise conhecidos, eletroporação, etc., com purificação e/ou amplificação, tal como PCR, realizada conforme apropriado. Por exemplo, uma transcrição *in vitro* com rótulos covalentemente presos aos nucleotídeos é realizada. Geralmente, os ácidos nucléicos são ligados com biotina-FITC ou PE ou com cy3 ou cy5.

[000369] A seqüência alvo pode ser ligada, por exemplo, com um sinal fluorescente, quimioluminescente, químico ou radioativo, para proporcionar um meio de detecção da ligação específica da seqüência alvo a uma sonda. O rótulo também pode ser uma enzima, tal como fosfatase alcalina ou peroxidase de rábano silvestre, a qual, quando proporcionada com um substrato apropriado, produz um produto que é detectável. Alternativamente, o rótulo é um composto ligado ou pequena molécula, tal como um inibidor enzimático, que se liga, mas não é catalisado ou alterado, pela enzima. O rótulo também pode ser

uma porção ou composto, tal como uma expressão de epítopo ou biotina, o qual se liga especificamente à estreptavidina. Para o exemplo da biotina, a estreptavidina é ligada conforme descrito acima, desse modo, fornecendo um sinal detectável para a seqüência alvo ligada. A estreptavidina ligada não ligada é, tipicamente, removida antes de análise.

[000370] Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, esses ensaios podem ser ensaios de hibridização direta ou podem compreender "ensaios em sanduíche" os quais incluem o uso de sondas múltiplas, conforme é geralmente esboçado nas Patentes U.S. N^{os} 5. 681.702; 5.597.909; 5.545.730; 5.594.117; 5.591.584; 5.571.670; 5.580.731; 5.571.670; 5.591.584; 5.624.802; 5.635.352; 5.594.118; 5.359.100; 5.124. 246; e 5.681.697. Nessa modalidade, em geral, o ácido nucléico alvo é preparado conforme esboçado acima e, então, adicionado a uma biolasca compreendendo uma pluralidade de sondas de ácido nucléico, sob condições que permitem a formação de um complexo de hibridização.

[000371] Uma variedade de condições de hibridização são usadas na presente invenção, incluindo condições de elevada, moderada e baixa estringência, conforme esboçado acima. Os ensaios são, geralmente, realizados sob condições de estringência as quais permitem formação do complexo de hibridização sonda-rótulo somente na presença do alvo. A estringência pode ser controlada através de alteração de um parâmetro na etapa que é uma variável termodinâmica incluindo, mas não limitado a, temperatura, concentração de formamida, concentração de sal, concentração de sal caotrópico, pH, concentração de solvente orgânico, etc. Esses parâmetros também podem ser usados para controlar a ligação não específica, conforme é esboçado de modo geral na Patente U.S. N^o 5.681.697. Assim, pode ser desejável realizar determinadas etapas em

condições de maior estringência para reduzir a ligação não específica.

[000372] As reações esboçadas aqui podem ser realizadas através de uma variedade de formas. Componentes da reação podem ser adicionados simultânea ou seqüencialmente em diferentes ordens, com modalidades preferidas esboçadas abaixo. Além disso, a reação pode incluir uma variedade de outros reagentes. Esses incluem sais, tampões, proteínas neutras, por exemplo, albumina, detergentes, etc., os quais podem ser usados para facilitar hibridização ótima e/ou detecção e/ou reduzir interações de base ou não específicas. Reagentes que, de outro modo, melhoram a eficácia do ensaio, tais como inibidores de protease, inibidores de nuclease, agentes antimicrobianos, etc., também podem ser usados conforme apropriado, dependendo dos métodos e da pureza do alvo. Os dados do ensaio são analisados para determinar os níveis de expressão de genes individuais e alterações nos níveis de expressão, tal como entre estados, formando um perfil de expressão do gene.

Ensaio Relacionados com Atividade Biológica

[000373] A invenção proporciona métodos para identificar ou selecionar um composto que modula a atividade de um gene ou proteína câncer-relacionada da invenção. Os métodos compreendem adição de um composto de teste, conforme definido acima, a uma célula compreendendo uma proteína de câncer da invenção. As células contêm um ácido nucléico recombinante que codifica uma proteína de câncer da invenção. Em uma outra modalidade, uma biblioteca de agentes candidatos é testada sobre uma pluralidade de células.

[000374] Em um aspecto, os ensaios são avaliados na presença ou ausência ou exposição prévia ou subsequente de sinais fisiológicos, por exemplo, hormônios, anticorpos, peptídeos, antígenos, citocinas, fatores de crescimento, potenciais de ação, agentes farmacológicos,

incluindo quimioterapêuticos, radiação, carcinogênicos ou outras células (isto é, contatos célula-célula). Em um outro exemplo, as determinações são feitas em diferentes estágios do processo do ciclo celular. Dessa forma, compostos que modulam genes ou proteínas da invenção são identificados. Compostos com atividade farmacológica são capazes de intensificar ou interferir com a atividade da proteína de câncer da invenção. Uma vez identificadas, estruturas similares são avaliadas para identificar características estruturais críticas do composto.

[000375] Em uma modalidade, um método de modulação (por exemplo, inibição) de divisão de células cancerígenas é proporcionado; o método compreende administração de um modulador de câncer. Em uma outra modalidade, um método de modulação (por exemplo, inibição) de câncer é proporcionado; o método compreende administração de um modulador de câncer. Em uma outra modalidade, métodos de tratamento de células ou indivíduos com câncer são proporcionados; o método compreende administração de um modulador de câncer.

[000376] Em uma modalidade, um método para modulação do estado de uma célula que expressa um gene da invenção é proporcionado. Conforme usado aqui, estado compreende parâmetros aceitos na técnica, tais como crescimento, proliferação, sobrevivência, função, apoptose, senescência, localização de atividade enzimática, transdução de sinal, etc., de uma célula. Em uma modalidade, um inibidor de câncer é um anticorpo conforme discutido acima. Em uma outra modalidade, o inibidor de câncer é uma molécula antisentido. Uma variedade de ensaios de crescimento, proliferação e metástase celular são conhecidos por aqueles versados na técnica, conforme descrito aqui.

Seleção de Elevado rendimento para Identificar Moduladores

[000377] Os ensaios para identificar moduladores adequados são passíveis de seleção de elevado rendimento. Ensaios preferidos, assim, detectam intensificação ou inibição de transcrição do gene de câncer, inibição ou intensificação de expressão de polipeptídeo e inibição ou intensificação de atividade do polipeptídeo.

[000378] Em uma modalidade, moduladores avaliados em métodos de seleção de elevado rendimento são proteínas, freqüentemente proteínas que ocorrem naturalmente ou fragmentos de proteínas que ocorrem naturalmente. Assim, por exemplo, extratos celulares contendo proteínas ou digestões aleatórias ou dirigidas de extratos celulares proteináceos, são usados. Dessa forma, bibliotecas de proteínas são feitas para seleção nos métodos da invenção. Particularmente preferidas nessa modalidade são bibliotecas de proteínas bacterianas, fúngicas, virais e de mamífero, com as últimas sendo preferidas e proteínas humanas sendo especialmente preferidas. Compostos de teste particularmente úteis serão dirigidos à classe de proteínas a qual o alvo pertence, por exemplo, substratos para enzimas ou ligantes e receptores.

Uso de Crescimento em Ágar Macio e Formação de Colônia para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000379] Células normais requerem um substrato sólido para se fixar e crescer. Quando as células são transformadas, elas perdem esse fenótipo e crescem independentemente do substrato. Por exemplo, células transformadas podem crescer em cultura em suspensão agitada ou suspensas em meio semi-sólido, tal como ágar macio ou semi-sólido. As células transformadas, quando transfectadas com genes supressores de tumor, podem se regenerar para o fenótipo normal e, mais uma vez, requererem um substrato sólido para se fixar e crescer. O crescimento em ágar macio ou ensaios de formação de colônia são usados para identificar moduladores de seqüências de

câncer as quais, quando expressas em células hospedeiras, inibem a proliferação e transformação celular normais. Um modulador reduz ou elimina a capacidade da célula hospedeira de crescer suspensa em meios sólidos ou semi-sólidos, tal como ágar.

[000380] Técnicas para crescimento em ágar macio ou ensaios de formação de colônia em suspensão são descritos em Freshney, *Culture of Animal Cells: a Manual of Basic Technique* (3ª ed., 1994). Veja também a seção métodos de Garkavtsev *et al* (1996), *supra*.

Avaliação de Inibição por Contato e Limitação da Densidade de Crescimento para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000381] Células normais crescem, tipicamente, em um padrão plano e organizado em uma cultura de células, até que elas toquem outras células. Quando as células tocam umas às outras, elas são inibidas por contato e param de crescer. Células transformadas, contudo, não são inibidas por contato e continuam a crescer em altas densidades em focos desorganizados. Assim, as células transformadas crescem até uma densidade de maior saturação do que as células normais correspondentes. Isso é detectado morfolologicamente através da formação de uma monocamada desorientada de células ou células em foco. Alternativamente, o índice de rotulação com (³H)-timidina na densidade de saturação é usado para medir a limitação de crescimento pela densidade; similarmente, um ensaio MTT ou azul Alamar revelará a capacidade de proliferação de células e a capacidade de moduladores de afetar as mesmas. Veja Freshney (1994), *supra*. Células transformadas, quando transfectadas com genes supressores de tumor, podem se regenerar para um fenótipo normal e se tornar inibidas por contato e crescer até uma densidade menor.

[000382] Nesse ensaio, o índice de rotulação com (³H)-timidina na densidade de saturação é um método preferido de medição da

limitação de crescimento por densidade. Células hospedeiras transformadas são transfectadas com uma seqüência câncer-associada e são crescidas durante 24 horas na densidade de saturação em condições com meio não-limitativo. O percentual de rotulação de células com (^3H)-timidina é determinado através da cpm incorporada.

[000383] O crescimento independente de contato é usado para identificar moduladores de seqüências de câncer as quais levam à proliferação e transformação celular anormais. Um modulador reduz ou elimina o crescimento contato-independente e retorna as células para o fenótipo normal.

Avaliação de Fator de Crescimento ou Dependência de Soro para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000384] Células transformadas têm menor dependência do soro do que suas contrapartes normais (veja, por exemplo, Temin, J. Natl. Câncer Inst. 37: 167-175 (1966); Eagle *et al.*, J. Exp. Med 131: 836-879 (1970)); Freshney, *supra*. Isso é, em parte, em virtude da liberação de vários fatores de crescimento pelas células transformadas. O grau de fator de crescimento ou dependência do soro de células hospedeiras transformadas pode ser comparado com aquele de controles. Por exemplo, fator de crescimento ou dependência de soro de uma célula é monitorado em métodos para identificar e caracterizar compostos que modulam seqüências câncer-associadas da invenção.

Uso de Níveis de Marcador Tumor-Específico para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000385] As células tumorígenas liberam uma quantidade aumentada de determinados fatores (aqui depois "marcadores tumor-específicos") com relação às suas contrapartes normais. Por exemplo, ativador de plasminogênio (PA) é liberado de glioma humano em um nível maior

do que as células cerebrais normais (veja, por exemplo, Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization and Potential Interference with Growth of Tumor in Biological Responses in Câncer, páginas 178-184 (Mihich (ed.) 1985)). Similarmente, Fator de Angiogênese de Tumor (TAF) é liberado em um nível maior em células tumorígenas do que em suas contrapartes normais. Veja, por exemplo, Folkman, Angiogenesis and Câncer, Sem. Câncer Biol. (1992)), enquanto que o bFGF é liberado de tumores endoteliais (Ensoli, B *et al*).

[000386] Várias técnicas as quais medem a liberação desses fatores são descritas em Freshney (1994), *supra*. Também, veja Unkless *et al.*, J. Biol. Chem. 249: 4295-4305 (1974); Strickland & Beers, J. Biol. Chem. 251: 5694-5702 (1976); Whur *et al.*, Br. J. Câncer 42: 305 312 (1980); Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization and Potential Interference with Growth of Tumor in Biological Responses in Câncer, páginas 178-184 (Mihich (ed.) 1985); Freshney, Anticancer Res. 5: 111-130 (1985). Por exemplo, os níveis de marcador tumor-específico são monitorados em métodos para identificar e caracterizar compostos que modulam as seqüências câncer-associadas da invenção.

Invasividade em Matrigel para Identificar e Caracterizar Modulares

[000387] O grau de invasividade em Matrigel ou um constituinte da matriz extracelular pode ser usado como um ensaio para identificar e caracterizar compostos que modulam seqüências câncer-associadas. Células tumorígenas exibem uma correlação positiva entre a malignidade e invasividade de células em Matrigel ou outro constituinte da matriz extracelular. Nesse ensaio, células tumorígenas são, tipicamente, usadas como células hospedeiras. Expressão de um gene supressor de tumor nessas células hospedeiras diminuiria a invasividade das células hospedeiras. Técnicas descritas em Câncer Res. 1999; 59: 6010; Freshney (1994), *supra*, podem ser usadas. Resumidamente, o nível de invasão de células hospedeiras é medido

através de uso de filtros revestidos com Matrigel ou algum outro constituinte da matriz extracelular. Penetração no gel ou através do lado distal do filtro é classificada como invasividade e classificada histologicamente pelo número de células e distância movida ou através de pré-rotulação das células com ¹²⁵I e contagem da radioatividade sobre o lado distal do filtro ou o fundo do disco. Veja, por exemplo, Freshney (1984), *supra*.

Avaliação de Crescimento de Tumor *in vivo* para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000388] Os efeitos de seqüências câncer-associadas sobre o crescimento das células são testados em organismos transgênicos ou imunossuprimidos. Organismos transgênicos são preparados através de uma variedade de formas aceitas na técnica. Por exemplo, organismos transgênicos *crítica-out*, por exemplo, mamíferos, tais como camundongos, são feitos, nos quais um gene de câncer é rompido ou nos quais um gene de câncer é inserido. Camundongos transgênicos neutralizados são feitos através de inserção de um gene marcador ou outro gene heterólogo no local do gene de câncer endógeno no genoma do camundongo via recombinação homóloga. Tais camundongos também podem ser feitos através de substituição do gene de câncer endógeno por uma versão com mutação do gene de câncer ou através de mutação do gene de câncer endógeno, por exemplo, através de exposição a carcinogênicos.

[000389] Para preparar animais quiméricos transgênicos, por exemplo, camundongos, uma estrutura de DNA é introduzida no núcleo de células-tronco. Células contendo a lesão genética recentemente manipulada são injetadas no embrião do camundongo hospedeiro, o qual é reimplantado em uma fêmea recipiente. Alguns desses embriões se desenvolvem em camundongos quiméricos que possuem células germinativas, algumas das quais são derivadas da

linhagem de células mutante. Portanto, através de procriação de camundongos quiméricos, é possível obter uma nova linhagem de camundongos contendo a lesão genética introduzida (veja, por exemplo, Capecchi *et al.*, Science 244: 1288 (1989)). Camundongos quiméricos podem ser derivados de acordo com a Patente US 6.365.797, emitida em 2 de Abril de 2002; Patente US 6.107.540 emitida em 22 de Agosto de 2000; Hogan *et al.*, Manipulating the Mice Embryo: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) e Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987).

[000390] Alternativamente, vários animais hospedeiros imunossuprimidos ou imunodeficientes podem ser usados. Por exemplo, um camundongo "nu" geneticamente atímico (veja, por exemplo, Giovanella *et al.*, J. Natl. Câncer Inst. 52: 921 (1974)), um camundongo SCID, um camundongo timetectorizado ou um camundongo irradiado (veja, por exemplo, Bradley *et al.*, Br. J. Câncer 38: 263 (1978); Selby *et al.*, Br. J. Câncer 41: 52 (1980)) pode ser usado como um hospedeiro. Células tumorígenas transplantáveis (tipicamente cerca de 10^6 células) injetadas em hospedeiros isogênicos produzem tumores invasivos em uma maior proporção de casos, enquanto que células normais de origem similar não. Em hospedeiros os quais desenvolveram tumores invasivos, células expressando seqüências câncer-associadas são injetadas subcutânea ou ortotopicamente. Camundongos são, então, separados em grupos, incluindo grupos de controle e grupos experimentais tratados (por exemplo, tratados com um modulador). Após um período de tempo adequado, de preferência 4-8 semanas, o crescimento do tumor é medido (por exemplo, através do volume ou através de suas duas dimensões maiores ou peso) e comparado com o controle. Tumores que têm redução estatisticamente significativa (usando, por exemplo,

teste T de Student), são mencionados como tendo crescimento inibido.

Ensaio *in vitro* Para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000391] Ensaio para identificar compostos com atividade de modulação podem ser realizados *in vitro*. Por exemplo, um polipeptídeo de câncer é primeiro contatado com um modulador potencial e incubado durante uma quantidade de tempo adequada, por exemplo, de 0,5 a 48 horas. Em uma modalidade, os níveis de polipeptídeo de câncer são determinados *in vitro* através de medição do nível de proteína ou mRNA. O nível de proteína é medido usando imunossaios, tais como Western blotting, ELISA e similares, com um anticorpo que se liga seletivamente ao polipeptídeo de câncer ou um fragmento do mesmo. Para medição do mRNA, amplificação, por exemplo, usando PCR, LCR ou ensaios de hibridização, por exemplo, hibridização de Northern, proteção com RNase, dot blotting, são preferidos. O nível de proteína ou mRNA é detectado usando agentes de detecção direta ou indiretamente ligados, por exemplo, ácidos nucleicos fluorescente ou radioativamente ligados, anticorpos radioativos ou enzimaticamente ligados e similares, conforme descrito aqui.

[000392] Alternativamente, um sistema de gene repórter pode ser projetado usando um promotor de proteína de câncer operavelmente ligado a um gene repórter, tal como luciferase, proteína fluorescente verde, CAT ou P-gal. O constructo repórter é, tipicamente, transfectado em uma célula. Após tratamento com um modulador potencial, a quantidade de transcrição, tradução ou atividade do gene repórter é medida de acordo com métodos padrão conhecidos por aqueles versados na técnica (Davis GF, *supra*; Gonzalez, J. & Negulescu, P. Curr. Opin. Biotechnol. 1998: 9:624).

[000393] Conforme esboçado acima, seleções *in vitro* são feitas sobre genes e produtos genéticos individuais. Isto é, tendo identificado

um gene diferencialmente expresso como importante em um estado em particular, seleção de moduladores da expressão do gene ou produto genético em si é realizada.

[000394] Em uma modalidade, seleção por moduladores de expressão de gene(s) específico(s) é realizada. Tipicamente, a expressão de apenas um ou alguns genes é avaliada. Em outra modalidade, seleções são projetadas primeiro para descobrir compostos que se ligam a proteínas diferencialmente expressas. Esses compostos são, então, avaliados com relação à capacidade de modular a atividade diferencialmente expressa. Além disso, uma vez que compostos candidatos iniciais são identificados, variantes podem ser ainda selecionadas para avaliar melhor as relações de atividade estrutural.

Ensaio de Ligação para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000395] Em ensaios de ligação de acordo com a invenção, um produto genético purificado ou isolado da invenção é geralmente usado. Por exemplo, anticorpos são gerados a uma proteína da invenção e imunoenaios são realizados para determinar a quantidade e/ou localização da proteína. Alternativamente, células compreendendo as proteínas de câncer são usadas nos ensaios.

[000396] Assim, os métodos compreendem combinação de uma proteína de câncer da invenção e um composto candidato, tal como um ligante, e determinação da ligação do composto à proteína de câncer da invenção. Modalidades preferidas utilizam a proteína de câncer humano; modelos com animais de doença humana também podem ser desenvolvidos e usados. Também, outras proteínas de mamífero análogas podem ser usadas, conforme apreciado por aqueles versados na técnica. Além disso, em algumas modalidades, proteínas de câncer variantes ou derivadas são usadas.

[000397] Geralmente, a proteína de câncer da invenção ou o ligante

é não difusamente ligado a um suporte insolúvel. O suporte pode, por exemplo, ser um tendo áreas para recebimento de amostra isoladas (uma lâmina de microtitulação, um arranjo, etc.). Os suportes insolúveis podem ser feitos de qualquer composição à qual as composições podem ser ligadas, são prontamente separados do material insolúvel e são, de outro modo, compatíveis com o método geral de seleção. A superfície de tais suportes pode ser sólida ou porosa e de qualquer formato convencional.

[000398] Exemplos de suportes insolúveis adequados incluem lâminas de microtitulação, arranjos, membranas e glóbulos. Esses são, tipicamente, feitos de vidro, plástico (por exemplo, poliestireno), polissacarídeo, náilon, nitrocelulose ou Teflon®, etc. Lâminas de microtitulação e arranjos são especialmente convenientes em virtude do grande número de ensaios que pode ser realizado simultaneamente, usando pequenas quantidades de reagentes e amostras. A maneira de ligação em particular da composição ao suporte não é crucial, contanto que seja compatível com os reagentes e métodos globais da invenção, mantenha a atividade da composição e seja não difusível. Métodos de ligação preferidos incluem o uso de anticorpos os quais não bloqueiam estericamente o sítio de ligação de ligante ou seqüência de ativação quando de fixação de uma proteína ao suporte, ligação direta a suportes "aderentes" ou iônicos, ligação reticulada química, a síntese de uma proteína ou agente sobre a superfície, etc. Após ligação de uma proteína e/ou agente de ligação ligante ao suporte, material não ligado em excesso é removido através de lavagem. As áreas de recebimento de amostra podem, então, ser bloqueadas através de incubação com albumina de soro bovino (BSA), caseína ou outra proteína inócua ou outra porção.

[000399] Uma vez que a proteína de câncer da invenção está ligada ao suporte, um composto de teste é adicionado ao ensaio.

Alternativamente, um agente de ligação candidato é ligado ao suporte e a proteína de câncer da invenção é, então, adicionada. Agentes de ligação incluem anticorpos específicos, agentes de ligação não naturais identificados em seleções de bibliotecas químicas, análogos de peptídeo, etc.

[000400] De interesse particular são ensaios para identificar agentes que têm uma baixa toxicidade para células humanas. Uma ampla variedade de ensaios pode ser usada para essa finalidade, incluindo ensaios de proliferação, ensaios de cAMP, ensaios de ligação proteína-proteína ligados *in vitro*, ensaios eletroforéticos, de desvio de mobilidade, imunoenaios para ligação de proteína, ensaios funcionais (ensaio de fosforilação, etc.) e similares.

[000401] Determinação de ligação do composto de teste (ligante, agente de ligação, modulador, etc.) a uma proteína de câncer da invenção pode ser feita de uma série de formas. O composto de teste pode ser ligado e a ligação determinada diretamente, por exemplo, através de fixação de toda ou uma parte da proteína de câncer da invenção a um suporte sólido, adição de um composto candidato ligado (por exemplo, um rótulo fluorescente), lavagem do reagente em excesso e determinação se o rótulo está presente sobre o suporte sólido. Várias etapas de bloqueio e lavagem podem ser utilizadas, conforme apropriado.

[000402] Em determinadas modalidades, apenas um dos componentes é ligado, por exemplo, uma proteína da invenção ou ligantes ligados. Alternativamente, mais de um componente é ligado com diferentes rótulos, por exemplo, I^{125} , para uma proteína e um fluoróforo para o composto. Reagentes de proximidade, por exemplo, reagentes de resfriamento ou de transferência de energia, também úteis.

Ligação Competitiva para Identificar e Caracterizar Moduladores

[000403] Em uma modalidade, a ligação do "composto de teste" é determinada através de um ensaio de ligação competitiva com um "competidor". O competidor é uma porção de ligação que se liga à molécula alvo (por exemplo, uma proteína de câncer da invenção). Competidores incluem compostos tais como anticorpos, peptídeos, parceiros de ligação, ligantes, etc. Sob determinadas circunstâncias, a ligação competitiva entre o composto de teste e o competidor desloca o composto de teste. Em uma modalidade, o composto de teste é ligado. Ou composto de teste, competidor ou ambos, é adicionado a uma proteína durante um tempo suficiente para permitir ligação. Incubações são realizadas em uma temperatura que facilita a atividade ótima, tipicamente entre quatro e 40°C. Os períodos de incubação são, tipicamente, otimizados, por exemplo, para facilitar seleção rápida de elevado rendimento; tipicamente, entre zero e uma hora será suficiente. Reagente em excesso é geralmente removido ou lavado. O segundo componente é, então, adicionado e a presença ou ausência do componente ligado é acompanhada, para indicar ligação.

[000404] Em uma modalidade, o competidor é adicionado primeiro, seguido pelo composto de teste. Deslocamento do competidor é uma indicação de que o composto de teste está ligado à proteína de câncer e, assim, é capaz de ligação a e potencialmente modulação, da atividade da proteína de câncer. Nessa modalidade, qualquer componente pode ser ligado. Assim, por exemplo, se o competidor é ligado, a presença do rótulo na solução de lavagem do composto pós-teste indica deslocamento pelo composto de teste. Alternativamente, se o composto de teste é ligado, a presença do rótulo sobre o suporte indica deslocamento.

[000405] Em uma modalidade alternativa, o composto de teste é adicionado primeiro, com incubação e lavagem, seguido pelo competidor. A ausência de ligação pelo competidor indica que o

composto de teste se liga à proteína de câncer com maior afinidade do que o competidor. Assim, se o composto de teste é ligado, a presença do rótulo sobre o suporte, associada à falta de ligação do competidor, indica que o composto de teste se liga e, assim, modula potencialmente a proteína de câncer da invenção.

[000406] Conseqüentemente, os métodos de ligação competitiva compreendem seleção diferencial para identificar agentes que são capazes de modular a atividade das proteínas de câncer da invenção. Nessa modalidade, os métodos compreendem combinação de uma proteína de câncer e um competidor em uma primeira amostra. Uma segunda amostra compreende um composto de teste, a proteína de câncer e um competidor. A ligação do competidor é determinada para ambas as amostras e uma alteração ou diferença na ligação entre as duas amostras indica a presença de um agente capaz de ligação à proteína de câncer e potencialmente modulação de sua atividade. Isto é, se a ligação do competidor é diferente na segunda amostra com relação à primeira amostra, o agente é capaz de ligação à proteína de câncer.

[000407] Alternativamente, seleção diferencial é usada para identificar candidatos à droga que se ligam à proteína de câncer nativa, mas não podem se ligar a proteínas de câncer modificadas. Por exemplo, a estrutura da proteína de câncer é modelada e usada em design racional de droga para sintetizar agentes que interagem com esse local, agentes os quais geralmente não se ligam às proteínas sítio-modificadas. Além disso, tais candidatos à droga que afetam a atividade de uma proteína de câncer nativa também são identificados através de seleção de drogas com relação à capacidade de intensificar ou reduzir a atividade de tais proteína.

[000408] Controles positivos e controles negativos podem ser usados nos ensaios. De preferência, amostras de controle e de teste são

obtidas pelo menos em triplicata para obter resultados estatisticamente significativos. Incubação de todas as amostras ocorre durante um tempo suficiente para permitir ligação do agente à proteína. Após incubação, as amostras são lavadas do material não especificamente ligado e a quantidade de agente ligado geralmente ligada determinada. Por exemplo, onde um radiorrótulo é empregado, as amostras podem ser contadas em um contador de cintilação para determinar a quantidade de composto ligado.

[000409] Uma variedade de outros reagentes podem ser incluídos nos ensaios de seleção. Esses incluem reagentes tais como sais, proteínas neutras, por exemplo, albumina, detergentes, etc., os quais são usados para facilitar ligação proteína-proteína ótima e/ou reduzir interações de base ou não específicas. Também, reagentes que de outro modo melhoram a eficácia do ensaio, tais como inibidores de protease, inibidores de nuclease, agentes antimicrobianos, etc., podem ser usados. Uma mistura de componentes é adicionada de forma a proporcionar a ligação requerida.

Uso de polinucleotídeos que sub-regulam ou inibem uma proteína da invenção

[000410] Moduladores de polinucleotídeo de câncer podem ser introduzidos em uma célula contendo a seqüência de nucleotídeo alvo através de formação de um conjugado com uma molécula de ligação a ligante, conforme descrito no WO 91/04753. Moléculas de ligação a ligante adequadas incluem, mas não estão limitadas a, receptores da superfície celular, fatores de crescimento, outras citocinas ou outros ligantes que se ligam a receptores na superfície celular. De preferência, a conjugação da molécula de ligação a ligante não interfere substancialmente com a capacidade da molécula de ligação a ligante de se ligar à sua molécula correspondente ou receptor ou bloquear a entrada do oligonucleotídeo sentido ou antisentido ou sua

versão conjugada na célula. Alternativamente, um modulador de polinucleotídeo de câncer pode ser introduzido em uma célula contendo a seqüência de ácido nucléico alvo, por exemplo, através de formação de um complexo de polinucleotídeo-lipídio, conforme descrito no WO 90/10448. Deve ser compreendido que o uso de moléculas antisentido ou neutralizadas e críticas em modelos também pode ser usado em ensaios de seleção, conforme discutido acima, além dos métodos de tratamento.

Nucleotídeos antisentido e Inibitórios

[000411] Em determinadas modalidades, a atividade de uma proteína câncer-associada é sub-regulada ou inteiramente inibida pelo uso de polinucleotídeo antisentido ou pequeno RNA nuclear (snRNA) inibitório, isolamento de ácido nucléico complementar a e o qual pode, de preferência, se hibridizar especificamente a uma seqüência de ácido nucléico de mRNA de codificação, por exemplo, uma proteína de câncer da invenção, mRNA ou uma subsequência da mesma. Ligação do polinucleotídeo antisentido ao mRNA reduz a tradução e/ou estabilidade do mRNA.

[000412] No contexto da presente invenção, polinucleotídeos antisentido podem compreender nucleotídeos que ocorrem naturalmente ou espécies sintéticas formadas de subunidades que ocorrem naturalmente ou seus homólogos íntimos. Polinucleotídeos antisentido também podem ter porções açúcar ou ligações inter-açúcar alteradas. Exemplificativos entre esses são as espécies contendo fosforotioato e outras contendo enxofre as quais são conhecidas na técnica. Análogos são compreendidos pela presente invenção, contanto que eles funcionem eficazmente para se hibridizar com os nucleotídeos da invenção. Veja, por exemplo, Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA; Sequitor, Inc., Natick, MA.

[000413] Tais polinucleotídeos antisentido podem ser prontamente

sintetizados usando meios recombinantes ou podem ser sintetizados *in vitro*. Equipamento para tal síntese é vendido por vários fornecedores, incluindo Applied Biosystems. O preparo de outros oligonucleotídeos, tais como fosforotioatos e derivados alquilados, também é bem-conhecido por aqueles versados na técnica.

[000414] Moléculas antisentido, conforme usado aqui, incluem oligonucleotídeos antisentido ou sentido. Oligonucleotídeos sentido podem, por exemplo, ser empregados para bloquear a transcrição através de ligação ao filamento antisentido. Os oligonucleotídeos antisentido e sentido compreendendo uma seqüência de ácido nucléico de filamento simples (quer RNA ou DNA) capaz de ligação às seqüências de mRNA alvo (sentido) ou DNA (antisentido) de moléculas de câncer. Oligonucleotídeos antisentido o sentido, de acordo com a presente invenção, compreendem um fragmento geralmente de pelo menos cerca de 12 nucleotídeos, de preferência de cerca de 12 a 30 nucleotídeos. A capacidade de derivatizar um oligonucleotídeo sentido ou antisentido, baseado em uma seqüência de cDNA que codifica uma determinada proteína é descrita, por exemplo, em Stein & Cohen (Câncer Res. 48: 2659 (1988) e van der Krol *et al* (BioTechniques 6: 958 (1988)).

Ribozimas

[000415] Além de polinucleotídeos antisentido, ribozimas podem ser usadas para objetivar e inibir a transcrição de seqüências de nucleotídeo câncer-associadas. Uma ribozima é uma molécula de RNA que cliva cataliticamente outras moléculas de RNA. Diferentes tipos de ribozimas foram descritos, incluindo ribozimas do grupo I, ribozimas "cabeça de martelo", ribozimas "grampo de cabelo", RNase P e ribozimas "cabeça de machado" (veja, por exemplo, Castanotto *et al.*, Adv. in Pharmacology 25: 289-317 (1994) para uma revisão geral das propriedades de diferentes ribozimas).

[000416] As características gerais de ribozimas "grampo de cabelo" são descritas, por exemplo, em Hampel *et al.*, Nucl. Acids Res. 18: 299-304 (1990); Publicação de Patente Européia Nº 0360257; Patente U.S. Nº 5.254.678. Métodos de preparo são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica (veja, por exemplo, WO 94/26877; Ojwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6340-6344 (1993); Yamada *et al.*, Human Gene Therapy 1: 39-45 (1994); Leavitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 699- 703 (1995); Leavitt *et al.*, Human Gene Therapy 5: 1151-120 (1994); e Yamada *et al.*, Virology 205: 121-126 (1994)).

Uso de Moduladores em Seleção Fenotípica

[000417] Em uma modalidade, um composto de teste é administrado a uma população de células cancerígenas as quais têm associado um perfil de expressão de câncer. Por "administração" ou "contato de" aqui entenda-se que o modulador é adicionado às células de uma maneira tal de modo a permitir que o modulador atue quando em contato com a célula, quer através de captação e ação intracelular ou através de ação na superfície celular. Em algumas modalidades, um ácido nucléico que codifica um agente proteináceo (isto é, um peptídeo) é colocado em uma estrutura viral, tal como uma estrutura adenoviral ou retroviral, e adicionado à célula, de modo que a expressão do agente peptídico é acompanhada, por exemplo, PCT US97/01019. Sistemas de terapia genética reguláveis também podem ser usados. Uma vez que o modulador é administrado às células, as células são lavadas se desejado e são deixadas incubar, de preferência sob condições fisiológicas, durante algum tempo. As células são, então, coletadas e um novo perfil de expressão de gene é gerado. Assim, por exemplo, tecido de câncer é selecionado com relação a agentes que modulam, por exemplo, induzem ou suprimem, o fenótipo de câncer. Uma alteração no perfil de expressão de pelo

menos um gene, de preferência muitos, indica que o agente tem um efeito sobre a atividade de câncer. Similarmente, alteração em uma função biológica ou uma via de sinalização é indicativo de atividade modulatória. Através de definição de tal assinatura para o fenótipo do câncer, seleções de novas drogas que alteram o fenótipo podem ser planejadas. Com essa abordagem, o alvo da droga não precisa ser conhecido e não precisa ser representado em uma plataforma de seleção de expressão de gene/proteína original, nem o nível de transcrito para a proteína alvo precisa mudar. O modulador que inibe a função servirá como um marcador substituto.

[000418] Conforme esboçado acima, seleções são feitas para avaliar genes ou produtos genéticos. Isto é, tendo identificado um gene diferencialmente expresso em particular como importante em um estado em particular, a seleção de moduladores com relação à expressão do gene ou produto genético em si é realizada.

Uso de Moduladores Para Afetar os Peptídeos da Invenção

[000419] Medições de atividade do polipeptídeo de câncer ou do fenótipo do câncer são realizadas usando uma variedade de ensaios. Por exemplo, os efeitos de moduladores sobre a função de um polipeptídeo de câncer são medidos através de exame dos parâmetros descritos acima. Uma alteração fisiológica que afeta a atividade é usada para avaliar a influência de um composto de teste sobre os polipeptídeos da presente invenção. Quando os resultados funcionais são determinados usando células intactas ou animais, uma variedade de efeitos podem ser avaliados, tal como no caso de um câncer associado a tumores sólidos, crescimento do tumor, metástase do tumor, neovascularização, liberação de hormônio, alterações transcricionais em marcadores genéticos conhecidos e desconhecidos (por exemplo, através de Northern blots), alterações no metabolismo celular, tal como crescimento celular, ou alterações no pH e alterações

nos segundos mensageiros intracelulares, tal como cGNIP.

Métodos de Identificação e Caracterização de Seqüências Câncer-Associadas

[000420] A expressão de várias seqüências genéticas está correlacionada ao câncer. Conseqüentemente, distúrbios baseados em genes de câncer mutantes ou variantes são determinados. Em uma modalidade, a invenção proporciona métodos para a identificação de células contendo genes de câncer variantes, por exemplo, determinação da presença de toda ou parte da seqüência de pelo menos um gene de câncer endógeno em uma célula. Isso é realizado usando qualquer uma de uma série de técnicas de seqüenciamento. A invenção compreende métodos de identificação do genótipo de câncer de um indivíduo, por exemplo, determinação de toda ou parte da seqüência de pelo menos um gene da invenção no indivíduo. Isso é, geralmente, feito em pelo menos um tecido do indivíduo, por exemplo, um tecido apresentado na Tabela I, e pode incluir a avaliação de uma série de tecidos ou diferentes amostras do mesmo tecido. O método pode incluir comparação da seqüência do gene seqüenciado com um gene de câncer conhecidos, isto é, um gene do tipo silvestre, para determinar a presença de membros da família, homologias, mutações ou variantes. A seqüência de todo ou parte do gene pode, então, ser comparada com a seqüência de um gene de câncer conhecida para determinar se existem diferenças. Isso é feito usando qualquer um de uma série de programas de homologia conhecidos, tais como BLAST, Bestfit, etc. A presença de uma diferença na seqüência entre o gene de câncer do paciente e o gene de câncer conhecido se correlaciona com um estado doentio ou uma propensão para um estado doentio, conforme esboçado aqui.

[000421] Em uma modalidade preferida, os genes de câncer são usados como sondas para determinar o número de cópias do gene de

câncer no genoma. Os genes de câncer são usados como sondas para determinar a localização cromossômica dos genes de câncer. Informação tal como localização cromossômica encontra uso no fornecimento de um diagnóstico ou prognóstico em particular quando anormalidades cromossômicas, tais como translocações e similares, são identificadas no locus do gene de câncer.

XI.V.) RNAi e Uso terapêutico de Pequeno RNA de Interferência (siRNAs)

[000422] A presente invenção também é dirigida a oligonucleotídeos de siRNA, particularmente filamentos duplos de RNA abrangendo pelo menos um fragmento da região de codificação de PSCA ou regiões UTR 5' ou oligonucleotídeo complementar ou qualquer antisenso específico para a sequência de PSCA. Em uma modalidade, tais oligonucleotídeos são usados para estimular uma função do PSCA ou são usados para selecionar ou avaliar moduladores da função ou expressão de PSCA. Em outra modalidade, expressão do gene de PSCA é reduzida através de uso de transfecção com siRNA e resulta em capacidade proliferativa significativamente diminuída de células cancerígenas transformadas que expressam endogenamente o antígeno; células tratadas com siRNA de PSCA específicos mostram sobrevivência reduzida conforme medido, por exemplo, através de uma leitura metabólica de viabilidade celular, correlacionada à capacidade proliferativa reduzida. Assim, composições de siRNA de PSCA compreendem siRNA (RNA de filamento duplo) que corresponde à sequência da ORF de ácido nucléico de uma proteína de PSCA ou subsequências da mesma; essas subsequências têm, geralmente, 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 ou mais do que 35 nucleotídeos de RNA contínuos de comprimento e contêm sequências que são complementares e não-complementares a pelo menos uma

porção da sequência de codificação de mRNA. Em uma modalidade preferida, uma subsequência tem 19-25 nucleotídeos de comprimento, mais preferivelmente 21-23 nucleotídeos de comprimento.

[000423] RNA de interferência é uma nova abordagem para silenciamento de genes *in vitro* e *in vivo*, assim, pequenos RNAs de filamento duplo (siRNAs) são agentes terapêuticos valiosos. O poder dos siRNAs de silenciar atividades gene-específicas foi agora levado para modelos de doença em animais e é usado em seres humanos também. Por exemplo, infusão hidrodinâmica de uma solução de siRNA em um camundongo com um siRNA contra um alvo em particular tem provado ser terapeuticamente eficaz.

[000424] O trabalho pioneiro de Song *et al* indica que um tipo de ácido nucléico totalmente natural, pequenos RNA de interferência (siRNAs), servem como agentes terapêuticos mesmo sem outra modificação química (Song e. *et al* "RNA interference targeting Fas protects mices from fulminant hepatitis" Nat. Med. 9(3): 347-51(2003)). Esse trabalho proporcionou a primeira evidência *in vivo* de que a infusão de siRNAs em um animal poderia aliviar a doença. Nesse caso, os autores forneceram injeções de siRNA a camundongos projetadas para silenciar a proteína FAS (um receptor de morte celular que, quando superativado durante resposta inflamatória, induz a hepatócitos e outras células à morte). No dia seguinte, aos animais foi fornecido um anticorpo específico para Fas. Camundongos de controle morreram de insuficiência hepática aguda dentro de uns poucos dias, enquanto que mais de 80% dos camundongos tratados com siRNA permaneceram isentos de doença grave e sobreviveram. Cerca de 80% a 90% de suas células hepáticas incorporaram os oligonucleotídeos de siRNA nus. Além disso, as moléculas de RNA funcionaram durante 10 dias antes de perda do efeito após 3 semanas.

[000425] Para uso em terapia humana, siRNA é distribuído através de sistemas eficazes que induzem atividade de RNAi de longa ação. Um principal impedimento para uso clínico é a distribuição de siRNAs às células apropriadas. Hepatócitos parecem ser particularmente receptivos ao RNA exógeno. Hoje, alvos localizados no fígado são atraentes porque o fígado é um órgão que pode ser prontamente objetivado por moléculas de ácido nucléico e vetores virais. Contudo, outros alvos teciduais e órgãos são preferidos também.

[000426] Formulações de siRNAs com compostos que promovem o trânsito através das membranas celulares são usadas para melhorar a administração de siRNAs em terapia. SiRNA sintético quimicamente modificado que é resistente a nucleases e tem estabilidade no soro tendo concomitante duração intensificada dos efeitos do siRNA é outra modalidade.

[000427] Assim, a tecnologia de siRNA é um produto terapêutico para malignidade humana através de distribuição de moléculas de siRNA dirigidas a PSCA a indivíduos com câncer, tais como aqueles listados na Tabela 1. Tal administração de siRNAs leva a um crescimento reduzido de células cancerígenas expressando PSCA e proporciona uma terapia antitumor, diminuindo a morbidez e/ou mortalidade associadas à malignidade.

[000428] A eficácia dessa modalidade de tornar menos ativo o produto genético é significativa quando medida *in vitro* ou *in vivo*. A eficácia *in vitro* é prontamente demonstrável através de aplicação de siRNAs à células em cultura (conforme descrito acima) ou a alíquotas de pacientes com biópsias de câncer quando métodos *in vitro* são usados para detectar a expressão reduzida de proteína de PSCA.

XV.) Kits/Artigos de Fabricação

[000429] Para uso em aplicações em laboratório, prognóstico, diagnóstico e terapêutico descritas aqui, kits estão dentro do escopo

da invenção. 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 uma do(s) recipiente(s) compreendendo um dos elementos distintos a serem usados no método, junto com um rótulo ou bula compreendendo instruções para uso, tal como um uso descrito aqui. Por exemplo, o(s) recipiente(s) pode(m) compreender uma sonda que é ou pode ser detectavelmente ligada. Tal sonda pode ser um anticorpo ou polinucleotídeo específico para uma proteína ou um gene ou mensagem da invenção, respectivamente. Onde o método utiliza hibridização de ácido nucléico para detectar o ácido nucléico alvo, o kit pode também ter recipientes contendo nucleotídeo(s) para amplificação da seqüência de ácido nucléico alvo. Kits podem compreender um recipiente compreendendo um repórter, tal como proteína de ligação à biotina, tal como avidina ou estreptavidina, ligado a uma molécula repórter, tal como um rótulo enzimático, fluorescente ou radioisótopo; tal repórter pode ser usado, por exemplo, com um ácido nucléico ou anticorpo. O kit pode incluir toda ou parte das seqüências de aminoácido na Figura 1, Figura 2 ou Figura 3 ou análogos das mesmas ou uma molécula de ácido nucléico que codifica tais seqüências de aminoácido.

[000430] O kit da invenção compreenderá, tipicamente, o recipiente descrito acima e um ou mais de outros recipientes associados ao mesmo que compreende materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas; veículo, embalagem, recipiente, frasco e/ou rótulos para tubos listando do conteúdos e/ou instruções para uso e bulas na embalagem com instruções para uso.

[000431] Um rótulo pode estar presente sobre ou com o recipiente para indicar que a composição é usada para uma terapia específica ou

aplicação não-terapêutica, tal como aplicação prognóstica, profilática, diagnóstica ou em laboratório e também para indicar orientações para uso *in vitro* ou *in vivo*, tais como aqueles descritos aqui. Orientações e outra informação também pode ser incluída sobre uma bula ou rótulo(s) o qual é incluído com ou sobre o kit. O rótulo pode estar sobre ou associado ao recipiente. Um rótulo pode estar sobre um recipiente quando letras, números ou outros caracteres que formam o rótulo são moldados ou gravados no recipiente em si; um rótulo pode estar associado a um recipiente quando ele está presente dentro de um receptáculo ou veículo que também contém o recipiente, por exemplo, uma bula para embalagem. O rótulo pode indicar que a composição é usada para diagnosticar, tratar, profilaxia ou prognóstico de uma condição, tal como uma neoplasia de um tecido apresentado na Tabela I.

[000432] Os termos "kit" e "artigo de fabricação" podem ser usados como sinônimos.

[000433] Em outra modalidade da invenção, um artigo de fabricação contendo composições, tais como seqüência(s) de aminoácido, pequena(s) molécula(s), seqüência(s) de ácido nucléico e/ou anticorpo(s), por exemplo, materiais úteis para o diagnóstico, prognóstico, profilaxia e/ou tratamento de neoplasias de tecidos, tais como aquelas apresentadas na Tabela I, é proporcionado. O artigo de fabricação compreende, tipicamente, pelo menos um recipiente e pelo menos um rótulo. Recipientes adequados incluem, por exemplo, garrafas, frascos, seringas e tubos de ensaio. Os recipientes podem ser formados de uma variedade de materiais, tais como vidro, metal ou plástico. O recipiente pode conter seqüência(s) de aminoácido, pequena(s) molécula(s), seqüência(s) de ácido nucléico, população(ões) de células e/ou anticorpo(s). Em uma modalidade, o recipiente contém um polinucleotídeo para uso no exame do perfil de

expressão de mRNA de uma célula, junto com reagentes usados para essa finalidade. Em outra modalidade, um recipiente compreende um anticorpo, fragmento de ligação do mesmo ou proteína de ligação específica para uso na avaliação da expressão de proteína de PSCA em células e tecidos ou para fins de laboratório, prognóstico, diagnóstico, profilático e terapêutico relevantes; indicações e/ou orientações para tais usos podem ser incluídos sobre ou em tal recipiente, assim como reagentes e outras composições ou ferramentas usadas para essas finalidades. Em uma outra modalidade, um recipiente compreende materiais para estimular uma resposta imune celular ou humoral, junto com indicações e/ou orientações associadas. Em outra modalidade, um recipiente compreende materiais para imunoterapia adotiva, tais como células T citotóxicas (CLT) ou células T auxiliares (HTL), junto com indicações e/ou orientações associadas; reagentes e outras composições ou ferramentas usadas para tais finalidades também podem ser incluídos.

[000434] O recipiente pode, alternativamente, conter uma composição que é eficaz para o tratamento, diagnóstico, prognóstico ou profilaxia de uma condição e pode ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco com solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha perdurável por uma agulha de injeção hipodérmica). Os agentes ativos na composição podem ser um anticorpo capaz de ligação específica a PSCA e modulação da função de PSCA.

[000435] O artigo de fabricação pode ainda compreender um segundo recipiente compreendendo um tampão farmacologicamente aceitável, tal como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e/ou solução de dextrose. Ele pode ainda incluir outros materiais desejáveis de um ponto de vista comercial e do usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agitadores, agulhas,

seringas e/ou bulas na embalagem com indicações e/ou instruções para uso.

Exemplos:

[000436] Vários aspectos da invenção são ainda descritos e ilustrados por meio dos vários exemplos que seguem, nenhum dos quais se destina a limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1

Análise de Expressão de Variantes de PSCA em Espécimes de Tecidos Normais e de Pacientes com Câncer

[000437] Anteriormente, o PSCA, aqui referido como PSCA v.1, foi identificado como um antígeno expresso em câncer de próstata. Sua expressão foi detectada em mais de 80% dos cânceres de próstata primários e na maioria das metástases de próstata. Também foi mostrado que ela é expressa em câncer de bexiga, câncer de ovário e câncer pancreático; esses cânceres são listados na Tabela I. Através de análise imunoistoquímica, foi mostrado que o PSCA é superexpresso sobre a superfície celular da maioria dos carcinomas transicionais uroteliais e em 60% dos adenocarcinomas pancreáticos primários. Dados de expressão de PSCA foram reportados 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.*, Câncer Res., 15 de Junho de 2001; 61(12): 4660-65; Reiter *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA., 17 de Fevereiro de 1998; 95(4): 1735-40; Argani *et al.*, Câncer Res., 1 de Junho de 2001; 61(11): 4320-24).

[000438] Expressão específica de diferentes variantes de PSCA é estudada em espécimes normais e de pacientes com câncer. Iniciadores foram projetados 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 bp, PSCA v.3 levou a um produto de PCR de 300 bp, enquanto

que PSCA v.5 levou a um produto de PCR de 910 bp de tamanho (Figura 1I(a)).

[000439] cDNA de primeiro filamento foi preparado a partir de bexiga, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago normais, reservatórios de câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, metástase cancerígena e câncer de pâncreas (Figura 1I(b)). Normalização foi realizada através de PCR usando iniciadores para a actina. PCR semiquantitativa, usando os iniciadores variante-específicos, foi realizada a 30 ciclos de amplificação.

[000440] Os resultados mostram expressão de PSCA v.5 principalmente em câncer de mama, metástase cancerígena e câncer de pâncreas e, em menor nível, em câncer de cólon e câncer de pulmão. O produto de PCR do PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado em câncer de próstata, câncer de bexiga, câncer de rim, câncer de cólon, câncer de pulmão, câncer de ovário, câncer de mama, metástase cancerígena e câncer de pâncreas. Entre os tecidos normais, o produto de PCR de PSCA v.1/v.2/v.4 foi detectado apenas na próstata, estômago e, em nível menor, no rim e pulmão, enquanto que o PSCA v. 5 não foi detectado em qualquer tecido normal. O produto de PCR do PSCA v.3 não foi detectado em qualquer uma das amostras testadas.

[000441] Iniciadores foram projetados para diferenciar entre PSCA v.4 e PSCA v.5 (Figura 1J(a)). PSCA v.4 levou a um produto de PCR de 460 bp, enquanto que a PSCA v.5 levou a um produto de PCR de 945 bp de tamanho.

[000442] cDNA de primeiro filamento foi preparado a partir de bexiga, cérebro, coração, rim, fígado, pulmão, próstata, baço, músculo esquelético, testículo, pâncreas, cólon, estômago normais,

reservatórios de câncer de próstata, câncer de bexiga e reservatórios de multixenoenxertos (xenoenxertos de câncer de próstata, câncer de rim e câncer de bexiga) (Figura 1J(b)). Normalização foi realizada através de PCR usando iniciadores para a actina. PCR semiquantitativa, usando os iniciadores variante-específicos, foi realizada a 30 ciclos de amplificação.

[000443] Os resultados mostram expressão de PSCA v.4 em câncer de próstata, câncer de bexiga e no reservatório de multixenoenxerto, rim e próstata normais. O PSCA v.5 foi detectado apenas em próstata normal e câncer de bexiga.

[000444] A expressão limitada de variantes de PSCA em tecidos normais e a expressão detectada em espécimes de pacientes com câncer indicam que variantes de PSCA são alvos terapêutico, prognóstico, de laboratório, profilático e diagnóstico para cânceres humanos.

Exemplo 2

Variantes com União de PSCA

[000445] Conforme usado aqui, o termo variante inclui variantes de transcrito e polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Variantes de transcrito são variantes de mRNA maduro do mesmo gene do qual se origina através de transcrição alternativa ou união alternativa. Transcritos alternativos são transcritos do mesmo gene, mas que iniciam a transcrição em diferentes pontos. Variantes com união são variantes de mRNA unidas diferentemente do mesmo transcrito. Em eucariotas, quando um gene com éxons múltiplos é transcrito a partir do DNA genômico, o RNA inicial é unido para produzir mRNA funcional, o qual tem apenas éxons e é usado para tradução em uma sequência de aminoácidos. Conseqüentemente, 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

uma única composição de éxon 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 proteínas diferentes, tais como proteínas tendo a mesma ou uma função similar ou uma função diferente. As proteínas variantes podem ser expressas no mesmo tecido ao mesmo tempo, em um tecido diferente ao mesmo tempo ou no mesmo tecido em diferentes momentos ou em um tecido diferente em momentos diferentes. As proteínas codificadas por uma variante de transcrito podem ter localizações subcelulares ou extracelulares similares ou diferentes (por exemplo, secretadas versus intracelulares).

[000446] Variantes de transcrito são identificadas através de uma variedade de métodos aceitos na técnica. Por exemplo, transcritos e variantes com união alternativos são identificados através de clonagem de comprimento total ou através de uso de transcrito de comprimento total e seqüências EST. Primeiro, todas as ESTs humanas foram agrupadas em grupos os quais mostram identidade direta ou indireta uns com os outros. A seqüência do gene original é comparada com a(s) seqüência(s) de consenso ou outras seqüências de comprimento total. Cada seqüência de consenso é uma variante com união potencial para esse gene. Várias modalidades de confirmação são conhecidas na técnica, tais como identificação da variante através de análise de Northern, clonagem de comprimento total ou através de uso de bibliotecas de sonda, etc. Mesmo quando a variante é identificada a qual 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 com uniao de comprimento total, usando métodos conhecidos na técnica.

[000447] Além disso, programas de computador estão disponíveis na

técnica os quais identificam variantes de transcrito baseado em seqüências genômicas. Programas de identificação de variantes de transcrito baseada em genômica incluem FgenesH (A. Salamov e V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA," *Genome Research.*, Abril de 2000; 10(4): 516-22); Grail (URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm) e GenScan (URL genes.mit.edu/GENSCAN.html). Para uma discussão geral de protocolos de identificação de variantes com união veja, 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 Express sequence expressões, *Proc. Natl Acad Sci U S A.*, 7 de Novembro de 2000; 97(23): 12690-3.

[000448] Para confirmar adicionalmente os parâmetros de uma variante de transcrito, uma variedade de métodos está disponível na técnica, tais como clonagem de comprimento total, validação proteômica, validação PCR-baseada e validação por 5' RACE, etc. (veja, por exemplo, Proteomic Validation: Brennan, S.O. *et al.*, Albumin banks peninsula: a new termination VARIANTE characterized through of 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 RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, *Eur J Biochem.*, 1 de Outubro de 1997; 249(1): 1-7. Para validação PCR-baseada: Wellmann S *et al.*, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants through of 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 PCR-baseada e por 5' RACE: Brigle, K.E. *et al.*, Organization of the murine reduced folate

carrier gene and identification of VARIANTE splice forms, Biochem Biophys Acta., 7 de Agosto de 1997; 1353(2): 191-8).

[000449] Sabe-se na técnica que regiões genômicas são moduladas em cânceres. Quando a região genômica à qual um gene se mapeia é modulada em um câncer em particular, os transcritos ou variantes com união alternativos do gene são modulados também. É descrita aqui que a PSCA tem um perfil particular de expressão relacionado ao câncer (veja, por exemplo, Tabela I). Transcritos e variantes com união alternativos de PSCA também estão envolvidos em cânceres, por exemplo, em um ou mais desses tecidos e em determinados tecidos adicionais também. As variantes, assim, servem como marcadores/antígenos tumor-associados.

[000450] Usando o gene de PSCA de comprimento total junto com seqüências EST, quatro variantes transcricionais adicionais foram identificadas, designadas como PSCA v.2, v.3, v.4 e v.5. Os limites de éxons no transcrito original, PSCA v.1, são mostrados na Tabela VI. As seqüências para o PSCA e as variantes de PSCA são apresentadas na Figura 1.

Exemplo 3

Polimorfismos de um Único Nucleotídeo de PSCA

[000451] Um Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (SNP) é uma variação de um único par de base em uma seqüência de nucleotídeos em um local específico. Em qualquer determinado ponto do genoma, existem quatro possíveis pares de base de nucleotídeo: A/T, C/G, G/C e T/A. Conforme usado aqui, um alelo é uma de uma série de formas alternativas de um determinado gene, diferindo quanto à seqüência de DNA e afetando um produto (RNA e/ou proteína).

[000452] Um SNP que ocorre sobre um cDNA é denominado um cSNP. Esse cSNP pode mudar aminoácidos da proteína codificada pelo gene e, assim, mudar a função da proteína. Alguns SNPs causam

doenças hereditárias; outros contribuem para variações quantitativas no fenótipo e reações a fatores ambientais, incluindo dieta e droga, entre os indivíduos. Portanto, a existência de um SNP e/ou combinações de alelos (denominadas haplótipos) têm muitas aplicações úteis, tais como diagnóstico de doenças hereditárias, determinação de reações e dosagens de drogas, identificação de genes responsáveis por doenças e análise das relações genéticas 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).

[000453] SNPs são identificados através de uma variedade de métodos aceitos 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 through of high-throughput mutation detection and genotyping technologies," Clin. Chem., Fevereiro de 2001; 47(2): 164-172). Por exemplo, SNPs são identificados através de seqüenciamento de fragmentos de DNA que mostram polimorfismo através de métodos baseados em gel, tais como polimorfismo de comprimento de fragmento por restrição (RFLP) e eletroforese em gel com gradiente de desnaturação (DGGE). Eles também são descobertos através de seqüenciamento direto de amostras de DNA

empoçadas de diferentes indivíduos ou através de comparação de seqüências de diferentes amostras de DNA. Com o acúmulo rápido de dados de seqüência em bancos de dados públicos e privados, pode-se também descobrir SNPs através de comparação de seqüências usando programas de computador (Z. Gu, L. Hillier e P. Y. Kwok, "Single nucleotide 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 seqüenciamento direto 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).

[000454] Usando os métodos descritos acima, treze SNP foram identificados no transcrito para PSCA v.2. A variante 2 foi usada, ao invés, por exemplo, da variante 1, uma vez que ela tinha 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, conforme mostrado nas Figura 1B e Figura 1G.

[000455] A alteração de nucleotídeo em v.6 mudou o códon inicial da v.1 e, assim, a tradução não pôde ser iniciada até o próximo ATG (AUG em mRNA), resultando em uma proteína 9 AA mais curta do que a proteína v.1. As alterações de nucleotídeo para v.7 e v.8 foram silenciosas a nível de proteína.

[000456] Doze desses 13 SNPs também estavam presentes na

variante 4. As variantes com 12 SNP com relação a PSCA v. 4 são designadas PSCA v. 19 a v.30. As variantes 19 a 27 codificam aminoácidos alternativos, conforme mostrado na Figura 1H.

Exemplo 4

Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Procaríotas

[000457] Para expressar PSCA recombinante e variantes de PSCA em células procaríotas, as seqüências de cDNA de PSCA e variante de PSCA de comprimento total ou parcial são clonadas em qualquer um de uma variedade de vetores de expressão conhecidos na técnica. Uma ou mais das seguintes regiões de variantes de PSCA são expressas: a seqüência de comprimento total apresentada na Figura 1 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 das mesmas.

A. Constructos de Transcrição e Tradução *In Vitro*:

[000458] pCRII: Para gerar sondas de RNA sentido e antisentido a PSCA para investigações de RNA *in situ*, estruturas pCRII (Invitrogen, Carlsbad CA) são geradas, as quais codificam todo ou fragmentos do cDNA de PSCA. O vetor pCRII tem promotores Sp6 e T7 flanqueando o inserto para acionar a transcrição de RNA de PSCA para uso como sondas em experimentos de hibridização de RNA *in situ*. Essas sondas são usadas para analisar a expressão celular e tecidual de PSCA a nível de RNA. O RNA de PSCA transcrito representando a região de codificação de aminoácidos de cDNA do gene de PSCA é usado em sistemas de tradução *in vitro*, tal como o TnT[®] Coupled Reticulolysate System (Promega, Corp., Madison, WI) para sintetizar a proteína de PSCA.

B. Constructos Bacterianos:

[000459] Estruturas pGEX: Para gerar proteínas de PSCA recombinantes em bactérias que são fundidas à proteína de Glutathione

S-transferase (GST), toda ou partes da sequência de codificação de cDNA de proteína de PSCA são clonadas na família pGEX de vetores de GST-fusão (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Essas estruturas permitem a expressão controlada de seqüências de proteína de PSCA recombinante com GST fundida ao amino-término e um epítipo com seis histidinas (6X His) no carboxi-término. As expressões GST e 6X His permitem purificação da proteína de fusão recombinante a partir de bactérias induzidas com a matriz de afinidade apropriada e permitem reconhecimento da proteína de fusão com anticorpos anti-GST e anti-His. A expressão 6X His é gerada através da adição de 6 códons de histidina ao iniciador de clonagem na extremidade 3', por exemplo, da rede de leitura aberta (ORF). Um sítio de clivagem proteolítica, tal como o sítio de reconhecimento PreScission® no pGEX-6P-1, pode ser empregado de modo a permitir clivagem da expressão GST da proteína de PSCA-relacionada. O gene de resistência à ampicilina e a origem pBR322 permitem seleção e manutenção dos plasmídeos pGEX em *E. coli*.

[000460] Constructos pMAL: Para gerar proteínas de PSCA recombinantes em bactérias, as quais são fundidas à proteína de maltose-ligação (MBP), toda ou partes da sequência de codificação de cDNA de proteína de PSCA são fundidas ao gene da MBP através de clonagem nos vetores pMAL-c2X e pMAL-p2X (New England Biolabs, Beverly, MA). Esses constructos permitem expressão controlada de seqüências de proteína de PSCA recombinante com MBP fundida no amino-término e uma expressão de epítipo 6X His no carboxi-término. As expressões MBP e 6X His permitem purificação de uma proteína recombinante de bactérias induzidas com a matriz de afinidade apropriada e permitem reconhecimento da proteína de fusão com anticorpos anti-MBP e anti-His. A expressão de epítipo 6X His é gerada através de adição de 6 códons de histidina ao iniciador de

clonagem 3'. Um sítio de reconhecimento de Fator Xa permite clivagem da expressão pMAL do PSCA. Os vetores pMAL-c2X e pMAL-p2X são otimizados para expressar uma proteína recombinante no citoplasma ou periplasma, respectivamente. Expressão no periplasma intensifica a duplicação de proteínas com ligações de dissulfeto.

[000461] Constructos pET: Para expressar o PSCA em células bacterianas, toda ou partes da seqüência de codificação de cDNA de proteína de PSCA são clonadas na família de vetores pET (Novagen, Madison, WI). Esses vetores permitem a expressão controlada de proteína de PSCA recombinante em bactérias com e sem fusão a proteínas que intensificam a solubilidade, tais como NusA e tioredoxina (Trx) e expressões de epítipo, tais como 6X His e S-Expressão®, que auxiliam na purificação e detecção de uma proteína recombinante. Por exemplo, estruturas 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 à NusA.

C. Constructos de Levedo:

[000462] Constructos pESC: Para expressar o PSCA na espécie de levedo *Saccharomyces cerevisiae* para a geração de uma proteína recombinante e estudos funcionais, toda ou partes da seqüência de codificação de cDNA de uma proteína de PSCA são clonadas na família de vetores pESC, cada um dos quais contém 1 de 4 marcadores selecionáveis, HIS3, TRP1, LEU2 e URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). Esses vetores permitem a expressão controlada, a partir do mesmo plasmídeo, de até 2 genes diferentes ou seqüências clonadas contendo as expressões de epítipo Flag® ou Myc na mesma célula de levedo. Esse sistema é útil para confirmar interações proteína-proteína de PSCA. Além disso, a expressão em levedo proporciona modificações pós-traducionais similares, tais como glicosilações e

fosforilações, que são encontradas quando de expressão em células eucariotas.

[000463] constructos pESP: Para expressar PSCA na espécie de levedo *Saccharomyces pombe*, toda ou partes da seqüência de codificação de cDNA de proteína de PSCA são clonadas na família de vetores pESP. Esses vetores permitem expressão em alto nível controlada da seqüência de uma proteína de PSCA que é fundida no amino término ou no carboxi término a GST, o que auxilia na purificação de uma proteína recombinante. Uma expressão de epítipo Flag® permite detecção de uma proteína recombinante com anticorpo anti- Flag®.

Exemplo 5

Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas Superiores

D. Constructos de Mamífero:

[000464] Para expressar PSCA recombinante em células eucariotas, as seqüências de cDNA de PSCA de comprimento total ou parcial ou variantes das mesmas podem ser clonadas em qualquer um de uma variedade de vetores de expressão conhecidos na técnica. Uma ou mais das seguintes regiões do PSCA são expressas nessas estruturas: aminoácidos 1 a 123 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 das variantes de PSCA v.1 ou análogos das mesmas.

[000465] Os constructos podem ser transfectados em qualquer uma de uma ampla variedade de células de mamífero, tais como células 293T. Lisatos de células 293T transfectadas podem ser hibridizados com o soro policlonal anti-PSCA descrito aqui.

[000466] Constructos pcDNA4/HisMax: Para expressar PSCA em células de mamífero, a ORF de PSCA ou porções da mesma é clonada no pcDNA4/HisMax Versão A (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de citomegalovírus (CMV) e do intensificador traducional SP16. Uma proteína recombinante tem epítomos Xpress™ e seis histidinas (6X His) fundidos ao amino-término. O vetor pcDNA4/HisMax também contém o sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e a seqüência de término de transcrição para intensificar a estabilidade do mRNA, junto com a origem SV40 para replicação epissômica e resgate simples do vetor em linhagens de células expressando o grande antígeno T. O gene de resistência à Zeocina permite seleção de células de mamífero expressando a proteína e o gene de resistência à ampicilina e a origem ColE1 permitem seleção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

[000467] Constructos pcDNA3.1/MycHis: Para expressar o PSCA em células de mamífero, a ORF de PSCA ou porções da mesma, com um sítio de início de tradução de consenso de Kozak, foi clonada no pcDNA3.1/MycHis Versão A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). As proteínas recombinantes têm o epítipo myc e o epítipo 6X His fundidos ao carbóxi-término. O vetor pcDNA3.1/MycHis também contém o sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e a seqüência de término de transcrição para intensificar a estabilidade do mRNA, junto com a origem SV40 para replicação epissômica e resgate simples do vetor em linhagens de células expressando o grande antígeno T. O gene de resistência à neomicina pode ser usado, uma vez que ele permite seleção de células de mamífero expressando a proteína e o gene de resistência à ampicilina e a origem ColE1 permitem seleção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

[000468] Constructo pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO: Para expressar o PSCA em células de mamífero e permitir detecção das proteínas

recombinantes usando fluorescência, a ORF de PSCA ou porções da mesma, com um sítio de início de tradução de consenso de Kozak, é clonada no pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). As proteínas recombinantes têm a Proteína Verde Fluorescente (GFP) fundida ao carboxi-término, facilitando a detecção não-invasiva *in vivo* e estudos de biologia celular. O vetor pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO também contém o sinal de poliadenilação do hormônio de crescimento bovino (BGH) e a sequência de término de transcrição para intensificar estabilidade do mRNA, junto com a origem SV40 para replicação epissômica e resgate simples do vetor em linhagens de células expressando o grande antígeno T. O gene de resistência à neomicina permite seleção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência à ampicilina e a origem ColE1 permitem seleção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Constructos adicionais com uma fusão de GFP amino-terminal são feitas no pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO, abrangendo o comprimento inteiro de uma proteína de PSCA.

[000469] pAPtag: A ORF de PSCA ou porções da mesma é clonada no pAPtag-5 (GenHunter Corp. Nashville, TN). Esse constructo gera uma fusão com fosfatase alcalina no carboxi-término de uma proteína de PSCA, ao mesmo tempo em que funde a sequência sinalizadora de IgGk ao amino-término. São também gerados constructos nos quais fosfatase alcalina com uma sequência sinalizadora de IgGk amino-terminal é fundida ao amino-término de uma proteína de PSCA. As proteínas de PSCA recombinantes resultantes são otimizadas com relação à secreção em meio de células de mamífero transfectadas e podem ser usadas para identificar proteínas, tais como ligantes ou receptores que interagem com proteínas de PSCA. Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de CMV e as proteínas recombinantes também contêm epítopos myc e 6X His fundidos no

carbóxi-término que facilitam a detecção e purificação. O gene de resistência à Zeocina presente no vetor permite seleção de células de mamífero expressando a proteína e o gene de resistência à ampicilina permite seleção do plasmídeo em *E. coli*.

[000470] ptag5: A ORF de PSCA ou porções da mesma foi clonada no pTag-5. Esse vetor é similar ao pAPtag, mas sem a fusão com fosfatase alcalina. Essa estrutura gera proteína de PSCA com uma seqüência sinalizadora de IgGk amino-terminal e expressões de epítipo myc e 6X His no carbóxi-término que facilitam a detecção e purificação por afinidade. A proteína de PSCA recombinante resultante é otimizada com relação à secreção no meio de células de mamífero transfectadas e é usada como imunogênio ou ligante para identificar proteínas, tais como ligantes ou receptores que interagem com as proteínas de PSCA. Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de CMV. O gene de resistência à Zeocina presente no vetor permite seleção de células de mamífero expressando a proteína e o gene de resistência à ampicilina permite seleção do plasmídeo em *E. coli*.

[000471] psecFc: A ORF do PSCA ou porções da mesma foi clonada no psecFc. O vetor psecFc foi montado através de clonagem da Fc de imunoglobulina humana G1 (IgG) (dobradiça, regiões CH2, CH3) no pSecTag2 (Invitrogen, Califórnia). Esse constructo gera uma fusão de Fc de IgG1 no carbóxi-término de proteínas de PSCA, ao mesmo tempo em que funde a seqüência sinalizadora de IgGK ao N-término. Fusões de PSCA utilizando a região Fc de IgG1 de murina são também usadas. As proteínas de PSCA recombinantes resultantes são otimizadas para secreção no meio de células de mamífero transfectadas e podem ser usadas como imunogênios ou para identificar proteínas, tais como ligantes ou receptores que interagem com a proteína de PSCA. A expressão da proteína é acionada a partir

do promotor de CMV. O gene de resistência à higromicina presente no vetor permite seleção de células de mamífero que expressam uma proteína recombinante e o gene de resistência à ampicilina permite a seleção do plasmídeo em *E. coli*.

[000472] A Figura 8 mostra a expressão e purificação de proteína de PSCA.psecFc de células 293T.

[000473] Constructo pSR α : Para gerar linhagens de células de mamífero que expressam o PSCA constitutivamente, a ORF do PSCA ou porções da mesma foram clonadas em estruturas pSR α . Retrovírus anfotrópicos e ecotrópicos foram gerados através de transfecção de estruturas pSR α na linhagem de acondicionamento 293T-10A1 ou co-transfecção de pSR α e um plasmídeo auxiliar (contendo seqüências de acondicionamento deletadas) em células 293, respectivamente. O retrovírus é usado para infectar uma variedade de linhagens de células de mamífero, resultando na integração do gene clonado, PSCA, nas linhagens de células hospedeiras. A expressão da proteína é acionada a partir de uma repetição terminal longa (LTR). O gene de resistência à neomicina presente no vetor permite a seleção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência à ampicilina e a origem ColE1 permitem seleção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Os vetores retrovirais podem, após o que, ser usados para infecção e geração de várias linhagens de células usando, por exemplo, células PC3, NIH 3T3, TsuPr1, 293 ou rat-1.

[000474] A Figura 6 mostra a expressão de PSCA em linhagens de células recombinantes de murina, rato e humana usando a estrutura PSCA.pSR α . As linhagens de células de murina, rato e humana indicadas foram infectadas com retrovírus trazendo o cDNA de PSCA humana e um gene de resistência à neomicina ou apenas com o gene de resistência à neomicina. Linhagens de células recombinantes estáveis foram criadas através de seleção com droga G418. A

expressão de PSCA foi determinada através de coloração por FACS com o anti-MAb de PSCA 1G8 (5 ug/ml). É mostrado o perfil de FACS de cada linhagem de célula, mostrando um desvio fluorescente apenas na linhagem infectada com PSCA, indicando expressão de PSCA na superfície celular. Essas linhagens são úteis no desenvolvimento de MAbs como antígenos, reagentes de seleção de MAb e em ensaios funcionais.

[000475] Constructos pSR α adicionais são feitos os quais fundem uma expressão de epítipo, tal como a expressão FLAG[®], ao carboxi-termino de seqüências de PSCA para permitir detecção usando anticorpos anti-Flag. Por exemplo, a seqüência 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEQ ID NO: 76) da FLAG[™] é adicionada a um iniciador de clonagem na extremidade 3' da ORF. Constructos pSR α adicionais são feitos para produzir proteínas de fusão de GFP e myc/6X His amino-terminais e carboxi-terminais de proteínas de PSCA de comprimento total.

[000476] Vetores Virais Adicionais: Constructos adicionais são feitos para distribuição e expressão viral-mediada de PSCA. Elevada titulação de vírus que leva à expressão em alto nível de PSCA é obtida em sistemas de distribuição viral, tal como vetores adenovirais e vetores de amplicon de herpes. As seqüências de codificação de PSCA ou fragmentos das mesmas são amplificados através de PCR e subclonados no vetor de desvio AdEasy (Stratagene). Recombinação e acondicionamento de vírus são realizados de acordo com as instruções do fabricante para gerar vetores adenovirais. Alternativamente, as seqüências de codificação de PSCA ou fragmentos das mesmas são clonados no vetor HSV-1 (Imgenex) para gerar vetores virais de herpes. Os vetores virais são, após o que, usados para infecção de várias linhagens de células, tais como células PC3, NIH 3T3, 293 ou rat-1.

[000477] Sistemas de Expressão Regulados: Para controlar a expressão de PSCA em células de mamífero, seqüências de codificação de PSCA ou porções das mesmas são clonadas em sistemas de expressão de mamífero regulados, tais como o T-Rex System (Invitrogen), o GeneSwitch System (Invitrogen) e o Tightly-Regulated Ecdysone System (Sratagene). Esses sistemas permitem o estudo dos efeitos temporais e concentração-dependentes do PSCA recombinante. Esses vetores são, após o que, usados para controlar a expressão de PSCA em várias linhagens de células, tais como células PC3, NIH 3T3, 293 ou rat-1.

E. Sistemas de Expressão de Baculovírus

[000478] Para gerar proteínas de PSCA recombinantes em um sistema de expressão de baculovírus, a ORF do PSCA ou porções da mesma são clonadas no vetor de transferência de baculovírus pBlueBac 4.5 (Invitrogen), o qual proporciona uma His-expressão no N-término. Especificamente, o pBlueBac-PSCA é co-transfectado com o plasmídeo auxiliar pBac-N-Blue (Invitrogen) em células de inseto SF9 (*Spodoptera frugiperda*) para gerar baculovírus recombinante (veja manual de instruções da Invitrogen para detalhes). O baculovírus é, então, coletado dos sobrenadantes de células e purificado através de um ensaio de placa.

[000479] Proteína de PSCA recombinante é, então, gerada através de infecção de células de inseto HighFive (Invitrogen) com baculovírus purificado. Proteína de PSCA recombinante pode ser detectada usando anticorpo anti-PSCA ou anti-His-expressão. A proteína de PSCA pode ser purificada e usada em vários ensaios baseados em célula ou como imunogênio para gerar anticorpos policlonais e monoclonais específicos para PSCA.

F. Vetores de Expressão Para Ortólogos de PSCA

[000480] Ortólogos de PSCA de camundongo e macaco foram

clonados no pcDNA3,1/MycHis Versão A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). As proteínas recombinantes têm um epítipo myc e um epítipo 6X His fundidos ao carbóxi-término. Esses vetores permitem a expressão de ortólogos de PSCA para ensaiar a reação cruzada de antianticorpos monoclonais de PSCA humano.

[000481] Ortólogos de PSCA de camundongo e macaco também foram clonados em estruturas pSR α . Os constructos pSR α permitem a geração de linhagens de células de mamífero que expressam ortólogos de PSCA constitutivamente. Expressão da proteína é acionada a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). As proteínas recombinantes têm o epítipo myc e o epítipo 6X His fundidos ao carbóxi-término. Esses vetores permitem a expressão de ortólogos de PSCA para ensaiar a reação cruzada de antianticorpos monoclonais de PSCA humana e estudar a atividade funcional de ortólogos de PSCA. Retrovírus anfotrópicos e ecotrópicos foram gerados através de transfecção das estruturas pSR α na linhagem de acondicionamento 293T-10A1 ou co-transfecção de pSR α e um plasmídeo auxiliar (contendo seqüências de acondicionamento deletadas) nas células 293, respectivamente. O retrovírus é usado para infectar uma variedade de linhagens de células de mamífero, resultando na integração do gene clonado, ortólogo de PSCA, nas linhagens de células hospedeiras.

[000482] A Figura 7 mostra a expressão PSCA.pcDNA3.1/MycHis de camundongo e símio após transfecção em células 293T. Células 293T foram transfectadas com PSCA.pcDNA3.1/MycHis de camundongo ou PSCA.pcDNA3,1/ MycHis de símio ou controle de vetor pcDNA3.1/MycHis. Quarenta horas depois, as células foram coletadas e analisadas através de citometria de fluxo usando anticorpos monoclonais anti-PSCA.

Exemplo 6

Perfis de Antigenicidade e Estrutura Secundária

[000483] Os perfis de aminoácido de variantes 1, 3 e 4 de PSCA foram encontrados acessando o website ProtScale na World Wide Web em (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) no servidor de biologia molecular ExPasy.

[000484] Esses perfis: Hidrofilicidade (Hopp T.P., Woods K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828); Hidropaticidade (Kyte J., Doolittle R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132); resíduos Acessíveis Percentuais (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); Flexibilidade Média (Bhaskaran R. e Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); Beta-Giro (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294); e opcionalmente outros disponíveis na técnica, tal como no website ProtScale, foram usados para identificar regiões antigênicas de cada uma das proteínas variantes de PSCA. Cada um dos perfis de aminoácido de variantes de PSCA acima foi gerado usando os seguintes parâmetros do ProtScale para análise: 1) um tamanho de janela de 9; 2) 100% de peso das bordas de janela comparado com o centro da janela; e 3) valores de perfil de aminoácido normalizados para oscilar entre 0 e 1.

[000485] Os perfis de Hidrofilicidade, Hidropaticidade e Resíduos Acessíveis Percentuais foram usados para determinar trechos de aminoácidos hidrofílicos (isto é, valores maiores do que 0,5 sobre os perfis de Hidrofilicidade e Resíduos Acessíveis Percentuais e valores menores do que 0,5 sobre o Perfil de Hidropaticidade). Tais regiões sendo expostas ao ambiente aquoso, provavelmente estão presentes sobre a superfície de uma proteína e, assim, disponíveis para reconhecimento imune, tal como por anticorpos.

[000486] Os perfis de Flexibilidade Média e Beta-Giro determinam trechos de aminoácidos (isto é, valores maiores do que 0,5 sobre o

perfil de Beta-Giro e o perfil de Flexibilidade Média) que não estão retidos em estruturas secundárias, tais como beta folhas e alfa hélices. Tais regiões também estão, mais provavelmente, expostas sobre uma proteína e, assim, acessíveis ao reconhecimento imune, tal como por anticorpos.

[000487] Seqüências antigênicas das proteínas variantes de PSCA indicadas, por exemplo, através dos perfis descritos acima, são usadas para preparar imunogênios, peptídeos ou ácidos nucleicos que codificam os mesmos, para gerar antianticorpos de PSCA terapêuticos e diagnósticos. O imunogênio 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, de uma variante de proteína de PSCA listada na Figura 1, da qual os perfis de aminoácido podem ser inferidos em virtude do fato de a variante conter uma seqüência que é a mesma que a variante representada. Em particular, os imunogênios peptídicos da invenção podem compreender uma região peptídica de pelo menos 5 aminoácidos da Figura 1 em qualquer incremento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 no perfil de hidrofiliabilidade; uma região peptídica de pelo menos 5 aminoácidos da Figura 1 em qualquer incremento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor menor do que 0,5 no perfil de hidrofiliabilidade; uma região peptídica de pelo menos 5 aminoácidos da Figura 1 em qualquer incremento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 nos perfis de Resíduos Percentuais Acessíveis; uma região peptídica de pelo menos 5 aminoácidos da Figura 1 em qualquer incremento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 nos Perfis de Flexibilidade Média; e uma região peptídica de pelo

menos 5 aminoácidos da Figura 1 em qualquer incremento de número inteiro que inclui uma posição de aminoácido tendo um valor maior do que 0,5 no Perfil de Beta-Giro. Os imunogênios peptídicos da invenção também podem compreender ácidos nucleicos que codificam qualquer um dos precedentes.

[000488] Todos os imunogênios, peptídeos ou ácidos nucleicos da invenção podem ser concretizados na forma de dose unitária humana ou compreendido por uma composição que inclui um excipiente farmacêutico compatível com a fisiologia humana.

[000489] A estrutura secundária das variantes de proteína 1, 3, 4 e 6 de PSCA, isto é, a presença e localização previstas de filamentos estendidos com alfa hélices e espirais aleatórias, é prevista a partir da seqüência de aminoácidos primária usando o método HNN - Hierarchical Neural Nedoisk (NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS, Março de 2000, Vol. 25, No 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), acessado a partir do servidor de biologia molecular ExPasy localizado na World Wide Web em (expasy.ch/tools/). A análise indica que a variante 1 de PSCA é composta de 30,89% de alfa hélice, 21,95% de filamento estendido e 47,15% de espiral aleatória. A variante 3 de proteína de PSCA é composta de 14,89% de alfa hélice, 8,51% de filamento estendido e 76,60% de espiral aleatória. A variante 4 de proteína de PSCA é composta de 9,52% de alfa hélice, 8,99% de filamento estendido e 81,48% de espiral aleatória. A variante 6 de proteína de PSCA é composta de 24,56% de alfa hélice, 21,93% de filamento estendido e 53,51% de espiral aleatória.

[000490] Análise com relação à presença potencial de domínios transmembrana nas proteínas variantes de PSCA foi realizada usando uma variedade de algoritmos de previsão de transmembrana

acessados no servidor de biologia ExPasy localizado na World Wide Web em (.expasy.ch/tools/).

Exemplo 7

Geração de Anticorpos Policlonais de PSCA

[000491] Anticorpos policlonais podem ser estimulados em um mamífero, por exemplo, através de uma ou mais injeções de um agente de imunização e, se desejado, um adjuvante. Tipicamente, o agente de imunização e/ou adjuvante será injetado no mamífero através de múltiplas injeções subcutâneas ou intraperitoneais. Além de imunização com uma variante de proteína de PSCA de comprimento total, algoritmos de computador são empregados no design de imunogênios que, baseado em análise da seqüência de aminoácidos, contêm características de serem antigênicos e disponíveis para reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro imunizado (veja o Exemplo intitulado "Perfis de Antigenicidade e Estrutura Secundária"). Tais regiões serão previstas como sendo hidrofílicas, flexíveis, com conformações em beta-giro e estarão expostas sobre a superfície de uma proteína.

[000492] Por exemplo, proteínas de fusão bacterianas recombinantes ou peptídeos contendo regiões hidrofílicas, flexíveis, de beta-giro de variantes de proteína de PSCA são usadas como antígenos para gerar anticorpos policlonais em coelhos New Zealand White ou anticorpos monoclonais, conforme descrito no Exemplo intitulado "Geração de Anticorpos Monoclonais (MAbs) de PSCA". Por exemplo, na variante 1 de PSCA, tais regiões incluem, mas não estão limitadas a, aminoácidos 28-56 e aminoácidos 66-94. Para a variante 3, tais regiões incluem, mas não estão limitadas a, aminoácidos 7-39 e aminoácidos 70-94. Para a variante 4, tais regiões incluem, mas não estão limitadas a, aminoácidos 6-18, aminoácidos 27-39, aminoácidos 103-133 e 177-189. Para a variante 6, tais regiões incluem, mas não

estão limitadas a, 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 do caramujo *Megathura crenulata* (KLH), albumina do soro, tiroglobulina bovina e inibidor de tripsina de soja. Em uma modalidade, um peptídeo 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 seqüências de aminoácidos de variantes de PSCA podem ser fundidas, usando técnicas de DNA recombinante, a qualquer um de uma variedade de parceiros de proteína de fusão que são bem-conhecidos na técnica, tais como glutathione-S-transferase (GST) e proteínas de fusão HIS-ligadas. Em uma modalidade, a seqüência da variante 1 de PSCA, aminoácidos 18-98, foi fundida à GST usando técnicas recombinantes no vetor de expressão pGEX, expressa, purificada e usada para imunizar coelhos e camundongos para gerar anticorpos policlonais e anticorpos monoclonais, respectivamente. Tais proteínas de fusão são purificadas a partir de bactérias induzidas usando a matriz de afinidade apropriada.

[000493] Outras proteínas de fusão bacterianas recombinantes que podem ser empregadas incluem proteína de ligação à maltose, LacZ, tioredoxina, NusA ou uma região constante de imunoglobulina (veja a seção 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).

[000494] Além de proteínas de fusão derivadas de bactérias, antígenos de proteína expressos em mamífero também são usados. Esses antígenos são expressos a partir de vetores de expressão de mamífero, tais como os vetores Tag5 e Fc-fusão (veja a seção intitulada "Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas") e retêm as modificações pós-traducionais, tais como glicosilações encontradas na proteína nativa. Em uma modalidade, o cDNA da variante 1 de PSCA, menos o peptídeo líder N-terminal e a âncora de GPI C-terminal, foi clonado no vetor de secreção de mamífero Tag5 e expresso em células 293T. A proteína recombinante foi purificada através de cromatografia com quelato de metal a partir de sobrenadantes de cultura tecidual de células 293T que expressam estavelmente o vetor recombinante. A proteína de PSCA Tag5-purificada foi, então, usada como imunogênio.

[000495] Durante o protocolo de imunização, é útil misturar ou emulsificar o antígeno 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 Lipídio A, dicorinomicolato de trealose sintético).

[000496] Em um protocolo típico, coelhos são inicialmente imunizados subcutaneamente com até 200 µg, tipicamente 100-200 µg, de proteína de fusão ou peptídeo conjugado à KLH misturado em adjuvante Completo de Freund (CFA). Os coelhos são, então, injetados subcutaneamente a cada duas semanas com até 200 µg, tipicamente 100-200 µg, do imunogênio em adjuvante incompleto de Freund (IFA). Amostras de sangue de teste são coletadas aproximadamente 7-10 dias após cada imunização e usadas para monitorar a titulação do anti-soro através de ELISA.

[000497] Para testar a reatividade e especificidade do soro imune, tal

como soro de coelho derivado de imunização com uma GST-fusão de variante 3 ou 4 de proteína de PSCA, o respectivo cDNA da variante de PSCA de comprimento total é clonado no vetor de expressão pCDNA 3.1 myc-his (Invitrogen, veja o Exemplo intitulado "Produção de PSCA Recombinante em Sistemas Eucariotas"). Após transfecção das estruturas em células 293T, os lisatos de célula são hibridizados com o anticorpo anti-His e antivariante de soro (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) para determinar a reatividade 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 293T e outras células expressando variante de PSCA recombinantes para determinar o reconhecimento específico da proteína nativa. 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 reatividade e especificidade.

[000498] Anti-soros de coelhos imunizados com proteínas de fusão de variantes de PSCA, tais como proteínas de fusão de GST e MBP, são purificados através de eliminação de anticorpos reativos à seqüência do parceiro de fusão por meio 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-soros derivados de uma proteína de fusão da variante 1 de PSCA-GST são primeiro purificados através de passagem sobre uma coluna de proteína GST covalentemente acoplada à 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 MBP-PSCA covalentemente acoplada à matriz AffiGel. O soro é, então, ainda purificado através de cromatografia por afinidade em

proteína G a fim de isolar a fração de IgG. Soro de outros coelhos imunizados com antígenos His-ligados e peptídeos, bem como soros com parceiro de fusão deletados, são purificados por afinidade através de passagem sobre uma matriz de coluna composta de imunogênio de proteína original ou peptídeo livre.

Exemplo 8

Geração de Anticorpos Monoclonais de PSCA (MAbs)

[000499] Em uma modalidade, anticorpos monoclonais terapêuticos ("MAbs") a PSCA e variantes de PSCA compreendem aquelas que reagem com epítomos específicos para cada proteína ou específicos para seqüências em comum entre as variantes que inibiriam, internalizariam, romperiam ou modulariam a função biológica de PSCA ou variantes de PSCA, por exemplo, aquelas que romperiam a interação com ligantes e parceiros de ligação. Imunogênios para a geração de tais MAbs incluem aqueles projetados para codificar ou conter o domínio extracelular ou a seqüência inteira da proteína de PSCA, regiões previstas como contendo motivos funcionais e regiões de variantes de uma proteína de PSCA previstas como sendo antigênicas a partir de análise por computador da seqüência de aminoácidos. Imunogênios incluem peptídeos, proteínas bacterianas recombinantes, tais como proteínas de fusão GST-PSCA (Figura 8) e proteína de vetor pET de PSCA His-ligado (Figura 6) e proteínas His-ligadas purificadas expressas de mamífero (Figura 7) e proteínas de fusão de FC de IgG humana e de murina. Além disso, células manipuladas através de transdução retroviral para expressar altos níveis de variante 1 de PSCA, tais como RAT1-PSCA, 293T-PSCA, 3T3-PSCA ou 300.19-PSCA, são usadas para imunizar camundongos (Figura 5).

[000500] Para gerar anticorpos monoclonais a PSCA, camundongos foram primeiro imunizados nas almofadas das patas (FP), tipicamente

com

5-50 µg de um imunogênio de proteína ou entre 10^6 e 10^7 células expressando PSCA misturadas em um adjuvante adequado. Exemplos de adjuvantes adequados para imunizações FP são TiterMax (Sigma) para a injeção inicial FP, seguido por gel de alume com Immuneasy (Qiagen). Após a injeção inicial, os camundongos foram subsequentemente imunizados duas vezes por semana até o momento em que eles são sacrificados e células B obtidas do nódulo linfático usadas para fusão.

[000501] Durante o protocolo de imunização, amostras de sangue de teste foram coletadas para monitorar a titulação e especificidade da resposta imune. Na maioria dos casos, uma vez que reatividade e especificidade apropriadas são obtidas, conforme determinado através de análises por ELISA, Western blotting, imunoprecipitação, microscopia por fluorescência ou citometria de fluxo, fusão e geração de hibridoma foi, então, realizada usando fusão de eletrocélulas (BTX e CM2000).

[000502] Em uma modalidade, a invenção proporciona anticorpos monoclonais designados Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.121 e Ha1-4.37. Os anticorpos foram identificados e foi mostrado que reagem e se ligam a PSCA na superfície celular ou imobilizada.

[000503] Os MAbs a PSCA foram gerados usando a Tecnologia XenoMice®, em que os locais da cadeia leve kappa e pesada de murina foram inativados e a maioria dos locais de imunoglobulina de cadeia leve kappa e pesada humana tinham sido inseridos: Ha1-1.16 foi gerado após imunização de Xenomice que produzem gama 1 humana (13 vezes com PSCA-GST); Ha1-5.99 foi gerado após imunização de Xenomice que produzem gama 2 humana 6 times com células Rat1-PSCA, seguido por duas injeções com PSCA-tag5; Ha1-

4.117, HA1-4.37, Ha1-4.120 e Ha1-4.121 foram gerados após imunização de Xenomice que produzem gama 1 humana 6 vezes com células Rat1-PSCA, seguido por 4 injeções com PSCA-tag5. Os anti-MAbs de PSCA Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120 e Ha1-4.121 se ligam à PSCA na superfície celular endógena expressa em células de xenoenxerto de câncer de próstata.

[000504] Os anticorpos designados Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.37, Ha1-1.16 e Ha1-4.121 foram enviados (via Federal Express) para a American Type Culture Collection (ATCC), Caixa Postal 1549, Manassas, VA 20108 em 04 de Maio de 2004 e atribuídos os Números de Acesso PTA-6703 e PTA-6699 e PTA-6700 e PTA-6702 e PTA-6698 e PTA-6701, respectivamente.

[000505] As seqüências de codificação de DNA para os anti MAbs de PSCA Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.121 e Ha1-4.37 foram determinadas após isolamento de mRNA das respectivas células de hibridoma com reagente Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). RNA total foi purificado e quantificado. cDNAs de primeiro filamento foram gerados a partir do RNA total com preparação com oligo (dT)₁₂ usando o sistema de Pré-amplificação Gibco BRL Superscript. cDNA de primeiro filamento amplificado usando iniciadores da cadeia pesada variável de imunoglobulina humana e iniciadores da cadeia leve variável de imunoglobulina humana. Os produtos de PCR foram clonados no vetor pCRScript (Stratagene, La Jolla). Vários clones foram seqüenciados e as regiões de cadeia leve e pesada variáveis determinadas. As seqüências de ácido nucléico e aminoácidos das regiões de cadeia leve e pesada variáveis são listadas nas Figura 2 e Figura 3. Alinhamento de anticorpos de PSCA com as seqüências da linhagem germinativa V-D-J é mostrado na Figura 4A – Figura 4M.

Exemplo 9

Seleção e Identificação de Anticorpos de PSCA

[000506] Anticorpos gerados usando os procedimentos apresentados no exemplo intitulado "Geração de Anticorpos Monoclonais (MAbs) de PSCA" foram selecionados e identificados usando uma combinação de ensaios, incluindo ELISA, FACS, agrupamento de epítopo e afinidade pela PSCA expressa sobre a superfície celular.

A. Seleção de MAb de PSCA Humana Através de FACS

[000507] Uma seleção primária de hibridoma para MAbs a PSCA foi realizada através de FACS. O protocolo foi como segue: 50 ul/cavidade de sobrenadante de hibridoma (puro) ou anticorpos purificados (em diluições em serie) foram adicionados a lâminas de FACS com 96 cavidades e misturados com células que expressam PSCA (endógenas ou recombinantes, 50.000 células/cavidade). A mistura foi incubada a 4°C durante duas horas. Ao final da incubação, as células foram lavadas com Tampão de FACS e incubadas com 100 ul de anticorpo de detecção (anti-hlgG-PE) durante 45 minutos a 4°C. Ao final da incubação, as células foram lavadas com Tampão de FACS, fixadas com Formaldeído e analisadas usando FACScan. Os dados foram analisados usando o software CellQuest Pro. Os histogramas cheios indicam os dados de células de controle negativo e os histogramas abertos representam dados de células PSCA-positivas (Figura 9).

[000508] Hibridomas positivos identificados a partir de seleções primárias foram transferidos para lâminas com 24 cavidades e os sobrenadantes coletados para seleções confirmatórias. Seleções confirmatórias incluíam análise por FACs sobre B300.19-PSCA/300.19-neo, Rat1-PSCA/Rat1-neo, PC3-PSCA/neo, SW780 (linhagem de células de câncer de bexiga), LAPC9AI (linhagem de células de câncer de próstata), HPAC (linhagem de células de câncer pancreático) e ensaio ELISA usando Tag5-PSCA, GST-PSCA, GST-

PSCA N-term, Med. C-Term e pET-PSCA.

B. Análise de Afinidade Relativa do MAb de PSCA Humana

[000509] Os sobrenadantes de hibridoma foram testados para determinar sua afinidade de ligação relativa a PSCA na superfície celular. Os sobrenadantes de hibridoma foram serialmente diluídos em tampão de FACS (FB), de $\mu\text{g/ml}$ para sub- ng/ml ; e avaliados em um ensaio de ligação por FACS usando células LAPC9AI. Anticorpos com elevada afinidade proporcionam maiores valores de MFI. Os valores de MFI de cada ponto foram obtidos usando o software CellQuest Pro e usados para cálculo da afinidade usando o software Graphpad Prism (Tabela VII e Tabela VIII): Equação de Dose-Resposta Sigmoidal (declínio variável). Os resultados da análise de afinidade relativa são apresentados na Figura 10.

C. Agrupamento de Epítipo

[000510] Anticorpos de PSCA foram agrupados de acordo com o epítipo através de avaliação de seu padrão de ligação sobre células LAPC9AI. Em resumo, uma pequena quantidade de cada um dos anticorpos foi biotinilada; então, cada um dos anticorpos biotinilados foi incubado com LAPC9AI na presença de quantidade em excesso (100 x) de anticorpo não-biotinilados a 4°C no decorrer de 1 hora durante incubação. Geralmente, uma quantidade em excesso de anticorpos competirá com os anticorpos biotinilados se eles se ligam ao mesmo epítipo. Ao final da incubação, as células foram lavadas e incubadas com Estreptavidina-PE durante 45 min a 4°C . Após lavagem da estreptavidina-PE não ligada, as células foram analisadas usando FACS. Determinações do MFI foram usadas para análise de dados (Tabela VII). Conforme mostrado na Tabela XI, as células realçadas em amarelo indicam autocompetição (competição de 100%), o MFI nessas células são o controle de base para cada anticorpo biotinilado. Células sem cor indicam que os dois anticorpos competem um com o

outro (baixo MFI), elevado MFI (realçado em azul) indica que os dois anticorpos se ligam a dois epítomos distintos. Os anticorpos que têm o mesmo padrão de ligação se ligam ao mesmo epítomo entre os anticorpos. Existem 6 grupos de epítomo dentro dos anticorpos testados. A Tabela XI mostra que PSCA 4.121 se liga a seu único epítomo.

Exemplo 10

Caracterização e Expressão de Anticorpos de PSCA

A. Reatividade Cruzada com PSCA de Macaco e PSCA de Camundongo

[000511] MAbs foram selecionados e caracterizados com relação à sua capacidade de reagir com PSCA originário de camundongo e símios. Essa propriedade é útil para compreender as consequências do encaixe do MAb de PSCA sobre células e tecidos quando usando modelos com animais em camundongos e símios. Os genes de PSCA de macaco *Cynomologus* e de camundongo foram clonados, expressos em um retrovírus e transitoriamente infectados em células 293T. _____ foram incubados com os respectivos anticorpos usando o seguinte protocolo. Anticorpos de teste foram incubados com células 293T expressando PSCA de macaco *Cynomologus* ou de murina sobre células 293T expressando o gene-neo apenas como um controle negativo. Reconhecimento específico foi determinado usando anticorpo de detecção secundário anti-hIgG-PE. Um histograma representativo representando a reatividade cruzada especificada é apresentado na Figura 11. O sumário apresentado na Tabela X mostra que todos, menos um dos anticorpos anti-PSCA humana têm reação cruzada com PSCA de macaco e somente um anticorpo anti-PSCA humana reage cruzadamente com a PSCA de camundongo.

B. Determinação de Afinidade Através de FACS

[000512] Um painel de sete (7) anticorpos anti-PSCA humana foi

testado com relação à sua afinidade de ligação a PSCA sobre células SW780, uma linhagem de células de câncer de bexiga humano que expressa um alto nível de PSCA. 23 diluições em série de 1:2 de anticorpos purificados foram incubadas com células SW780 (50.000 células por cavidade) durante a noite a 4°C, com uma concentração final de 167 nM a 0,01 pM. Ao final da incubação, as células foram lavadas e incubadas com anticorpo de detecção anti-hIgG-PE durante 45 min a 4°C. Após lavagem dos anticorpos de detecção não ligados, as células foram analisadas através de FACS; os valores de MFI de cada ponto foram obtidos usando o software CellQuest Pro e foram usados para cálculo da afinidade usando o software Graphpad Prism: Equação de Dose-Resposta Sigmoidal (declínio variável) (Tabela VII e Tabela VIII). Os valores de afinidade dos sete (7) anticorpos são apresentados na Tabela IX.

Exemplo 11

Internalização de Anticorpo de PSCA

[000513] A internalização de Ha1-4.121 foi estudada usando células PC3-PSCA. Em resumo, Ha1-4.121 foi incubado com as células a 4°C durante 90 minutos para permitir ligação dos anticorpos à superfície celular. As células foram, então, divididas em dois grupos e a incubação continuada a 37°C para permitir internalização do anticorpo ou a 4°C como controles (sem internalização). Uma lavagem ácida após incubação a 37°C/4°C foi empregada para remover o PSCA 4.121 ligado sobre a superfície celular. Subseqüente permeabilização permitiu detecção de anticorpos ligados à PSCA internalizada. Após incubação com anticorpos de detecção secundários, as células foram analisadas usando FACS ou observadas sob um microscópio de fluorescência. Aproximadamente 30% do Ha1-4.121 internalizaram após incubação a 37°C durante duas horas (Figura 12).

Exemplo 12

Morte Secundária Anticorpo-Mediada

[000514] Anticorpos de PSCA mediam a morte saporina-dependente em células expressando PSCA. Células expressando B300.19–PSCA (750 células/cavidade) foram cultivadas em uma lâmina com 96 cavidades no dia 1. No dia seguinte, um volume igual de meio contendo 2X a concentração do anticorpo primário indicado junto com um excesso de 2 vezes de anticorpo policlonal anti-humano (Hum-Zap) ou anti-cabra (Goat-Zap) conjugado com toxina saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) foram adicionados a cada cavidade. As células foram deixadas incubar durante 5 dias a 37 graus C. Ao final do período de incubação, MTS (Promega) foi adicionado a cada cavidade e a incubação continuada durante mais 4 horas. A OD a 450 nM foi determinada. Os resultados na Figura 13(A) mostram que anticorpos de PSCA HA1-4.121 e HA1-4.117 mediaram a citotoxicidade saporina-dependente em células B300.19-PSCA, enquanto que um anticorpo de controle, IgG1 humana não específica, não teve efeito. Os resultados na Figura 13(B) mostram que a adição de um anticorpo secundário saporina-conjugado que não reconhece a Fc humana, falhou em mediar a citotoxicidade (Figura 13(A) e Figura 13(B)). Esses resultados indicam que drogas ou proteínas citotóxicas podem ser seletivamente distribuídas a células que expressam PSCA usando um anti-MAb de PSCA apropriado.

Exemplo 13

Citotoxicidade Mediada por Anticorpo Imune

[000515] Anticorpos de PSCA foram avaliados para determinar sua capacidade de mediar a citotoxicidade imune dependente. Anticorpos de PSCA (0–50 µg/ml) foram diluídos com tampão RHB (RPMI 1640, Gibco Life Technologies, HEPES a 20 mM). Células expressando B300.19-PSCA foram lavadas em tampão RHB e ressuspensas em uma densidade de 10^6 células/ml. Em um ensaio típico, 50 µl de

anticorpo de PSCA, 50 µl de soro complementar de coelho diluído (Cedarlane, Ontario, Can) e 50 µl de uma suspensão de células foram adicionados juntos em uma lâmina com 96 cavidades de cultura tecidual com fundo plano. A mistura foi incubada durante 2 horas a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂ para facilitar a lise de células complemento-mediada. Então, 50 µl de Alamar Blue (Biosource Intl. Camarillo, CA) foram adicionados a cada cavidade e a incubação continuada durante mais 4-5 horas a 37°C. A fluorescência em cada cavidade foi lida usando um fluorômetro de 96 cavidades com excitação a 530 nm e emissão a 590 nm. Os resultados mostram que anticorpos de PSCA tendo um isotipo de Ig1 (HA1-4.121) ou IgG2 (HA1-5.99.1), mas não um isotipo de IgG4 (HA1-6.46) foram capazes de mediar a lise complemento-dependente (Figura 14).

[000516] ADCC (Citotoxicidade Celular Anticorpo-Dependente) é um ataque lítico imune-mediado sobre células ligadas a um anticorpo objetivado a um antígeno específico na superfície celular. Nesse caso, é o PSCA. Células imunes reconhecem a porção Fc do anticorpo através de ligação a receptores Fcγ sobre a superfície de leucócitos, monócitos e células NK, disparando um ataque lítico que resulta em morte celular. A capacidade dos anticorpos de PSCA de mediar essa reação pode ser avaliada rotulando-se células tumorígenas *in vitro* com európio de ⁵¹cromo ou uma molécula fluorescente e incubação da mesma na presença de MAbs de PSCA humana junto com células mononucleares de sangue periférico. Lise específica das células tumorígenas pode ser determinada através de medição da lise percentual das células tumorígenas alvo. Conclusões comuns que são determinadas incluem liberação de radioatividade do európio ou corante fluorescente das células mortas usando um método de detecção apropriado. Alternativamente, a liberação de uma enzima intracelular, tal como desidrogenase de lactato (LDH), pode ser

medida.

Exemplo 14

Geração de Fragmentos F(Ab')₂

[000517] A geração de fragmentos F(Ab')₂ de MAbs é útil para estudar os efeitos de moléculas de MAb que retêm seu sítio de ligação a antígeno bivalente, mas carecem do domínio Fc efetuator imune em modelos terapêuticos *in vitro* e *in vivo*. 20 mgs de MAb Ha1-4.121 em tampão de acetato de sódio a 20 mM, pH de 4,5, foram incubados com e sem pepsina imobilizada (Pierce. Rockford IL) durante os tempos indicados. MAb intacto e fragmentos Fc digeridos foram removidos através de cromatografia por proteína A. É mostrado na Figura 15 um gel corado com Coomassie por SDS-PAGE de MAb intacto não digerido não reduzido, alíquotas não reduzidas de material não digerido tomadas nos tempos indicados e uma amostra reduzida do produto F(ab')₂ final digerido. Esse reagente pode ser usado para tratar animais trazendo tumores que expressam PSCA. A atividade antitumor observadas com esse fragmento de anticorpo pode distinguir a atividade biológica intrínseca de atividade mediada por mecanismos imunes dependentes.

Exemplo 15

Expressão de Anticorpos Humanos Usando Métodos com DNA Recombinante

[000518] Para expressar anti-MAbs de PSCA recombinantemente em células transfectadas, seqüências de cadeia leve e pesada variáveis anti-PSCA foram clonadas a montante das regiões constantes de Igk de cadeia leve e IgG1 de cadeia pesada humana, respectivamente. Os cassetes completos de cadeia leve e cadeia pesada humana anti-PSCA foram clonados a jusante do promotor/intensificador de CMV em um vetor de clonagem. Um sítio de poliadenilação foi incluído a jusante da seqüência de codificação do

MAB. As estruturas recombinantes expressando anti-MAB de PSCA foram transfectadas em células 293T, Cos e CHO. O anticorpo HA1-4.121 secretado de células T-293 recombinantes foi avaliado com relação à ligação à superfície celular de PSCA na Figura Pia-3A e comparado com o mesmo anticorpo produzido a partir do hibridoma original (Figura 16).

Exemplo 16

Ensaio de Ligação da Classe I e Classe II do HLA

[000519] Ensaio de ligação da classe I e classe II do HLA usando moléculas de HLA purificada são realizados de acordo com os protocolos descritos (por exemplo, Publicações PCT WO 94/20127 e WO 94/03205; Sidney *et al.*, Current Protocols in Immunology 18.3.1 (1998); Sidney *et al.*, J. Immunol. 154: 247 (1995); Sette *et al.*, Mol. Immunol. 31: 813 (1994)). Resumidamente, moléculas do MHC purificada (5 a 500 nM) são incubadas com vários inibidores peptídicos não ligados e peptídeos de sonda ¹²⁵I-radiorrotulados a 1-10 nM, conforme descrito. Após incubação, complexos de MHC-peptídeo são separados dos peptídeos livres através de filtração em gel e a fração de peptídeo ligada é determinada. Tipicamente, em experimentos preliminares, cada preparado de MHC é titulado na presença de quantidades fixas de peptídeos radiorrotulados para determinar a concentração de moléculas do HLA necessária para ligar 10-20% da radioatividade total. Todos os subseqüentes ensaios de inibição e ligação direta são realizados usando essas concentrações de HLA.

[000520] Uma vez que, sob essas condições [rótulo]<[HLA] e IC₅₀≥[HLA], os valores de IC₅₀ medidos são aproximações razoáveis dos verdadeiros valores de KD. Inibidores peptídicos são, tipicamente, testados em concentrações oscilando de 120 µg/ml a 1,2 ng/ml e são testados em dois a quatro experimentos completamente independentes. Para permitir comparação dos dados obtidos em

diferentes experimentos, um quadro de ligação relativa é calculado para cada peptídeo dividindo-se a IC_{50} de um controle positivo para inibição pela IC_{50} para cada peptídeo testado (tipicamente, versões não ligadas do peptídeo de sonda radiorrotulado). Para fins de bancos de dados e comparações interexperimento, os valores relativos de ligação são compilados. Esses valores podem, subsequentemente, ser convertidos novamente em valores de IC_{50} nM dividindo-se a IC_{50} nM dos controles positivos para inibição pela ligação relativa do peptídeo de interesse. Esse método de compilação de dados é preciso e consistente para comparação de peptídeos que foram testados em dias diferentes ou com diferentes lotes de MHC purificado.

[000521] Ensaios de ligação, conforme esboçado acima, podem ser usados para analisar peptídeos trazendo supermotivo de HLA e/ou motivo de HLA (veja Tabela IV).

Exemplo 17

Construção de Plasmídeos de DNA com Multiepítopo em "Minigene"

[000522] Esse exemplo discute a construção de um plasmídeo de expressão de minigene. Plasmídeos de minigene podem, naturalmente, conter várias configurações de células B, epítomos de CTL e/ou HTL ou análogos de epítopo, conforme descrito aqui.

[000523] Um plasmídeo de expressão de minigene inclui, tipicamente, múltiplos epítomos peptídicos de CTL e HTL. No presente exemplo, epítomos peptídicos trazendo supermotivo HLA-A2, -A3, -B7 e epítomos peptídicos trazendo motivo HLA-A1 e -A24 são usados em conjunto com epítomos trazendo supermotivo DR e/ou epítomos DR3. Epítomos peptídicos trazendo motivo ou supermotivo da classe I do HLA derivados de PSCA são selecionados de modo que múltiplos supermotivos/motivos são representados a fim de assegurar ampla abrangência de população. Similarmente, epítomos da classe II do HLA são selecionados de PSCA para proporcionar ampla abrangência de

população, epítomos trazendo supermotivo HLA DR-1-4-7 e epítomos trazendo motivo HLA DR-3 são selecionados para inclusão no constructo de minigene. Os epítomos de CTL e HTL selecionados são, então, incorporados em um minigene para expressão em um vetor de expressão.

[000524] Tal constructo pode, adicionalmente, incluir seqüências que direcionam os epítomos de HTL ao retículo endoplasmático. Por exemplo, a proteína li pode ser fundida a um ou mais epítomos de HTL conforme descrito na técnica, em que a seqüência CLIP da proteína li é removida e substituída por uma seqüência de epítopo da classe II do HLA, de modo que o epítopo da classe II do HLA é dirigido ao retículo endoplasmático, onde o epítopo se liga a uma molécula da classe II do HLA.

[000525] Esse exemplo ilustra os métodos a serem usados para construção de um plasmídeo de expressão trazendo minigene. Outros vetores de expressão que podem ser usados para composições de minigene estão disponíveis e são conhecidos por aqueles versados na técnica.

[000526] O plasmídeo de DNA de minigene desse exemplo contém uma seqüência de consenso de Kozak e uma seqüência sinalizadora de cadeia leve kappa de Ig de murina, seguido por epítomos de CTL e/ou HTL selecionados de acordo com os princípios descritos aqui. A seqüência codifica uma rede de leitura aberta fundida à expressão de epítopo de anticorpo Myc e His pelo vetor de Myc-His pcDNA 3.1.

[000527] Oligonucleotídeos de sobreposição que podem, por exemplo, ter em média cerca de 70 nucleotídeos de comprimento com sobreposições de 15 nucleotídeos, são sintetizados e purificados por HPLC. Oligonucleotídeos codificam os epítomos peptídicos selecionados bem como nucleotídeos ligantes apropriados, a seqüência de Kozak e seqüência sinalizadora. O minigene de

multiepitótopo final é montado através de extensão dos oligonucleotídeos de sobreposição em três conjuntos de reações usando PCR. Um aparelho de PCR Perkin/Elmer 9600 é usado e um total de 30 ciclos são realizados usando as seguintes condições: 95°C durante 15 segundos, temperatura de anelamento (5° abaixo da menor T_m calculada de cada par de iniciador) durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto.

[000528] Por exemplo, um minigene é preparado como segue. Para uma primeira reação de PCR, 5 µg de cada um de dois oligonucleotídeos são anelados e estendidos: em um exemplo usando oito oligonucleotídeos, isto é, quatro pares de iniciadores, os oligonucleotídeos 1+2, 3+4, 5+6 e 7+8 são combinados em reações de 100 µl contendo tampão de Pfu polimerase (1x = KCL a 10 mM, $(NH_4)_2SO_4$ a 10 mM, Tris-cloreto a 20 mM, pH de 8,75, $MgSO_4$ a 2 mM, 0,1% de Triton X-100, 100 µg/ml de BSA), cada dNTP a 0,25 mM e 2,5 U de Pfu polimerase. Os produtos diméricos de comprimento total são purificados em gel e duas reações contendo o produto de 1+2 e 3+4 e o produto de 5+6 e 7+8 são misturadas, aneladas e estendidas durante 10 ciclos. Metade das duas reações é, então, misturada e 5 ciclos de anelamento e extensão realizados antes que iniciadores de flanqueamento sejam adicionados para amplificar o produto de comprimento total. O produto de comprimento total é purificado em gel e clonado no pCR-blunt (Invitrogen) e clones individuais são selecionados através de seqüenciamento.

Exemplo 18

O Constructo de Plasmídeo e o Grau Até o Qual Ela Induz à Imunogenicidade

[000529] O grau até o qual uma estrutura de plasmídeo, por exemplo, uma estrutura de plasmídeo construída de acordo com o Exemplo anterior, é capaz de induzir à imunogenicidade é confirmado

in vitro por meio de determinação da apresentação de epítopo pela APC após transdução ou transfecção da APC com uma estrutura de ácido nucléico expressando epítopo. Tal estudo determina a "antigenicidade" e permite o uso de APC humana. O ensaio determina a capacidade do epítopo de ser apresentado pela APC em um contexto que é reconhecido por uma célula T através de quantificação da densidade de complexos de epítopo-classe I do HLA sobre a superfície celular. A quantificação pode ser realizada através de medição direta da quantidade de peptídeo eluído da APC (veja, por exemplo, Sijts *et al.*, J. Immunol. 156: 683-692, 1996; Demotz *et al.*, Nature 342: 682-684, 1989); ou o número de complexos de peptídeo-classe I do HLA pode ser estimado através de medição da quantidade de lise ou liberação de linfocina induzida por células alvo doentes ou transfectadas e, então, determinação da concentração de peptídeo necessária para obter níveis equivalentes de lise ou liberação de linfocina (veja, por exemplo, Kageyama *et al.*, J. Immunol. 154: 567-576, 1995).

[000530] Alternativamente, a imunogenicidade é confirmada através de injeções *in vivo* nos camundongos e subsequente avaliação *in vitro* de atividade de CTL e HTL, as quais são analisadas usando ensaios de citotoxicidade e proliferação, respectivamente, conforme detalhado, por exemplo, em Alexander *et al.*, Immunity 1: 751-761, 1994.

[000531] Por exemplo, para confirmar a capacidade de uma estrutura de minigene de DNA contendo pelo menos um peptídeo do supermotivo HLA-A2 de induzir à CTLs *in vivo*, camundongos transgênicos HLA-A2.1/K^b, por exemplo, são imunizados intramuscularmente com 100 µg de cDNA nu. Como um meio de comparar o nível de CTLs induzidas através de imunização com cDNA, um grupo de animais de controle é também imunizado com uma composição peptídica real que compreende epítomos múltiplos

sintetizados como um único polipeptídeo, conforme eles seriam codificados pelo minigene.

[000532] Esplenócitos de animais imunizados são estimulados duas vezes com cada uma das respectivas composições (epítomos peptídicos codificados no minigene ou o peptídeo poliepitópico), então, ensaiados com relação à atividade citotóxica peptídeo-específica em um ensaio de liberação de ^{51}Cr . Os resultados indicam a magnitude da resposta de CTL dirigida contra o epítomo A2-restrito, assim, indicando a imunogenicidade *in vivo* da vacina de minigene e da vacina poliepitópica.

[000533] Portanto, descobriu-se que o minigene estimula respostas imunes dirigidas aos epítomos peptídicos do supermotivo HLA-A2, assim como a vacina peptídica poliepitópica. Uma análise similar é também realizada usando outros modelos de camundongos transgênicos para HLA-A3 e HLA-B7 para avaliar a indução de CTL pelos epítomos do motivo ou supermotivo HLA-A3 e HLA-B7, pelo que também descobriu-se que o minigene estimula respostas imunes apropriadas dirigidas aos epítomos proporcionados.

[000534] Para confirmar a capacidade de um minigene que codifica epítomo da classe II de induzir a HTLs *in vivo*, camundongos transgênicos DR ou, para aqueles epítomos que reagem cruzadamente com a molécula do MHC do camundongo apropriada, camundongos I-A^b-restritos, por exemplo, são imunizados intramuscularmente com 100 µg de DNA de plasmídeo. Como um meio de comparar o nível de HTLs induzidas através de imunização com DNA, um grupo de animais de controle é também imunizado com uma composição peptídica real emulsificada em adjuvante Completo de Freund. Células T CD4+, isto é, HTLs, são purificadas a partir de esplenócitos dos animais imunizados e estimuladas com cada uma das respectivas composições (peptídeos codificados no minigene). A resposta de HTL

é medida usando um ensaio de proliferação de incorporação de ^3H -timidina (veja, por exemplo, Alexander *et al* Immunity 1: 751-761, 1994). Os resultados indicam a magnitude da resposta de HTL, assim, demonstrando a imunogenicidade *in vivo* do minigene.

[000535] Minigenes de DNA, construídos conforme descrito no Exemplo anterior, também podem ser confirmados como uma vacina em combinação com um agente de reforço usando um protocolo de primeiro-reforço. O agente de reforço pode consistir em proteína recombinante (por exemplo, Barnett *et al.*, Aids Res. and Human Retroviruses 14, Suplemento 3: S299-S309, 1998) ou vaccinia recombinante, por exemplo, expressando um minigene ou DNA que codifica a proteína completa de interesse (veja, por exemplo, Hanke *et al.*, Vacina 16: 439-445, 1998; Sedegah *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95: 7648-53, 1998; Hanke e McMichael, Immunol. Letters 66: 177-181, 1999; e Robinson *et al.*, Nature Med. 5: 526-34, 1999).

[000536] Por exemplo, a eficácia do minigene de DNA usado em um protocolo de primeiro-reforço é inicialmente avaliado em camundongos transgênicos. Nesse exemplo, camundongos transgênicos A2.1/K^b são imunizados IM com 100 µg de um minigene de DNA que codifica os peptídeos imunogênicos, incluindo pelo menos um peptídeo trazendo supermotivo HLA-A2.

Após um período de incubação (oscilando de 3-9 semanas), os camundongos são reforçados IP com 10^7 pfu/camundongo de um vírus de vaccinia recombinante expressando a mesma seqüência codificada pelo minigene de DNA. Camundongos de controle são imunizados com 100 µg de DNA ou vaccinia recombinante sem a seqüência do minigene ou com DNA que codifica o minigene, mas sem o reforço de vaccinia. Após um período adicional de incubação de duas semanas, esplenócitos dos camundongos são imediatamente ensaiados com relação à atividade peptídeo-específica em um ensaio ELISPOT.

Adicionalmente, os esplenócitos são estimulados *in vitro* com os epítomos peptídicos A2-restritos codificados no minigene e vaccinia recombinante, então, ensaiados com relação à atividade peptídeo-específica em ELISA de alfa, beta e/ou gama IFN.

[000537] Descobriu-se que o minigene utilizado em protocolos de prime-reforço estimula maiores respostas imunes com relação aos peptídeos do supermotivo HLA-A2 do que com DNA apenas. Tal análise também pode ser realizada usando modelos de camundongos transgênicos para o HLA-A11 ou HLA-B7 para avaliar a indução de CTL por epítomos do supermotivo HLA-A3 ou HLA-B7. O uso de protocolos de prime-reforço em seres humanos é descrito abaixo no Exemplo intitulado "Indução de Respostas de CTL Usando um Protocolo de Prime-Reforço".

Exemplo 19

Composições de Vacina Poliepitópicas de Antígenos Múltiplos

[000538] Os epítomos de peptídeo de PSCA da presente invenção são usados em conjunto com epítomos de outros antígenos tumor alvo-associados, para criar uma composição de vacina que é útil para a prevenção ou tratamento de câncer que expressa PSCA e outros de tais antígenos. Por exemplo, a composição de vacina pode ser proporcionada como um único polipeptídeo que incorpora múltiplos epítomos de PSCA, bem como antígenos tumor-associados que são freqüentemente expressos com um câncer alvo associado à expressão de PSCA ou pode ser administrada como uma composição compreendendo um coquetel de um ou mais epítomos distintos. Alternativamente, a vacina pode ser administrada como um estrutura de minigene ou como células dendríticas as quais tenham sido carregadas com os epítomos peptídicos *in vitro*.

Exemplo 20

Uso de Peptídeos para Avaliar uma Resposta Imune

[000539] Os peptídeos da invenção podem ser usados para analisar uma resposta imune com relação à presença de anticorpos específicos, CTL ou HTL dirigida a PSCA. Tal análise pode ser realizada da maneira descrita por Ogg *et al.*, Science 279: 2103-2106, 1998. Nesse Exemplo, os peptídeos de acordo com a invenção são usados como um reagente para fins diagnósticos ou prognósticos, não como um imunogênio.

[000540] Nesse exemplo, complexos tetraméricos de antígeno de leucócitos humanos altamente sensível ("tetrâmeros") são usados para uma análise seccional-cruzada, por exemplo, de freqüências de CTL HLA-A*0201 de PSCA-específicos a partir de indivíduos HLA A*0201-positivos em diferentes estágios de doença ou após imunização compreendendo um peptídeo de PSCA contendo um motivo A*0201. Complexos tetraméricos são sintetizados conforme descrito (Musey *et al.*, N. Engl. J. Med. 337: 1267, 1997). Resumidamente, a cadeia pesada de HLA purificada (A*0201 nesse exemplo) e β 2-microglobulina são sintetizadas por meio de um sistema de expressão procariota. A cadeia pesada é modificada através de deleção da cauda transmembrana-citosólica e adição COOH-terminal de uma seqüência contendo um sítio de biotilação enzimática BirA. A cadeia pesada, β 2-microglobulina, e peptídeo são reduplicados através de diluição. O produto reduplicado de 45-kD é isolado através de cromatografia de líquido por proteína rápida e, então, biotinilado através de BirA na presença de biotina (Sigma, St. Louis, Missouri), 5' trifosfato de adenosina e magnésio. O conjugado de estreptavidina-ficoeritrina é adicionado em uma proporção molar de 1:4 e o produto tetramérico é concentrado para 1 mg/ml. O produto resultante é referido como o tetrâmero-ficoeritrina.

[000541] Para a análise de amostras de sangue do paciente, aproximadamente um milhão de PBMCs são centrifugadas a 300g

durante 5 minutos e ressuspensas em 50 µl de solução salina tamponada com fosfato gelada. Análise tricolor é realizada com o tetrâmero-ficoeritrina, junto com anti-CD8-Tricolor e anti-CD38. As PBMCs são incubadas com tetrâmero e anticorpos sobre gelo durante 30 a 60 min e, então, lavadas duas vezes antes de fixação de formaldeído. Comportas são aplicadas para conter >99,98% de amostras de controle. Controles para os tetrâmeros incluem indivíduos A*0201-negativos e doadores sem doença A*0201-positivos. O percentual de células coradas com o tetrâmero é, então, determinado através de citometria de fluxo. Os resultados indicam o número de células na amostra de PBMC que contém CTLs epítipo-restritas, desse modo, indicando prontamente a extensão de resposta imune ao epítipo de PSCA e, assim, do estado de exposição a PSCA ou exposição a uma vacina que estimula uma resposta protetora ou terapêutica.

Exemplo 21

Indução de Respostas Imunes Usando um Protocolo de Reforço de Preparação

[000542] Um protocolo de reforço de prime similar, em seu princípio básico, àquele usado para confirmar a eficácia de uma vacina de DNA em camundongos transgênicos, tal como descrito acima no Exemplo intitulado "O Constructo de Plasmídeo e o Grau Até o Qual Ele Induz à Imunogenicidade," também pode ser usado para a administração da vacina a seres humanos. Tal regime de vacina pode incluir uma administração inicial, por exemplo, de DNA nu, seguido por um reforço usando vírus recombinante que codifica a vacina ou proteína/polipeptídeo recombinante ou uma mistura de peptídeo administrada em um adjuvante.

[000543] Por exemplo, a imunização inicial pode ser realizada usando um vetor de expressão, tal como aquele construído no

Exemplo intitulado "Construção de Plasmídeos de DNA com MultiEpítipo de "Minigene"" na forma de ácido nucléico nu administrado IM (ou SC ou ID) nas quantidades de 0,5-5 mg em locais múltiplos. O ácido nucléico (0,1 a 1000 µg) também pode ser administrado usando uma pistola de gene. Após um período de incubação de 3-4 semanas, uma dose de reforço é, então, administrada. O reforço pode ser vírus da varíola recombinante administrado em uma dose de $5 \cdot 10^7$ a 5×10^9 pfu. Um vírus recombinante, tal como MVA, canarypox, adenovírus ou vírus adeno-associado, também pode ser usado para o reforço ou a proteína poliepitópica ou uma mistura dos peptídeos pode ser administrada. Para avaliação de eficácia da vacina, amostras de sangue do paciente são obtidas antes de imunização, bem como em intervalos após a administração das doses iniciais e de reforçador da vacina. Células mononucleares de sangue periférico são isoladas de sangue fresco heparinizado através de centrifugação em gradiente de densidade de Ficoll-Hypaque, transformadas em alíquotas em meio de congelamento e armazenadas congeladas. As amostras são ensaiadas com relação à atividade de CTL e HTL.

[000544] Análise dos resultados indica que uma magnitude de resposta suficiente para obter um produto terapêutico ou imunidade protetora contra o PSCA é gerada.

Exemplo 22

Polinucleotídeos Complementares

[000545] Seqüências complementares às seqüências que codificam PSCA (Figura 1 ou Figura 3) ou quaisquer partes das mesmas, são usadas para detectar, diminuir ou inibir a expressão de PSCA que ocorre naturalmente. Embora o uso de oligonucleotídeos compreendendo de cerca de 15 a 30 pares de base seja descrito, essencialmente o mesmo procedimento é usado com fragmentos de

seqüência menores ou maiores. Oligonucleotídeo apropriados são projetados usando, por exemplo, o software OLIGO 4.06 (National Biosciences) e a seqüência de codificação de PSCA. Para inibir a transcrição, um oligonucleotídeo complementar é projetado a partir da seqüência 5' mais única e usada para impedir a ligação do promotor à seqüência de codificação. Para inibir a tradução, um oligonucleotídeo complementar é projetado para impedir a ligação ribossômica a um transcrito que codifica PSCA.

Exemplo 23

Purificação de PSCA que Ocorre Naturalmente ou Recombinante Usando Anticorpos PSCA-Específicos

[000546] PSCA que ocorre naturalmente ou recombinante é substancialmente purificado através de cromatografia por imunoafinidade usando anticorpos específicos para o PSCA. Uma coluna de imunoafinidade é construída através de acoplamento covalente de um antianticorpo de PSCA a uma resina cromatográfica ativada, tal como SEPHAROSE CNBr-ativada (Amersham Pharmacia Biotech). Após o acoplamento, a resina é bloqueada e lavada de acordo com as instruções do fabricante.

[000547] Meios contendo PSCA são passados sobre a coluna de imunoafinidade e a coluna é lavada sob condições que permitem a absorbância preferencial de PSCA (por exemplo, tampões com elevada resistência iônica 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 caotrope, tal como íons de uréia ou tiocianato) e a GCR.P é coletada.

Exemplo 24

Identificação de Moléculas as quais Interagem com PSCA

[000548] PSCA ou fragmentos biologicamente ativos do mesmo são

ligados com reagente 121I de Bolton-Hunter. (Veja, por exemplo, Bolton *et al* (1973) Biochem. J. 133: 529). As moléculas candidatas previamente dispostas nas cavidades de uma lâmina com cavidades múltiplas são incubadas com o PSCA ligado, lavadas e quaisquer cavidades com complexo de PSCA ligado são ensaiadas. Os dados obtidos usando diferentes concentrações de PSCA são usados para calcular os valores para o número, afinidade e associação de PSCA com as moléculas candidatas.

Exemplo 25

Ensaio *In Vivo* para a Promoção de Crescimento de Tumor Pelo PSCA

[000549] O efeito da proteína de PSCA sobre o crescimento de células tumorígenas é avaliado *in vivo* através de avaliação do desenvolvimento de tumor e crescimento de células que expressam ou carecem de PSCA. Por exemplo, camundongos SCID são injetados subcutaneamente sobre cada flanco com 1×10^6 de linhagens de células de câncer de próstata 3T3 (por exemplo, células PC3) contendo o vetor vazio tkNeo ou PSCA. Pelo menos duas estratégias podem ser usadas: (1) Expressão constitutiva de PSCA sob regulação de um promotor, tal como um promotor constitutivo obtido dos genomas de vírus tais como o vírus polioma, vírus da varíola (UK 2.211.504, publicada em 5 de Julho de 1989), adenovírus (tal como Adenovírus 2), papiloma vírus bovino, vírus do sarcoma de aves, citomegalovírus, um retrovírus, vírus da hepatite B e Vírus Simian 40 (SV40) ou de promotores de mamífero heterólogos, por exemplo, o promotor de actina ou um promotor de imunoglobulina, contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de célula hospedeira e (2) expressão regulada sob o controle de um sistema de vetor induzível, tal como ecdisona, tetraciclina, etc., contanto que tais promotores sejam compatíveis com os sistemas de célula hospedeira. O volume do tumor é, então, monitorado através de medição do calibre

quando de aparecimento de tumores palpáveis e acompanhado com o tempo para determinar se células que expressam PSCA crescem em uma taxa mais rápida e se tumores produzidos por células que expressam PSCA demonstram características de agressividade alterada (por exemplo, metástase intensificada, vascularização, responsividade reduzida a drogas quimioterapêuticas).

[000550] Adicionalmente, os camundongos podem ser implantados com 1×10^5 das mesmas células ortotopicamente para determinar se o PSCA tem um efeito sobre o crescimento local na próstata e se o PSCA afeta a capacidade das células de metastatizar, especificamente aos nódulos linfáticos e ossos (Miki T *et al.*, Oncol Res. 2001; 12: 209; Fu X *et al.*, Int J Câncer. 1991, 49: 938). O efeito do PSCA sobre a formação e crescimento de tumor ósseo pode ser avaliado através de injeção de células de tumor de próstata intratibialmente.

[000551] O ensaio é também útil para determinar o efeito inibitório de PSCA de composições terapêuticas candidatas tais como, por exemplo, moléculas antisentido de PSCA e ribozimas.

Exemplo 26

Inibição de Tumores Mediada por Anticorpo Monoclonal de PSCA *In Vivo*

[000552] A expressão significativa de PSCA sobre a superfície celular de tecidos tumorígenos, junto com sua expressão restrita em tecidos normais, torna o PSCA um bom alvo para terapia com anticorpo. Similarmente, o PSCA é um alvo para imunoterapia baseada em células T. Assim, a eficácia terapêutica dos anti-MAbs de PSCA em modelos em camundongos de xenoenxerto de câncer de próstata humano e modelos em camundongos de câncer pancreático humano é avaliada usando linhagens de células recombinantes, tais como PC3-PSCA e 3T3-PSCA (veja, por exemplo, Kaighn, M.E. *et al.*,

Invest Urol, 1979, 17(1): 16-23), bem como modelos de xenoenxerto de próstata humana, tal como LAPC 9AD (Saffran *et al.*, PNAS 1999, 10: 1073-1078).

[000553] A eficácia do anticorpo sobre o crescimento do tumor e formação de metástase é estudada, por exemplo, em um modelo de xenoenxerto de câncer de próstata ou pancreático ortotópico em camundongos. Os anticorpos podem ser não conjugados, conforme discutido nesse Exemplo, ou podem ser conjugados a uma modalidade de produto terapêutico, conforme apreciado na técnica. Os anti-MAbs de PSCA inibem a formação de xenoenxertos pancreáticos e de próstata. Os anti-MAbs de PSCA também retardam o crescimento de tumores ortotópicos estabelecidos e prolongam a sobrevivência de camundongos trazendo tumor. Esses resultados indicam a utilidade dos anti-MAbs de PSCA no tratamento de câncer de próstata local e em estágios avançados, câncer pancreático e aqueles cânceres apresentados na Tabela I. (Veja, por exemplo, Saffran, D. *et al.*, PNAS 10: 1073-1078 ou a URL na world wide web [pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698](https://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698)).

[000554] A administração dos anti-MAbs de PSCA levou a um retardo de crescimento do tumor ortotópico estabelecido e inibição de metástase para sítios distantes, resultando em um prolongamento significativo na sobrevivência de camundongos trazendo tumor. Esses estudos indicam que o PSCA é um alvo atraente para imunoterapia e demonstram o potencial terapêutico de anti-MAbs de PSCA para o tratamento de câncer de próstata e pancreático local e metastático. Esse exemplo demonstra que anticorpos monoclonais de PSCA não conjugados são eficazes para inibir o crescimento de xenoenxertos de tumor de próstata humano crescidos em camundongos SCID; conseqüentemente, uma combinação de tais anticorpos monoclonais eficazes também é eficaz.

Inibição de Tumor Usando Múltiplos MAbs de PSCA

Materiais e Métodos

Anticorpos Monoclonais de PSCA

[000555] Anticorpos monoclonais foram estimulados contra PSCA conforme descrito no Exemplo intitulado "Geração de anticorpos monoclonais de PSCA (MAbs)." Os anticorpos são caracterizados através de ELISA, Western blot, FACS e imunoprecipitação com relação à sua capacidade de se ligar a PSCA. Dados de mapeamento de epítipo para os anti-MAbs de PSCA, conforme determinado através de ELISA e análise de Western, reconhecem epítopos sobre uma proteína de PSCA. Análise imunoistoquímica de tecidos de câncer de próstata e células com esses anticorpos é realizada.

[000556] Os anticorpos monoclonais são purificados a partir de ascitas ou sobrenadantes de cultura de tecido de hibridoma através de cromatografia com Sepharose em Proteína-G ou Proteína-A, submetidos à diálise contra PBS, esterilizados em filtro 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 compreendendo uma mistura de anticorpos monoclonais individuais é preparado e usado para o tratamento de camundongos que receberam injeções subcutâneas ou ortotópicas de xenoenxertos de tumor LAPC9 AD e HPAC.

Linhagens de Células e Xenoenxertos

[000557] As linhagens de células de câncer de próstata PC3 e a linhagem de células LNCaP, bem como a linhagem de fibroblasto NIH 3T3 (American Type Culture Collection) são mantidas em RPMI e DMEM respectivamente, suplementado com L-glutamina e 10% de FBS.

[000558] As populações de células PC3-PSCA e 3T3-PSCA são geradas através de transferência de gene retroviral, conforme descrito

em Hubert, R.S. *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(25): 14523.
[000559] O xenoenxerto LAPC-9, o qual expressa um receptor de androgênio do tipo silvestre e produz antígeno próstata-específico (PSA), é passado em camundongos imunodeficientes combinados ICR-graves (SCID) machos de 6 a 8 semanas de idade (Taconic Farms) através de um implante com trocar s.c. (Craft, N. *et al.*, Nat Med. 1999, 5: 280). Suspensões com uma única célula de células tumorígenas LAPC-9 são preparadas conforme descrito em Craft *et al.*

Modelos de Xenoenxerto em Camundongos

[000560] Tumores subcutâneos (s.c.) são gerados através de injeção de 1×10^6 células cancerígenas misturadas em uma diluição de 1:1 com Matrigel (Collaborative Research) no flanco direito de camundongos SCID machos. Para testar a eficácia do anticorpo sobre a formação de tumor, isto é, injeções de anticorpo são iniciadas no mesmo dia que as injeções de células tumorígenas. Como um controle, camundongos são injetados com IgG de camundongo purificada (ICN) ou PBS; ou um anticorpo monoclonal purificado que reconhece um antígeno irrelevante não expresso em células humanas. Em estudos preliminares, nenhuma diferença é encontrada entre a IgG de camundongo 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 camundongos com tumores subcutâneos maiores que 1,5 cm de diâmetro são sacrificados.

[000561] Injeções ortotópicas são realizadas sob anestesia usando cetamina/xilazina. Para estudos ortotópicos de próstata, uma incisão é feita através do abdômen para expor a próstata e células tumorígenas LAPC ou PC3 (2×10^6) misturadas com Matrigel são injetadas na cápsula da próstata em um volume de 10 µl. Para monitorar o crescimento do tumor, os camundongos são apalpados e sangue é

coletado em uma base semanal para medir os níveis de PSA. Os camundongos são segregados em grupos para os tratamentos apropriados, com MAbs anti-PSCA ou de controle sendo injetados i.p.

Anti-MAbs de PSCA Inibem o Crescimento de Tumores de Xenoenxerto de Câncer Expressando PSCA

[000562] O efeito de anti-MAbs de PSCA sobre a formação de tumor é testado usando modelos ortotópicos HPAC e LAPC9. Quando comparado com o modelo de tumor s.c., o modelo ortotópico, o qual requer injeção de células tumorígenas diretamente no pâncreas ou próstata do camundongo, respectivamente, resulta em um crescimento local do tumor, desenvolvimento de metástase em sítios distais, deterioração da saúde do camundongo e subsequente morte (Saffran, D. *et al.*, PNAS *supra*). Essas características tornam o modelo ortotópico mais representativo de progressão da doença humana e nos permite acompanhar o efeito terapêutico de MAbs em conclusões clinicamente relevantes.

[000563] Conseqüentemente, células tumorígenas são injetadas na próstata do camundongo e, 2 dias depois, os camundongos são segregados em dois grupos e tratados com: a) 250-1000 µg de Ab anti-PSCA ou b) anticorpo de controle três vezes por semana durante duas a cinco semanas.

[000564] A principal vantagem de modelos de câncer ortotópico é a capacidade de estudar o desenvolvimento de metástases. A formação de metástase em camundongos trazendo tumores ortotópicos estabelecidos é estudada através de análise de IHC sobre seções de pulmão usando um anticorpo contra uma proteína na superfície celular tumor-específica, tal como anti-CK20 para câncer de próstata (Lin *et al.*, Câncer Detect Prev. (2001) 25: 202).

[000565] Outra vantagem de modelos de câncer em xenoenxerto é a capacidade de estudar a neovascularização e angiogênese. Embora o

sistema capilar e desenvolvimento de rede sangüínea sejam originários do hospedeiro, o início e arquitetura da neovasculatura é regulada pelo tumor de xenoenxerto (Davidoff *et al.*, Clin Câncer Res. (2001) 7: 2870; Solesvik *et al.*, Eur J Câncer Clin Oncol. (1984) 20: 1295). O efeito do anticorpo e pequenas moléculas sobre a neovascularização é estudado de acordo com procedimentos conhecidos na técnica, tal como através de análise de IHC de tecidos tumorígenos e seu microambiente circundante.

[000566] A camundongos trazendo tumores ortotópicos estabelecidos são administradas injeções de anti-MAb de PSCA ou anticorpo de controle durante um período de 4 semanas. Os camundongos em ambos os grupos são deixados estabelecer uma elevada carga de tumor, a fim de assegurar uma freqüência elevada de formação de metástase nos pulmões dos camundongos. Os camundongos são, então, mortos e suas bexigas, fígados, ossos e pulmões são analisados com relação à presença de células tumorígenas através de análise IHC. Esses estudos demonstram uma eficácia antitumor ampla de antianticorpos de PSCA sobre o início e progressão de câncer de próstata em modelos de xenoenxerto em camundongos. Antianticorpos de PSCA inibem a formação de tumores bem como retardam o crescimento de tumores já estabelecidos e prolongam a sobrevivência de camundongos tratados. Além disso, os anti-MAbs de PSCA demonstram um efeito inibitório dramático sobre a disseminação de tumor de próstata local para sítios distais, mesmo na presença de uma grande carga de tumor. Assim, os anti-MAbs de PSCA são eficazes sobre os principais *conclusões* clinicamente relevantes (crescimento de tumor), prolongamento da sobrevivência e saúde.

Efeito dos MAb de PSCA sobre o Crescimento de Câncer de Próstata Humano em Camundongos

[000567] Usando a metodologia acima, células tumorígenas LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID machos. Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ em cada grupo) e o tratamento iniciado intraperitonealmente (i.p.) no dia 0 com HA1-4.120 ou MAb de controle de isotipo, conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana durante um total de 7 doses até o dia 28 do estudo. Crescimento do tumor foi monitorado usando medições do calibre a cada 3 a 4 dias conforme indicado. Os resultados mostram que o anticorpo monoclonal anti-PSCA humana Ha1-4.120 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer de próstata humano implantados subcutaneamente em camundongos SCID ($p < 0,05$) (Figura 18).

[000568] Em um outro experimento, células tumorígenas LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID machos. Quando o volume do tumor atingiu 50 mm^3 , os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ em cada grupo) e o tratamento iniciado intraperitonealmente (i.p.) com HA1-5.99.1 ou MAb de controle de isotipo, conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana durante um total de 5 doses até o dia 14 de estudo. Crescimento do tumor foi monitorado usando medições do calibre a cada 3 a 4 dias conforme indicado. Os resultados mostram que o anticorpo monoclonal anti-PSCA totalmente humano Ha1-5.99 inibiu significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer de próstata humano androgênio-independente estabelecidos implantados subcutaneamente em camundongos SCID ($p < 0,05$). (Figura 19).

[000569] Em um outro experimento, células tumorígenas LAPC-9AD ($2,5 \times 10^6$ células) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID machos. Quando o volume do tumor atingiu 40 mm^3 , os

camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos (n = 10 em cada grupo) e o tratamento foi iniciado intraperitonealmente (i.p.) com concentrações crescentes de HA1-4.121 ou MAb de controle de isotipo, conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana durante um total de 7 doses até o dia 21 do estudo. Crescimento do tumor foi monitorado usando medições do calibre a cada 3 a 4 dias conforme indicado. Os resultados desse estudo demonstraram que o HA1-4.121 inibiu o crescimento de xenoinxertos de próstata androgênio-dependente humanos subcutâneos estabelecidos em camundongos SCID. Os resultados eram estatisticamente significativos para o grupo com dose de 300 ug no dias 14, 17 e 21 ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, dois lados com $\alpha = 0,05$) e para a dose de 700 ug grupo no dias 10, 14, 17 e 21 ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, dois lados com $\alpha = 0,05$) (Figura 20).

[000570] Em um outro experimento, células tumorígenas LAPC-9AD paciente-derivadas, androgênio-dependentes ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas nos lóbulos dorsais da próstata de camundongos SCID machos. Os tumores foram deixados crescer durante aproximadamente 10 dias, tempo no qual os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos. Tratamento com 500 mg de HA1-4.117, HA1-4.121 ou MAb de controle de isotipo humano foi iniciado 10 dias após implante do tumor. Anticorpos foram distribuídos intraperitonealmente duas vezes por semana durante um total de 7 doses. Quatro dias após a última dose, os animais foram sacrificados e os tumores primários excisados e pesados. Os resultados mostram que os anticorpos monoclonais anti-PSCA humana Ha1-4.121 ($p < 0,01$) e Ha1-4.117 ($p < 0,05$) inibem significativamente o crescimento de xenoinxertos de câncer de próstata LAPC-9AD ortotopicamente implantados em camundongos SCID (Figura 21).

[000571] Em um outro experimento, células tumorígenas LAPC-9AD

paciente-derivadas, androgênio-dependentes ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas nos lóbulos dorsais da próstata de camundongos SCID machos. Os tumores foram deixados crescer durante aproximadamente 9 dias, tempo no qual os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos. Os animais aleatoriamente distribuídos em grupos de sobrevivência incluem 11 camundongos no MAb de controle de isotipo e 12 camundongos no grupo tratado com HA1-4.121. Os animais foram tratados i.p. com 1000 ug de Ha1-4.121 ou 1000 ug de MAb de controle de isotipo duas vezes por semana durante um total de 9 doses. Os resultados demonstraram que o HA1-4.121 prolongou significativamente (teste de log-classificação: $p < 0,01$) a sobrevivência de camundongos SCID com tumores de próstata androgênio-dependentes humanos. Dois camundongos no grupo tratado com HA1-4.121 permaneceram isentos de tumores palpáveis no dia 110, o último dia do experimento (Figura 22).

Efeito dos MAbs de PSCA em Combinação com Taxotero em Camundongos

[000572] Em um outro experimento, células tumorígenas LAPC-9AI (2×10^6 células por animal) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID machos. Quando o volume do tumor atingiu 65 mm^3 , os animais foram aleatoriamente distribuídos e atribuídos a quatro diferentes grupos ($n = 10$ em cada grupo) conforme indicado. Começando no dia 0, Ha1-4.121 ou MAb de controle de isotipo foram administrados i.p. duas vezes por semana em uma dose de 500 ug durante um total de 6 doses. A última dose foi fornecida no dia 17. Taxotero foi fornecido intravenosamente em uma dose de 5 mg/kg no dias 0, 3 e 7. Crescimento do tumor foi monitorado a cada 3-4 dias usando medições do calibre. Os resultados desse estudo demonstram que o HA1-4.121 como um agente único inibiu o crescimento de xenoenxertos de próstata androgênio-independentes em

camundongos SCID em 45% quando comparado com o tratamento com anticorpo de controle apenas no dia 28 (ANOVA/teste de Tukey: $p < 0,05$). Administração do MAb de controle de isotipo mais taxotero inibiu o crescimento do tumor em 28% quando comparado com tratamento com anticorpo de controle apenas, o que não era estatisticamente significativo. Administração de HA1-4.121 em combinação com Taxotero intensificou o efeito e resultou em uma inibição de 69% de crescimento do tumor quando comparado ao anticorpo de controle apenas (ANOVA/teste de Tukey: $p < 0,01$). Uma diferença estatisticamente significativa também foi demonstrada quando o grupo com uma combinação de HA1-4.121 mais Taxotero foi comparado com os grupos com HA1-4.121 ou MAb de controle de isotipo mais Taxotero (ANOVA/teste de Tukey: $p < 0,05$) (Figura 23).

Efeito dos MAbs de PSCA sobre o Crescimento de Câncer Pancreático Humano em Camundongos

[000573] Em um outro experimento, células de câncer pancreático humano HPAC (2×10^6 / camundongo) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID ICR-imunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ animais/grupo) e o tratamento com o anticorpo monoclonal de PSCA humana indicado iniciado no mesmo dia. Anticorpos (500 mg/camundongo) foram distribuídos intraperitonealmente duas vezes por semana durante um total de 8 doses. Os resultados demonstraram que anticorpos monoclonais anti-PSCA humana Ha1-4.121, Ha1-4.117 e Ha1-1.16 inibem significativamente o crescimento de xenoenxertos de câncer pancreático humano subcutaneamente implantados em camundongos SCID. Análises estatísticas foram realizadas usando um t-teste (dois lados, $\alpha = 0,05$) (Figura 24).

[000574] Em um outro experimento, células HPAC ($3,0 \times 10^6$ células)

foram implantadas ortotopicamente no pâncreas de camundongos SCID. Os camundongos foram aleatoriamente atribuídos a três grupos (n = 9 em cada grupo) conforme indicado. Tratamento com HA1-4.121 (250 ug ou 1000 ug) ou MAb de controle de isotipo (1000 ug) foi iniciado no dia de implante. Anticorpos foram administrados i.p. duas vezes por semana durante um total de 10 doses. Treze dias após a última dose, os animais foram sacrificados e os tumores primários excisados e pesados. Os resultados desse estudo demonstraram que o HA1-4.121 inibiu significativamente o crescimento ortotópico de xenoenxertos de câncer pancreático humano em camundongos SCID em ambos os níveis de dose examinados. O tratamento com 250 ug e 1000 ug de AGS-PSCA inibiu o crescimento do tumor em 66% e 70%, respectivamente (Kruskal-Wallis/teste de Tukey: $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 25).

[000575] Na autópsia, metástases visíveis aos nódulos linfáticos e órgãos distantes foram observadas no grupo tratado com anticorpo de controle. Nenhuma metástase visível foi observada em nos grupos tratados com HA1-4.121. Nódulos linfáticos, pulmões e fígados foram removidos de todos os animais e examinados histologicamente com relação à presença de tumor metastático. As seções dos pulmões e nódulos linfáticos removidos de cada animal foram coradas para citoqueratina humana e o número de metástases determinado microscopicamente. Os resultados da análise histológica demonstraram uma redução significativa nas metástases no nódulo linfático (LN) em animais tratados com HA1-4.121 ($p = 0,0152$ conforme detectado através do teste exato de Fishers). A incidência de metástase e invasão também era significativamente diminuída nos animais tratados com ambas as concentrações de HA1-4.121 ($p = 0,0152$ conforme detectado através do teste exato de Fishers). O número de metástases no pulmão diminuiu significativamente em

camundongos tratados com uma dose de 1,0 mg de HA1-4.121 apenas ($p = 0,0498$ conforme detectado através do teste exato de Fishers) (Figura 26).

Efeitos dos MAb's de PSCA sobre o crescimento de Câncer de Bexiga Humano em Camundongos

[000576] Em um outro experimento, células de câncer de bexiga SW780 humano (2×10^6 / camundongo) foram injetadas subcutaneamente em camundongos SCID ICR-imunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Os camundongos foram aleatoriamente distribuídos em grupos ($n = 10$ animais/grupo) e o tratamento com o MAb de PSCA humano indicado iniciado no mesmo dia. Anticorpos (250 mg/camundongo) foram distribuídos intraperitonealmente duas vezes por semana durante um total de 7 doses. Os resultados demonstraram que HA1-4.117 ($p = 0,014$), HA1-4.37 ($p = 0,0056$), HA1-1.78 ($p = 0,001$), Ha1-5.99 ($p = 0,0002$) e HA1-4.5 ($p = 0,0008$) inibem significativamente o crescimento de tumores de bexiga SW780 implantados subcutaneamente em camundongos SCID. Análises estatísticas foram realizadas usando um t-teste (dois lados, $\alpha=0,05$) (Figura 27).

[000577] Os resultados desses experimentos mostram que os MAb's de PSCA podem ser usados para fins terapêuticos e diagnósticos para tratar e gerenciar os cânceres apresentados na Tabela I.

Exemplo 27

Uso Terapêutico e Diagnóstico de Anticorpos de PSCA em Humanos

[000578] Anticorpos monoclonais anti-PSCA são segura e eficazmente usados para fins diagnósticos, profiláticos, prognósticos e/ou terapêuticos em seres humanos. Western blot e análise imunoistoquímica de tecidos de câncer e xenoenxertos de câncer com anti-MAb de PSCA mostram forte coloração extensiva em carcinoma,

mas níveis significativamente menores ou indetectáveis em tecidos normais. A detecção de PSCA em carcinoma e doença metastática demonstra a utilidade do MAb como um indicador diagnóstico e/ou prognóstico. Antianticorpos de PSCA são, portanto, usados em aplicações diagnósticas, tais como imunoistoquímica de espécimes de biópsia de rim para detectar câncer em pacientes suspeitos.

[000579] Conforme determinado através de citometria de fluxo, anti-MAb de PSCA se liga especificamente a células de carcinoma. Assim, antianticorpos de PSCA são usados em aplicações diagnósticas de formação de imagem do corpo todo, tais como radioimunocintigrafia e radioimunoterapia (veja, por exemplo, Potamianos S. *et al.*, Anticancer Res 20(2A): 925-948 (2000)) para a detecção de cânceres metastáticos e localizados que exibem expressão de PSCA. Proteção ou liberação de um domínio extracelular de PSCA no ambiente extracelular, tal como aquela observada para fosfodiesterase alcalina B10 (Meerson, N. R., Hepatology 27: 563-568 (1998)), permite a detecção diagnóstica de PSCA através de antianticorpos de PSCA em amostras do soro e/ou urina de pacientes suspeitos.

[000580] Antianticorpos de PSCA que se ligam especificamente a PSCA são usados em aplicações terapêuticas para o tratamento de cânceres que expressam a PSCA. Antianticorpos de PSCA são usados como uma modalidade não conjugada e como a forma conjugada na qual os anticorpos são presos a uma de várias modalidades terapêuticas ou de formação de imagem bem-conhecidas na técnica, tais como as enzimas de pró-droga ou radioisótopos. Em estudos pré-clínicos, antianticorpos de PSCA não conjugados e conjugados são testados com relação à eficácia de prevenção de tumor e inibição de crescimento em modelos de xenoenxerto de câncer em camundongos SCID, por exemplo, modelos de câncer renal AGS-K3 e AGS-K6 (veja, por exemplo, o Exemplo intitulado "anticorpo

monoclonal de PSCA media a inibição de tumores *in vivo*"). Antianticorpos de PSCA não conjugados e conjugados são usados como uma modalidade de produto terapêutico em experimentos clínicos humanos, quer sozinhos ou em combinação com outros tratamentos, conforme descrito nos Exemplos a seguir.

Exemplo 28

Experimentos Clínicos Humanos para o Tratamento e Diagnóstico de Carcinomas Humanos Através do Uso de Antianticorpos de PSCA Humano *in vivo*

[000581] Os anticorpos são usados de acordo com a presente invenção os quais reconhecem um epítipo sobre o PSCA e são usados no tratamento de determinados tumores, tais como aqueles listados na Tabela 1. Baseado em uma série de fatores, incluindo níveis de expressão de PSCA, tumores tais como aqueles listados na Tabela 1 são indicações atualmente preferidas. Com relação a cada uma dessas indicações, três abordagens clínicas são buscadas com sucesso.

I.) Terapia Adjunta: Em terapia adjunta, os pacientes são tratados com antianticorpos de PSCA em combinação com um agente quimioterapêutico e/ou antineoplásico e/ou terapia de radiação. Alvos de câncer primário, tais como aqueles listados na Tabela 1, são tratados sob protocolos padrão através da adição de antianticorpos de PSCA à terapia padrão de primeira e segunda linha. Designs de protocolo se dirigem à eficácia, conforme avaliado através de redução na massa do tumor, bem como à capacidade de reduzir as doses usuais de quimioterapia padrão. Essas reduções na dosagem permitem terapia adicional e/ou prolongada através de redução da toxicidade dose-relacionada do agente quimioterapêutico. Antianticorpos de PSCA são utilizados em vários experimentos clínicos adjuntos em combinação com os agentes quimioterapêuticos ou

antineoplásicos adriamicina (carcinoma avançado de próstata), cisplatina (carcinomas avançados de cabeça e pescoço e pulmão), taxol (câncer de mama) e doxorubicina (pré-clínico).

II.) Monoterapia: Com relação ao uso dos antianticorpos de PSCA em monoterapia de tumores, os anticorpos são administrados aos pacientes em um agente quimioterapêutico ou antineoplásico. Em uma modalidade, monoterapia é conduzida clinicamente em pacientes com câncer em estágio terminal com doença metastática extensiva. Os pacientes mostram alguma estabilização da doença. Experimentos demonstram um efeito em pacientes resistentes com tumores cancerígenos.

III.) Agente de formação de Imagem: Através de ligação de um radionuclídeo (por exemplo, iodo ou ítrio (I^{131} , Y^{90}) aos antianticorpos de PSCA, os anticorpos radiorrotulados são utilizados como um agente diagnóstico e/ou de formação de imagem. Em tal papel, os anticorpos ligados se localizam em tumores sólidos, bem como lesões metastáticas de células que expressam PSCA. Com relação ao uso dos antianticorpos de PSCA como agentes de formação de imagem, os anticorpos são usados como um adjunto ao tratamento cirúrgico de tumores sólidos, como uma triagem pré-cirúrgica, bem como um acompanhamento pós-operatório para determinar se o tumor permanece e/ou retorna. Em uma modalidade, um (^{111}In)-anticorpo de PSCA é usado como um agente de formação de imagem em um experimento clínico humano com I Fase em pacientes tendo um carcinoma que expressa PSCA (por analogia veja, por exemplo, Divgi *et al.*, J. Natl. Câncer Inst. 83: 97-104 (1991)). Os pacientes são acompanhados com uma câmera gama posterior e anterior. Os resultados indicam que as lesões primárias e lesões metastáticas são identificadas.

Dose e Via de Administração

[000582] Conforme será apreciado por aqueles versados na técnica, considerações de dosagem podem ser determinadas através de comparação com os produtos análogos que estão na clínica. Assim, antianticorpos de PSCA podem ser administrados com doses na faixa de 5 a 400 mg/m², com menores doses usadas, por exemplo, com relação a estudos de segurança. A afinidade de antianticorpos de PSCA com relação à afinidade de um anticorpo conhecido por seu alvo é um parâmetro usado por aqueles versados na técnica para determinação de regimes de dose análogos. Ainda, antianticorpos de PSCA que são anticorpos totalmente humanos, quando comparado com o anticorpo quimérico, têm eliminação mais lenta; conseqüentemente, a dosagem em pacientes com tais antianticorpos de PSCA totalmente humanos pode ser menor, talvez na faixa de 50 a 300 mg/m² e ainda permanecer eficaz. A dosagem em mg/m², em oposição à medição convencional da dose em mg/kg, é uma medida baseada sobre a área de superfície e é uma medida de dosagem conveniente que é projetada para incluir pacientes de todos os tamanhos, de bebês a adultos.

[000583] Três abordagens de distribuição distintas são úteis para distribuição de antianticorpos de PSCA. Distribuição intravenosa convencional é uma técnica de distribuição padrão para muitos tumores. Contudo, com relação a tumores na cavidade peritoneal, tais como tumores de ovário, duto biliar, outros dutos e similares, a administração intraperitoneal pode provar ser favorável para obtenção de alta dose de anticorpo no tumor e também para minimizar a eliminação de anticorpo. De uma maneira similar, determinados tumores sólidos possuem vasculatura que é apropriada para perfusão regional. Perfusão regional permite uma alta dose de anticorpo no local de um tumor e minimiza a eliminação a curto prazo do anticorpo.

Plano de Desenvolvimento Clínico (CDP)

[000584] Visão Geral: O CDP acompanha e desenvolve tratamentos de antianticorpos de PSCA com relação à terapia adjunta, monoterapia e como um agente de formação de imagem. Experimentos demonstram, inicialmente, a segurança e, após o que, confirmam a eficácia em doses repetidas. Experimentos são de rótulo aberto, comparando quimioterapia padrão com terapia padrão mais antianticorpos de PSCA. Conforme será apreciado, um critério que pode ser utilizado com relação ao arrolamento de pacientes são os níveis de expressão de PSCA em seus tumores, conforme determinado por meio de biópsia.

[000585] Como com qualquer produto terapêutico baseado em infusão de proteína ou anticorpo, preocupações de segurança estão relacionadas primariamente a (i) síndrome de liberação de citocina, isto é, hipotensão, febre, agitação, calafrios; (ii) o desenvolvimento de uma resposta imunogênica ao material (isto é, desenvolvimento de anticorpos humanos pelo paciente ao anticorpo terapêutico humano ou resposta de HAHA); e (iii) toxicidade para células normais que expressam PSCA. Testes padrão e acompanhamento são utilizados para monitorar cada uma dessas preocupações com segurança. Descobriu-se que os antianticorpos de PSCA são seguros quando de administração humana.

Exemplo 29

Experimento Clínico Humano: Monoterapia com Anticorpo Anti-PSCA Humano

[000586] Antianticorpos de PSCA são seguros com relação ao experimento adjunto acima discutido, um experimento clínico humano de Fase VI confirma a eficácia e dosagem ótima para monoterapia. Tal experimento é realizado e requer as mesmas análises de segurança e resultados que o experimento adjunto acima descrito, exceto que os pacientes não recebem quimioterapia concorrentemente com a receita

das doses dos antianticorpos de PSCA.

Exemplo 30

Experimento Clínico Humano: Formação de Imagem Diagnóstica com Anticorpo Anti-PSCA

[000587] Mais uma vez, já que a terapia adjunta discutida acima é segura dentro dos critérios de segurança discutidos acima, um experimento clínico humano é conduzido referente ao uso de antianticorpos de PSCA como um agente de formação de imagem diagnóstica. O protocolo é projetado de uma maneira substancialmente similar àquela descrita na técnica, tal como em Divgi *et al.*, J. Natl. Câncer Inst. 83: 97-104 (1991). Descobriu-se que os anticorpos são seguros e eficazes quando usados como uma modalidade diagnóstica.

Exemplo 31

Experimento Clínico Humano de Terapia Adjunta com Anticorpo Anti-PSCA Humano e Terapia com Produto Quimioterapêutico, radiação e/ou Ablação Hormonal

[000588] Um experimento clínico humano com I Fase é iniciado para avaliar a segurança de seis doses intravenosas de um antianticorpo de PSCA humano com relação ao tratamento de um tumor sólido, por exemplo, um câncer de um tecido listado na Tabela 1. No estudo, a segurança de doses únicas de antianticorpos de PSCA, quando utilizados como uma terapia adjunta a um agente antineoplásico ou quimioterapêutico ou ablação hormonal, conforme definido aqui, tal como, sem limitação: cisplatina, topotecan, doxorubicina, adriamicina, taxol, Lupron, Zoladex eulexina, Casodex, Anandron ou semelhante, é avaliada. O design do experimento inclui distribuição de aproximadamente seis doses únicas de um antianticorpo de PSCA com dosagem do anticorpo escalonada de aproximadamente cerca de 25 mg/m² para cerca de 275 mg/m² durante o curso do tratamento de

acordo com o esquema a seguir ou similar:

	Dia 0	Dia 7	Dia 14
Dose de MAb	25 mg/m ²	75 mg/m ²	125mg/m ²
Quimioterapia (dose padrão)	+	+	+

Tabela -continuação-

	Dia 21	Dia 28	Dia 35
Dose de MAb	175 mg/m ²	225 mg/m ²	275mg/m ²
Quimioterapia (dose padrão)	+	+	+

[000589] Os pacientes são intimamente acompanhados durante uma semana após cada administração de anticorpo e quimioterapia. Em particular, os pacientes são avaliados com relação a preocupações de segurança mencionadas acima: (i) síndrome de liberação de citocina, isto é, hipotensão, febre, agitação, calafrios; (ii) o desenvolvimento de uma resposta imunogênica ao material (isto é, desenvolvimento de anticorpos humanos pelo paciente ao anticorpo terapêutico humano ou resposta de HAHA); e (iii) toxicidade para células normais que expressam PSCA. Testes padrões e acompanhamento são utilizados para monitorar cada uma dessas preocupações com segurança. Os pacientes também são avaliados com relação aos resultados clínicos e particularmente redução na massa do tumor, conforme evidenciado através de MRI ou outra técnica de formação de imagem.

[000590] É demonstrado que os antianticorpos de PSCA são seguros e eficazes. Experimentos de Fase II confirmam a eficácia e refinam a dosagem ótima.

Exemplo 32

Interferência de RNA (RNAi)

[000591] A tecnologia de interferência de RNA (RNAi) é implementada a uma variedade de ensaios celulares relevantes para oncologia. O RNAi é um mecanismo de silenciamento de gene pós-

transcricional ativado por RNA de filamento duplo (dsRNA). RNAi induz à degradação mRNA-específica, levando a alterações na expressão da proteína e subsequente na função do gene. Em células de mamífero, esses dsRNAs denominados RNA de interferência curto (siRNA) têm a composição correta para ativar a via de RNAi objetivando a degradação, especificamente alguns mRNAs. Veja Elbashir S.M. *et al.*, *Duplexes of 21-nucleotide RNAs Mediate RNA interference in Cultured Mammalian Cells*, *Nature* 411(6836): 494-8 (2001). Assim, a tecnologia de RNAi é usada com sucesso em células de mamífero para silenciar genes alvo.

[000592] Perda de controle de proliferação celular é uma característica de células cancerígenas; assim, avaliação do papel do PSCA em ensaios de proliferação/sobrevivência celular é relevante. Conseqüentemente, RNAi foi usado para investigar a função do antígeno a PSCA. Para gerar siRNA para PSCA, foram usados algoritmos que prevêem oligonucleotídeos que exibem os parâmetros moleculares críticos (teor de G:C, temperatura de fusão, etc.) e têm a capacidade de reduzir significativamente os níveis de expressão de uma proteína de PSCA quando introduzidos em células. De acordo com esse Exemplo, siRNA de composições de PSCA são usados, os quais compreendem siRNA (filamento duplo, RNA de interferência curto) que corresponde à seqüência de ácido nucléico da ORF de uma proteína de PSCA ou subsequências da mesma. Assim, subsequências de siRNA usadas dessa maneira geralmente têm 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 ou mais de 35 nucleotídeos de RNA contínuos de comprimento. Essas seqüências de siRNA são complementares e não-complementares a pelo menos uma porção da seqüência de codificação de mRNA. Em uma modalidade preferida, as subsequências têm 19-25 nucleotídeos de comprimento, mais

preferivelmente 21-23 nucleotídeos de comprimento. Em modalidades preferidas, esses siRNA obtêm *knockdown* do antígeno a PSCA em células expressando a proteína e têm efeitos funcionais, conforme descrito abaixo.

[000593] O siRNA selecionado (oligo de PSCA.b) foi testado em numerosas linhagens de células em um ensaio MTS de sobrevivência/proliferação (mede a atividade metabólica celular). Ensaio colorimétrico baseado em tetrazólio (isto é, MTS) detectam células viáveis exclusivamente, uma vez que células vivas são metabolicamente ativas e, portanto, podem reduzir os sais de tetrazólio a compostos de formazano coloridos; células mortas, contudo, não. Além disso, esse oligo de PSCA.b obteve *knockdown* de antígeno a PSCA em células expressando a proteína e tinham efeitos funcionais, conforme descrito abaixo usando os protocolos a seguir.

[000594] Transfecções com siRNA de Mamífero: No dia antes de transfecção com siRNA, as diferentes linhagens de células foram colocadas em meio (RPMI 1640 com 10% de FBS sem antibióticos) a 2×10^3 células/cavidade em 80 µl (formato de lâmina com 96 cavidades) para um ensaio de sobrevivência/MTS. Em paralelo com o oligo de siRNA PSCA-específico, as seguintes seqüências foram incluídas em cada experimento como controles: a) Células transfectadas com placebo com Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e tampão de anelamento (sem siRNA); b) siTNA Luciferase-4-específico (seqüência objetivada: 5'-AAGGGACGAAGACGAACA CUUCTT-3') (SEQ ID NO: 77); e c) siRNA Eg5-específico (seqüência objetivada: 5'-AACTGAAGACCTGAAGACAATAA-3') (SEQ ID NO: 78). SiRNAs foram usados em uma concentração final de Lipofectamine 2000 de 10 nM e 1 µg/ml.

[000595] O procedimento foi como segue: Os siRNAs foram primeiro

diluídos em OPTIMEM (meio de transfecção isento de soro, Invitrogen) a 0,1 μ M (concentrado 10-vezes) e incubados 5-10 min em RT. Lipofectamine 2000 foi diluída a 10 μ g/ml (concentrada 10-vezes) para o número total de transfecções e incubada 5-10 minutos em temperatura ambiente (RT). Quantidades apropriadas de Lipofectamine 2000 diluída concentrada 10-vezes foram misturadas a 1:1 com siRNA diluído concentrado 10-vezes e incubadas em RT durante 20-30" (solução de transfecção concentrada 5-vezes). 20 μ ls das soluções de transfecção concentradas 5-vezes foram adicionados às respectivas amostras e incubados a 37°C durante 96 horas antes de análise.

[000596] Ensaio MTS: O ensaio MTS é um método colorimétrico para determinação do número de células viáveis em proliferação, citotoxicidade ou quimiossensibilidade baseado em um composto de tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS (b)] e um reagente de acoplamento de elétrons (etossulfato de fenazina; PES). Ensaios foram realizadas através de adição de uma pequena quantidade da Solução Reagente diretamente às cavidades de cultura, incubação durante 1-4 horas e, então, registro da absorbância a 490nm com um leitor para lâmina com 96 cavidades. A quantidade de produto de formazano colorido, conforme medido pela quantidade de absorbância a 490 nm, é diretamente proporcional à atividade mitocondrial e/ou o número de células vivas em cultura.

[000597] De forma a se dirigir à função do PSCA em células, o PSCA é silenciado através de transfecção de linhagens de células que expressam PSCA endogenamente.

[000598] Outra modalidade da invenção é um método para analisar a proliferação celular PSCA-relacionada através de medição da síntese de DNA como um marcador de proliferação. Precursores de DNA

ligados (isto é, 3H-timidina) são usados e sua incorporação ao DNA é quantificada. Incorporação do precursor ligado no DNA é diretamente proporcional à quantidade de divisão celular que ocorre na cultura. Um outro método usado para medir a proliferação celular é realização de ensaios clonogênicos. Nesses ensaios, um número definido de células é colocado sobre a matriz aproximada e o número de colônias formadas após um período de crescimento após tratamento com siRNA é contado.

[000599] Na validação de PSCA como um alvo para câncer, complementação de análise da sobrevivência/proliferação celular com apoptose e estudos de formação de perfil do ciclo celular são considerados. A característica bioquímica do processo apoptótico é fragmentação de DNA genômico, um evento irreversível que obriga a célula a morrer. Um método para observar o DNA fragmentado em células é a detecção imunológica de fragmentos de DNA em complexo com histona através de um imunoensaio (isto é, ELISA de detecção de morte celular) o qual mede o enriquecimento de fragmentos de DNA em complexo com histona (mono- e oligonucleossomas) no citoplasma de células apoptóticas. Esse ensaio não requer pré-rotulação das células e pode detectar a degradação de DNA em células que não proliferam *in vitro* (isto é, células tumorígenas recentemente isoladas).

[000600] As moléculas efetadoras mais importantes para disparar a morte celular apoptótica são caspases. As caspases são proteases que, quando ativadas, clivam numerosos substratos no sítio carbóxi-terminal de um resíduo de aspartato que medeia cada estágio precoce de apoptose quando de ativação. Todas as caspases são sintetizadas como pró-enzimas e a ativação envolve clivagem em resíduos de aspartato. Em particular, a caspase 3 parece exercer um papel central no início de eventos celulares de apoptose. Ensaios para determinação de ativação da caspase 3 detectam eventos precoces de

apoptose. Após tratamentos com RNAi, detecção por Western blot da presença de caspase 3 ativa ou clivagem proteolítica de produtos (isto é, PARP) encontrados em células apoptóticas ainda sustentam uma indução ativa de apoptose. Em virtude do fato de os mecanismos celulares que resultam em apoptose serem complexos, cada um tem suas vantagens e limitações. Consideração de outros critérios/*conclusões*, tais como a morfologia celular, condensação de cromatina, apoptose da membrana, corpos apoptóticos, ajudam a sustentar adicionalmente a morte celular como apoptótica. Uma vez que nem todos os alvos genéticos que regulam o crescimento celular são anti-apoptóticos, o teor de DNA de células permeabilizadas é medido para obter o perfil de teor de DNA ou perfil de ciclo celular. Núcleos de células apoptóticas contêm menos DNA em virtude de vazamento para o citoplasma (população sub-G1). Além disso, o uso de corantes de DNA (isto é, iodeto de propídio) também diferencia entre as diferentes fases do ciclo celular na população de células em virtude da presença de diferentes quantidades de DNA em G0/G1, S e G2/M. Nesses estudos, as subpopulações podem ser quantificadas.

[000601] Para o gene de PSCA, estudos com RNAi facilitam a compreensão da contribuição do produto genético em vias do câncer. Tais moléculas de RNAi ativas têm uso na identificação de ensaios para selecionar MAb's que são produtos terapêuticos antitumor ativos. Ainda, siRNA são administrados como produtos terapêuticos a pacientes com câncer para redução do crescimento maligno de vários tipos de cânceres, incluindo aqueles listados na Tabela 1. Quando a PSCA exerce um papel na sobrevivência celular, proliferação celular, tumorigênese ou apoptose, ela é usada como um alvo para fins diagnósticos, prognósticos, preventivos e/ou terapêuticos.

Exemplo 33

Detecção de proteína de PSCA em espécimes de pacientes com

câncer através de IHC

[000602] Expressão de proteína de PSCA em espécimes de tumor de pacientes com câncer foi detectada usando o anticorpo HA1-4.117. Tecidos incrustados em parafina, fixados em formalina foram cortados em seções de 4 microns e montados sobre lâminas de vidro. As seções foram desengorduradas, reidratadas e tratadas com solução de recuperação de antígeno (Antigen Retrieval Citra Solution; BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA, 94583) em elevada temperatura. As seções foram, então, incubadas em antianticorpo de PSCA monoclonal humano fluoresceína-conjugado, Ha1-4.117, durante 16 horas a 4°C. As lâminas foram lavadas três vezes em tampão e adicionalmente incubadas com anti-fluoresceína de coelho durante 1 hora e, após lavagem em tampão, imersas em anticorpo secundário anti-imunoglobulina de coelho-anti-cabra peroxidase-conjugado DAKO EnVision+® (DAKO Corporação, Carpinteria, CA) durante 30 minutos. As seções foram, então, lavadas em tampão, reveladas usando o kit DAB (SIGMA Chemicals), contracoradas usando hematoxilina e analisadas através de microscopia com campo brilhante. Os resultados mostram a expressão de PSCA nas células tumorígenas de adenocarcinoma de próstata (A, B), carcinoma transicional de bexiga (C) e adenocarcinoma dúctil pancreático (D). Esses resultados indicam que o PSCA é expresso em cânceres humanos e que anticorpos dirigidos a esse antígeno são úteis como reagentes diagnósticos (Figura 17).

[000603] Esses resultados indicam que PSCA é um alvo para aplicações diagnósticas, prognósticas e terapêuticas em câncer.

[000604] No decorrer do presente pedido, vários conteúdos de dados de website, publicações, pedidos de patente e patentes são mencionados. (Websites são mencionados através de seus endereços do Provedor de Recurso Uniforme ou URL na World Wide Web). As

descrições de cada uma dessas referências são aqui incorporadas por referência em suas totalidades.

[000605] A presente invenção não está limitada, quanto ao escopo, pelas modalidades descritas aqui, as quais se destinam a serem simples ilustrações de aspectos individuais da invenção e qualquer uma que é funcionalmente equivalente está dentro do escopo da invenção. Várias modificações nos modelos e métodos da invenção, além daqueles descritos aqui, se tornarão evidentes para aqueles versados na técnica a partir da descrição e ensinamentos precedentes e são particularmente destinados a cair dentro do escopo da invenção. Tais modificações ou outras modalidades podem ser praticadas sem se desviar do verdadeiro escopo e espírito da invenção.

Tabelas

Tabela I: Tecidos que expressam PSCA quando malignos

Próstata
Pâncreas
Bexiga
Rim
Cólon
Pulmão
Ovário
Mama

Tabela II: Abreviações de Aminoácido

ÚNICA LETRA	TRÊS LETRAS	NOME COMPLETO
F	Phe	fenilalanina
L	Leu	leucina
S	Ser	serina
Y	Tyr	tirosina
C	Cys	cisteína
W	Trp	triptofano

ÚNICA LETRA	TRÊS LETRAS	NOME COMPLETO
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

Tabela III: Matriz de Substituição de Aminoácido

[000606] Adaptada da matriz de substituição de aminoácido GCG Software 9,0 BLOSUM62 (matriz de substituição em blocos). Quanto maior o valor, mais provavelmente uma substituição é encontrada em proteínas naturais relacionadas. (Veja URL www.ikp.unibe.ch/manual/blosum62.html)

A C D E F G H I K L M N P Q R S T V W Y.

4 0 -2 -1 -2 0 -2 -1 -1 -1 -1 -2 -1 -1 -1 1 0 0 -3 -2 A

9 -3 -4 -2 -3 -3 -1 -3 -1 -1 -3 -3 -3 -3 -1 -1 -1 -2 -2 C

6 2 -3 -1 -1 -3 -1 -4 -3 1 -1 0 -2 0 -1 -3 -4 -3 D

5 -3 -2 0 -3 1 -3 -2 0 -1 2 0 0 -1 -2 -3 -2 E

6 -3 -1 0 -3 0 0 -3 -4 -3 -3 -2 -2 -1 1 3 F

6 -2 -4 -2 -4 -3 0 -2 -2 -2 0 -2 -3 -2 -3 G

8 -3 -1 -3 -2 1 -2 0 0 -1 -2 -3 -2 2 H

4 -3 2 1 -3 -3 -3 -3 -2 -1 3 -3 -1 I

5 -2 -1 0 -1 1 2 0 -1 -2 -3 -2 K

4 2 -3 -3 -2 -2 -2 -1 1 -2 -1 L

5 -2 -2 0 -1 -1 -1 1 -1 -1 M

6 -2 0 0 1 0 -3 -4 -2 N

7 -1 -2 -1 -1 -2 -4 -3 P

5 1 0 -1 -2 -2 -1 Q

5 -1 -1 -3 -3 -2 R

4 1 -2 -3 -2 S

5 0 -2 -2 T

4 -3 -1 V

11 2 W

7 Y

Tabela IV:Motivos/Supermotivos da Classe I/II de HLATabela IV (A): Supermotivos/Motivos da Classe I de HLA

SUPERMOTIVO	POSIÇÃO	POSIÇÃO	POSIÇÃO
	2 (Âncora primária)	3 (Âncora primária)	C Término (Âncora primária)
A1	TILVMS		FWY
A2	LIVMATQ		IVMATL
A3	VSMATLI		RK
A24	YFWIVLMT		FIYWLM
B7	P		VILFMWYA
B27	RHK		FYLWMIVA
B44	ED		FWYLMIVA
B58	ATS		FWYLIVMA
B62	QLIVMP		FWYMIVLA
MOTIVOS			
A1	TSM		Y
A1		DEAS	Y
A2,1	LMVQIAT		VLIMAT
A3	LMVISATFCGD		KYRHFA
A11	VTMLISAGNCDF		KRYH

A24	YFWM		FLIW
A*3101	MVTALIS		RK
A*3301	MVALF/ST		RK
A*6801	AVTMSLI		RK
B*0702	P		LMFWYA/V

Tabela IV (A): -continuação-

SUPERMOTIVO	POSIÇÃO	POSIÇÃO	POSIÇÃO
	2 (Âncora primária)	3 (Âncora primária)	C Término (Âncora primária)
B*3501	P		LMFWY/VA
B51	P		LIVFWYAM
B*5301	P		IMFWYALV
B*5401	P		ATIVLMFWY

[000607] Resíduos em negrito são preferidos, resíduos em itálico são menos preferidos: um peptídeo é considerado como trazendo motivo se ele tem âncoras primárias em cada posição de âncora primária para um motivo ou supermotivo, conforme especificado na tabela acima.

Tabela IV (B): Supermotivo da Classe II de HLA

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

Tabela IV (C): Motivos da Classe II de HLA

MOTIVOS		1° âncora 1	2	3	4	5	1° âncora 6	7	8	9
DR4	preferido	<i>FMYL/VW</i>	M	T		I	<i>VSTCPALIM</i>	MH		MH
	prejudicial				W			R		WDE
DR1	preferido	<i>MFL/VWY</i>			PAMQ		<i>VMATSPLIC</i>	M		AVM
	prejudicial		C	CH	FD	CWD		GDE	D	
DR7	preferido	<i>MFL/VWY</i>	M	W	A		<i>IVMSACTPL</i>	M		IV
	prejudicial		C		G			GRD	N	G
<u>DR3</u>	<u>MOTIVOS</u>	1° âncora 1	2	3	1° âncora 4	5	1° âncora 6			
Motivo a preferido		LIVMFY			D					
Motivo b preferido		LIVMFAY			DNQEST		KRH			
DR Supermotivo		<i>MFL/VWY</i>					<i>VMSTACPLI</i>			

Resíduos em itálico indicam resíduos menos preferidos ou "tolerados"

Tabela IV (D): Supermotivos da Classe I de HLA

	POSIÇÃO:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-término
<u>SUPER-</u> <u>MOTIVOS</u>										
A1			<u>1° Âncora</u> TILVMS							<u>1° Âncora</u> FWY
A2			<u>1° Âncora</u> LIVMATQ							<u>1° Âncora</u> LIVMAT
A3	Preferido		<u>1° Âncora</u> VSMATLI	YFW (4/5)			YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	<u>1° Âncora</u> RK
	prejudicial	DE (3/5); P (5/5)		DE (4/5)						
A24			<u>1° Âncora</u> YFWIVLMT							<u>1° Âncora</u> FIYWLM

Tabela IV (D): -continuação-

	POSIÇÃO:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-término
<u>SUPER-</u> <u>MOTIVOS</u>										
B7	Preferido	FWY (5/5)	<u>1º Âncora</u>	FWY					FWY	<u>1º Âncora</u>
		LIVM (3/5)	P	(4/5)					(3/5)	VILFMWYA
	prejudicial	DE (3/5); P(5/5); G(4/5); A(3/5); QN(3/5)				DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	DE (4/5)	
B27			<u>1º Âncora</u> RHK							<u>1º Âncora</u> FYLWMIVA
B44			<u>1º Âncora</u> ED							<u>1º Âncora</u> FWYLIMVA
B58			<u>1º Âncora</u> ATS							<u>1º Âncora</u> FWYLIVMA
B62			<u>1º Âncora</u> QLIVMP							<u>1º Âncora</u> FWYMIVLA

Resíduos em itálico indicam resíduos menos preferidos ou "tolerados"

Tabela IV (E): Motivos da Classe I de HLA

	POSIÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-término
										ou C-término	
A1 9-mer	preferido	GFYW	<u>1°Âncora</u> STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	<u>1°Âncora</u> Y	
	prejudicial	DE		RHKLIVMP	A	G	A				
A1 9-mer	preferido	GRHK	ASTCLIVM	<u>1°Âncora</u> DEAS	GSTC		ASTC	LIVM	DE	<u>1°Âncora</u> Y	
	prejudicial	A	RHKDEPYFW		DE	PQN	RHK	PG	GP		
A1 10-mer	preferido	YFW	<u>1°Âncora</u> STM	DEAQN	A	YFWQN		PASTC	GDE	P	<u>1°Âncora</u> Y
	prejudicial	GP		RHKGLIVM	DE	RHK	QNA	RHKYFW	RHK	A	

Tabela IV (E): -continuação-

	POSIÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-término
										ou C-término	
A1 10-mer	preferido	YFW	STCLIVM	<u>1°Âncora</u> DEAS	A	YFW		PG	G	YFW	<u>1°Âncora</u> Y
	prejudicial	RHK	RHKDEPYFW			P	G		PRHK	QN	
A2,1 9-mer	preferido	YFW	<u>1°Âncora</u> LM/VQAT	YFW	STC	YFW		A	P	<u>1°Âncora</u> VLIMAT	
	prejudicial	DEP		DERKH			RKH	DERKH			
A2,1 10-mer	preferido	AYFW	<u>1°Âncora</u> LM/VQAT	LVIM	G		G		FYWL VIM		<u>1°Âncora</u> VLIMAT
	prejudicial	DEP		DE	RKHA	P		RKH	DERK H	RKH	
A3	preferido	RHK	<u>1°Âncora</u> LMVISATFCGD	YFW	PRHKY FW	A	YFW		P	<u>1°Âncora</u> KYRHFA	
	prejudicial	DEP		DE							

Tabela IV (E): -continuação-

	POSIÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-término
										ou C-término	
A11	preferido	A	<u>1ºÂncora</u> VTLMISAGNC DF	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P	<u>1ºÂncora</u> KRYH	
	prejudicial	DEP						A	G		
A24 9-mer	preferido	YFWRHK	<u>1ºÂncora</u> YFWM		STC			YFW	YFW	<u>1ºÂncora</u> FLIW	
	prejudicial	DEG		DE	G	QNP	DERHK	G	AQN		
A24 10-mer	Preferido		<u>1ºÂncora</u> YFWM		P	YFWP		P		<u>1ºÂncora</u> FLIW	
	Prejudicial			GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA	
A3101	Preferido	RHK	<u>1ºÂncora</u> MVTALIS	YFW	P		YFW	YFW	AP	<u>1ºÂncora</u> RK	
	Prejudicial	DEP		DE		ADE	DE	DE	DE		

Tabela IV (E): -continuação-

	POSIÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-término
										ou C-término	
A3301	Preferido		<u>1ºÂncora</u> MVALF/ST	YFW				AYFW		<u>1ºÂncora</u> RK	
	Prejudicial	GP		DE							
A6801	Preferido	YFWSTC	<u>1ºÂncora</u> AVTMSLI			YFWLIVM		YFW	P	<u>1ºÂncora</u> RK	
	prejudicial	GP		DEG		RHK			A		
B0702	Preferido	RHKFWY	<u>1ºÂncora</u> P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	<u>1ºÂncora</u> LMFWYA/IV	
	prejudicial	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE		
B3501	Preferido	FWYLIVM	<u>1ºÂncora</u> P	FWY				FWY		<u>1ºÂncora</u> LMFWY/IV	
	prejudicial	AGP				G	G				
B51	Preferido	LIVMFWY	<u>1ºÂncora</u> P	FWY	STC	FWY		G	FWY	<u>1ºÂncora</u> LIVFWYAM	
	prejudicial	AGPDERHK STC				DE	G	DEQN	GDE		

Tabela IV (E): -continuação-

	POSIÇÃO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-término
										ou	
										C-término	
B5301	preferido	LIVMFWY	<u>1ºÂncora</u> P	FWY	STC	FWY		LIVMFWY	FWY	<u>1ºÂncora</u> IMFWYALV	
	prejudicial	AGPQN					G	RHKQN	DE		
B5401	preferido	FWY	<u>1ºÂncora</u> P	FWYLIVM		LIVM		ALIVM	FWYAP	<u>1ºÂncora</u> ATIVLMFWY	
	prejudicial	GPQNDE		GDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE		

Tabela IV (F):

Sumário dos HLA-supertipos

Frequências fenotípicas globais de HLA-supertipos em diferentes populações étnicas

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

Tabela IV (G):

Cobertura calculada de população proporcionada pelas diferentes combinações de HLA-supertipo

HLA-supertipos Frequência fenotípica

	Caucasiano	Negros N.A.	Japoneses	Chineses	Hispânicos	Média
A2, A3 e B7	83,0	86,1	87,5	88,4	86,3	86,2
A2, A3, B7, A24, B44 e A1	99,5	98,1	100,0	99,5	99,4	99,3
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62 e B 58	99,9	99,6	100,0	99,8	99,9	99,8

[000608] Os motivos indicam os resíduos que definem as especificidades de supertipo. Os motivos incorporam resíduos determinados com base nos dados publicados sendo reconhecidos por alelos múltiplos dentro do supertipo. Os resíduos entre parênteses são resíduos adicionais também previstos como sendo tolerados por alelos múltiplos dentro do supertipo.

Tabela V: Motivos que Ocorrem Frequentemente			
Nome	Identidade % média	Descrição	Função potencial
zf-C2H2	34%	Dedo de zinco, tipo C2H2	Proteína de ligação a ácido nucléico, funciona como fator de transcrição, provável localização nuclear
citocromo_b_N	68%	Citocromo b (N-terminal)/b6/petB	Oxidase membrana-ligada, gera superóxido

Tabela V: -continuação-			
Nome	Identidade % média	Descrição	Função potencial
Ig	19%	Domínio de imunoglobulina	Domínios têm cem aminoácidos de comprimento e incluem uma ligação de dissulfeto intradomínio conservado
WD40	18%	Domínio WD, repetição G-beta	Repetições aleatórias de cerca de 40 resíduos, cada uma contendo um motivo Trp-Asp. Funciona na transdução de sinal e interação de proteína
PDZ	23%	Domínio PDZ	Pode funcionar na objetivação de moléculas de sinalização a sítios submembranosos
LRR	28%	Repetição rica em leucina	Motivos com seqüência curta envolvidos em interações proteína-proteína
Pquinase	23%	Domínio de quinase de proteína	Núcleo catalítico conservado comum a quinases de serina/treonina e tirosina contendo um sítio de ligação de ATP e um sítio catalítico

Tabela V: -continuação-			
Nome	Identidade % média	Descrição	Função potencial
PH	16%	Domínio PH	Homologia com pleckstrin envolvida na sinalização intracelular ou como constituintes do citoesqueleto
EGF	34%	Domínio semelhante ao EGF	30-40 aminoácidos de comprimento encontrado no domínio extracelular de proteínas membrana-ligadas ou em proteínas secretadas
Rvt	49%	Transcriptase reversa (DNA polimerase RNA-dependente)	
Ank	25%	Repetição Ank	Proteína citoplásmica, associa proteínas da membrana integrais ao citoesqueleto
Oxidored_q1	32%	NADH-Ubiquinona/plastoquinona (complexo I), várias cadeias	Membrana-associado. Envolvido na translocação de prótons através da membrana
Efhand	24%	EFhand	Domínio de ligação de cálcio, consiste em um loop com 12 resíduos flanqueado sobre ambos os lados por um domínio de alfa-hélice com 12 resíduos

Tabela V: -continuação-			
Nome	Identidade % média	Descrição	Função potencial
Rvp	79%	Aspartil protease retroviral	Aspartil proteases ou ácido aspártico, centralizadas sobre um resíduo de aspartila catalítico
Colágeno	42%	Repetição da hélice tripla de colágeno (20 cópias)	Proteínas estruturais extracelulares envolvidos na formação de tecido conectivo. A seqüência consiste no G-X-Y e as cadeias polipeptídicas formam uma hélice tripla
Fn3	20%	Domínio do tipo III de Fibronectina	Localizado na região de ligação de ligante extracelular dos receptores e tem cerca de 200 resíduos de aminoácido de comprimento com dois pares de cisteínas envolvidos em ligações de dissulfeto
7tm_1	19%	Receptor 7 transmembrana (família de rodopsina)	Sete regiões transmembrana hidrofóbicas, com o N-término localizado extracelularmente, enquanto que o C-término é citoplásmico. Sinaliza através de proteínas G

Tabela VI: Limites de éxon do transcrito PSCA v.1

Número do éxon	Início	Final	Comprimento
1	10	69	60
2	70	177	108
3	178	985	808

Tabela VII: Valores de MFI de cada ponto de dados usado para cálculo da afinidade

Valores de MFI

nM	PSCA	PSCA	PDP3 T=8 +4	PDP3 T=8 +4
40	869,3	777,06	795,24	661,66
20	875,19	835,94	816,34	824,07
10	856,28	847,83	777,85	842,72
5	866,94	817,45	758,15	818,83
2,5	835,47	769,79	742,45	783,5
1,25	813,12	782,84	806,2	792,44
0,625	766,52	689,3	683,64	666,28
0,3125	588,3	541,25	549,03	499,22
0,15625	389,95	354,24	366,82	355,83
0,07813	234,85	230,37	225,82	211,77
0,03906	138,05	132,14	134,25	134,07
0,01953	84,35	78,49	77,62	80,14
0,00977	48,13	48,38	50,93	46,87
0,00488	33,49	30,58	30,71	30,04
0,00244	21,77	20,33	18,14	20,44
0,00122	14,45	13,59	13,82	13,11
0,00061	11,07	10,14	9,52	10,35
0,00031	8,61	8,3	8,57	9,09
0,00015	7,45	7,17	7,28	7,85
0,00008	6,91	6,73	7,32	7,86
0,00004	6,94	6,41	6,81	6,51

Tabela VIII: Afinidade calculada usando o software Graphpad Prism: Equação de Dose-Resposta Sigmoidal (declínio variável)

Valores de Kd

	PSCA	PSCA	PDP3 T=8 +4	PDP3 T=8 +4
Equação 1				
Valores melhor- adaptados				
BMAX	896,6	843,9	816,4	820,3
KD	0,1784	0,1849	0,1678	0,1839
Erro padrão				
BMAX	10,83	10,92	12,63	20,12
KD	0,01152	0,01275	0,01397	0,02405
Intervalos de confiança de 95%				
BMAX	873,9 a 919,3	821,0 a 866,7	790,0 a 842,9	778,2 a 862,4
KD	0,1543 a 0,2025	0,1583 a 0,2116	0,1386 a 0,1971	0,1336 a 0,2343

Tabela IX: Afinidade baseada em FACS sobre MAbs totalmente de PSCA humana

Afinidade baseada em FACS

ID da amostra	Kd (nM)
Ha1-4.37	0,23
Ha1-4.121	0,26
Ha1-5.99.1	0,28
Ha1-4.117	0,32
Ha1-4.120	0,41
Ha1-4.5	1,00
Ha1-1.16.1	6,91

Tabela X: Anticorpos que reagem cruzadamente com PSCA de

macaco e/ou PSCA de camundongo

ID do Hibridoma	Reação cruzada com PSCA de macaco	Reação cruzada com PSCA de camundongo
H1-1.10	-	-
Ha1-1.16	+	-
Ha1-1.78	+	-
Ha1-1.41	+	-
Ha1-4.5	+	-
Ha1-4.37	+	-
Ha1-4.117	+	+
Ha1-4.120	+	-
Ha1-4.121	+	-
Ha1-5.99	+	-

Tabela XI: Agrupamento de PSCA:epítopo através de análise por FACS

	Grupos de Epítopo							
	1			2	3	5		
MFI	4,37	4,120	4,5	5,99	4,121	1,41	1,16	1G8
4,37	5,73	6,45	7,35	7,28	11,63	28,88	26,86	23,92
4,120	5,31	6,24	6,73	7,32	7,3	23,81	20,91	15,41
4,5	5,36	5,75	5,86	6,82	7,47	16,46	22,91	13,45
5,99	23,77	22,33	30,82	7,38	45,45	60,06	63,63	29,5
4,121	5,4	5,63	10,51	15,15	6,16	34,63	37,64	26,38
1,41	10,21	6,37	6,03	9,45	9,54	6,75	9,8	5,77
1,16	7,51	8	8,01	6,7	22,88	14,34	10,7	6,89
1G8	11,65	12,45	13,77	8,21	28,69	16,43	14,26	6,48

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende um sítio de ligação ao antígeno que se liga especificamente a uma proteína PSCA compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, e em que o anticorpo monoclonal compreende a sequência de aminoácidos da região V_H de SEQ ID NO: 35 e região V_L de SEQ ID NO: 37.

2. Anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal é produzido pelo hibridoma depositado sob No. de Acesso A.T.C.C. PTA-6699.

3. Anticorpo ou fragmento de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o fragmento é um fragmento Fab, F(ab')₂, Fv ou scFv.

4. Anticorpo ou fragmento de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento é acoplado a um marcador detectável.

5. Hibridoma, caracterizado pelo fato de que (a) produz o anticorpo monoclonal como definido na reivindicação 1 ou 2 e (b) está depositado sob No. de Acesso A.T.C.C. PTA-6699.

6. Polinucleotídeo, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) uma região variável da cadeia leve codificada pela SEQ ID NO: 36 ou sequências de nucleotídeos degeneradas da mesma que codificam a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 37; e

(b) uma região variável da cadeia pesada codificada pela SEQ ID NO: 34 ou sequências de nucleotídeos degeneradas da mesma que codificam a região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 35.

7. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinuclotideo como definido na reivindicação 6.

8. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou fragmento Fab, F(ab')₂, Fv ou sFv do mesmo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4.

9. Método para produção de um anticorpo como definido na reivindicação 1 ou de um fragmento de ligação a antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que compreende:

cultivar uma célula, em que:

(a) a célula tenha sido transfectada com o polinucleotideo como definido na reivindicação 6; ou

(b) a célula tenha sido transfectada com o vetor como definido na reivindicação 7;

de modo que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno do mesmo é produzido.

10. Método de detecção de uma proteína PSCA compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de:

fornecimento da amostra biológica e uma amostra de controle;

contato da amostra biológica e da amostra de controle com o anticorpo como definido na reivindicação 1, 2, 3 ou 4 que se liga especificamente à proteína PSCA; em que a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; e

determinação da quantidade de um complexo da substância com proteína PSCA compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 e o anticorpo presente na amostra biológica e amostra de controle.

11. Método de acordo com a reivindicação 10,

caracterizado pelo fato de que ainda compreende coletar a amostra biológica e a amostra de controle de um paciente que possui ou que seja suspeito de possuir um câncer de próstata, pâncreas, bexiga, rim, cólon, pulmão, ovário ou mama.

12. Método de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que o câncer é na próstata, pâncreas ou na bexiga.

13. Ensaio para detectar a presença de uma proteína PSCA compreendendo a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 em uma amostra biológica, caracterizado pelo fato de que compreende contatar a amostra com o anticorpo monoclonal como definido na reivindicação 1 e detectar a ligação da proteína PSCA na amostra, em que a proteína compreende a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.

14. Ensaio de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é marcado com um marcador detectável.

15. Ensaio de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizado pelo fato de que o câncer é na próstata, pâncreas ou bexiga.

Figura 1A. O cDNA (SEQ ID NO: 1) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 2) de PSCA v.1.
A sequência de Kozak está mostrada em negrito, a metionina inicial está sublinhada.
A fase de leitura aberta se estende a partir do aminoácido 18-389 incluindo o códon de terminação.

```

1           M K A V L L A L L M A G L A L
1 agggagagggcagtgaccATGAAGGCTGTGCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCC
16  Q P G T A L L C Y S C K A Q V S N E D C
61  TGCAGCCAGGCACTGCCCTGCTGTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACT
36  L Q V E N C T Q L G E Q C W T A R I R A
121 GCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGCGCATCCGCG
56  V G L L T V I S K G C S L N C V D D S Q
181 CAGTTGGCCTCCTGACCGTCATCAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGCCTGGATGACTCAC
76  D Y Y V G K K N I T C C D T D L C N A S
241 AGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAATCAGCTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCA
96  G A H A L Q P A A A I L A L L P A L G L
301 GCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCC
116 L L W G P G Q L *
361 TGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGgctctggggggccccgctgcagccacactg
421 ggtgtggtgccccaggccctttgtgacctcctcacagaacctggcccagtgaggagcctgt
481 cctggttcttgaggcacatcctaagcaagtttgacctgatatgtttgaccccttttcc
541 ccnaacctgaccttcccatgggcttttccaggattccacccggcagatcagttttag
601 tgacacagatccgcctgcagatggccctcccaacctttctgttgctgtttccatggccc
661 agcattttccaccttaacctgtgttcaggcacttcttccccaggaagccttccctgc
721 ccaccccatttatgaattgagccaggttttgtccgtggtgtccccgcacccagcagggg
781 acaggcaatcaggagggcccgagtaaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggagg
841 acaagagttgacgtgagttcctgggagtttccagagatggggcctggaggcctggaggaa
901 ggggccaggcctcacatttgtggggctccgaatggcagcctgagcacagcgtaggccct
961 taataaacacctgttgataagccaaaaaa

```

Figura 1B. O cDNA (SEQ ID NO: 3) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 4) de PSCA v.2.
A sequência de Kozak está mostrada em negrito, a metionina inicial está sublinhada. A fase de leitura aberta se estende a partir do aminoácido 56-427 incluindo o códon de terminação.

```

1           M K
1 tttgagggcatataaagtcacctgaggccctctccaccacagccacccagtgaccATGAA
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

```


Figura 1B (Continuação)

```

181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGTGGACCGCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
63  S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAACCTGCGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
83  N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGGCCCATGCCCTGCAGCC
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 GCTATAGgctctggggggccccgctgcagccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactctcacacacccggcccagtgaggagcctgtcctgggttctgaggcacatctta
541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgcgccccctgtccccaccctgaccctcccatggccc
601 tctccaggactcccacccggcagatcggtctattgacacagatccgcctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgtctgtgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccaggaagccttccctgcccaccccatctatgacttgagccagg
781 tctgggtccgtgggtgtccccgcacccagcaggggacaggcactcaggagggccccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggagggaagggccaggcctcacattcgtggggc
961 tccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctggttgataagcca

```

Figura 1C. O cDNA (SEQ ID NO: 5) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 6) de PSCA v.3.
A sequência de Kozak está mostrada em negrito, a metionina inicial está sublinhada. A fase de leitura aberta se estende a partir do aminoácido 423-707 incluindo o códon de terminação.

```

1  tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaa
61  ggctgtgctgcttgcctgttgatggcaggttggccctgcagccaggcactgcctgtct
121  gtgctactcctgcaaagcccaggcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgc
181  agcttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgc
241  tgtgacacccgaacttgtgcactcggcctgctgctctgtgggacccggccagctataggctct
301  gggggggccccgctgcagcccacactgggtgtggtgccccaggcctctgtgccactctca
361  cacacccggcccagtgaggagcctgtcctgggttccctgaggcacatcctaacgcaagtctga
1  M Y V C A P V P H P D P P M A L S R T P
421  ccATGTATGTCTGCGCCCTGTCCCCACCCCTGACCCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTC
21  T R Q I G S I D T D P P A D G P S N P L
481  CCACCCGGCAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCTGACAGATGGCCCTCCAACCCCTC
41  C C C F H G P A F S T L N P V L R H L F
541  TCTGCTGCTGTTTCCATGGCCCAGCATTCTCCACCCCTTAACCCCTGTGCTCAGGCACCTCT
61  P Q E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V
601  TCCCCCAGGAAGCCTTCCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGG
81  S P A P S R G Q A L R R A R *
661  TGTCCCCCGCACCCAGCAGGGGACAGGCACCTCAGGAGGGCCCGGTAAaggctgagatgaa
721  gtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagttctccagagat

```

Figura 1C (Continuação)

```

781 ggggacctggaggcctggaggaaggggccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggc
841 agcctcagcacagcgtagggccttaataaacacctgttgataagcca

```

Figura 1D. O cDNA (SEQ ID NO: 7) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 8) de PSCA v.4.
A metionina inicial está sublinhada. A fase de leitura aberta se estende a partir do aminoácido 424-993 incluindo o códon de terminação.

```

1 gacagtgaacctgcgctgaaggcggtggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
61 cccaggggtttcgtgccgatcagcccaggacgggtcttcccggtgcagtttctgatgcgggg
121 agggcagtgctgccttcgggtcaccaggaccagtgctcagcccgctgcttgacctcctt
181 acttagctgggggtccaatccatacccaatttagatgattcagacgatgggatttgaaact
241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccttgctgtgctactcctgcaaagcccagggtga
301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgctggaccg
361 cgcgcacccgcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcg
1 M T H R T T T W A R R T S R A V T P T
421 tggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAATCACGTGCTGTGACACCGACT
20 C A T P A G P M P C S R L P P S L R C S
481 TGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCC
40 L H S A C C S G D P A S Y R L W G A P L
541 CTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCCCCGCTG
60 Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P A Q
601 CAGCCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCGGCCCCAG
80 W E P V L V P E A H P N A S L T M Y V C
661 TGGGAGCCTGTCTGTTCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTATGTCTGTC
100 A P V P H P D P P M A L S R T P T R Q I
721 GCCCCGTGCCCCACCCCTGACCCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGGCAGATC
120 G S I D T D P P A D G P S N P L C C C F
781 GGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCCCTCAACCCCTCTCTGCTGCTGTTTC
140 H G P A F S T L N P V L R H L F P Q E A
841 CATGGCCCAGCATTTCTCCACCCCTAACCCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCAGGAAGCC
160 F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P A P
901 TTCCCTGCCCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCCCGCACCC
180 S R G Q A L R R A R *
961 AGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCCGGTAAaggctgagatgaagtggactgagtaga
1021 actggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtcctccagagatggggcctggaggcc
1081 tggaggaaggggccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcagcacagc
1141 gtagggccttaataaacacctgttgataagcca

```

Figura 1E. O cDNA (SEQ ID NO: 9) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 10) de PSCA v.5.
A metionina inicial está sublinhada. A fase de leitura aberta se estende a partir do aminoácido 910-1479 incluindo o códon de terminação.

```

1 gacagtgaacctgcgctgaaggcggtggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
61 cccaggggtttcgtgccgatcagcccaggacgggtcttcccggtgcagtttctgatgcgggg

```

Figura 1E (Continuação)

```

121 agggcagtgccttcgggtcaccaggaccagtgcctcagcccgcctgcttgacccctt
181 acttagctgggtccaatccatacccaatttagatgattcagacgatgggatttgaaact
241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccaggtga
301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgcctggaccg
361 cgcgcacccgtgagtggggggacgacagccgccaggccctaggtctctgccactgaactat
421 taatctttctggccatctgtccgcacatctgtgtgctgttttccttcacactgtccccgacc
481 cgteccgcacactgcaccccccaacaatcaccagcactctgtccctccagccatcctcctcc
541 atctgccactcctccactcatctgtccctccccatcctccatcttccactcctccaccca
601 tctgtccctccccatcctgagctcacttactcactcaccocatttctgacgtcagcgg
661 gtgggtccatctgcctcggacatctggatagggctgagaccagggccgagaccagggcctc
721 gcaactgcttgcaatcctgaggccagcccagggggactctagagcattaggcaggggtggga
781 caggaggaggcctggggcaggtcaggcaggtgagcacacagggcagcccatccccggat
841 cccgctgctccccaggcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttga
1      M T H R T T T W A R R T S R A V T
901 actgcgtggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACA
18 P T C A T P A G P M P C S R L P P S L R
961 CCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGC
38 C S L H S A C C S G D P A S Y R L W G A
1021 TGCTCCCTGCACTCGGCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCC
58 P L Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P
1081 CCGCTGCAGCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCG
78 A Q W E P V L V P E A H P N A S L T M Y
1141 GCCCAGTGGGAGCCTGTCTGTGTTCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTAT
98 V C A P V P H P D P P M A L S R T P T R
1201 GTCTGCGCCCTGTCCCCACCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGG
118 Q I G S I D T D P P A D G P S N P L C C
1261 CAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCCCTGCAGATGGCCCTCCAACCCTCTCTGCTGC
138 C F H G P A F S T L N P V L R H L F P Q
1321 TGTTTCATGGCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCAG
158 E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P
1381 GAAGCCTTCCCTGCCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCC
178 A P S R G Q A L R R A R *
1441 GCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGTAAaggctgagatgaagtggactg
1501 agtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtcctcagagatggggcctg
1561 gaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctcctgaatggcagcctcag
1621 cacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Figura 1F. O cDNA (SEQ ID NO: 11) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 12) de PSCA v.6. A sequência de Kozak está mostrada em negrito, a metionina inicial está sublinhada. A fase de leitura aberta se estende a partir do aminoácido 83-427 incluindo o códon de terminação.

Figura 1F (Continuação)

```

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 CCAGCTGGGGGAGCAGTGTGACCGCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
54 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGCCTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
74 N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCC
94 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
361 GGCTGCCCGCCATCCTTGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
114 L *
421 GCTATAGgctctctggggggccccgctgcagccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactcctcacacacccggccagtgaggagcctgtcctggttctctgaggcacatccta
541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc
601 tctccaggactcccacccggcagatcggtctattgacacagatccgctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccagggaagccttccctgcccaccccatctatgacttgagccagg
781 tctggctcgtggtgtcccccgcaaccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaagggggccaggcctcacattcgtggggc
961 tcctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Figura 1G. Variantes SNP de PSCA v.7 até v.18. As proteínas PSCA v.7 até v.18 possuem 123 aminoácidos. Variantes PSCA v.7 até v.18 são variantes com diferença de um único nucleotídeo em relação a PSCA v.2, e codificam a mesma proteína que a v.2. Embora estas variantes SNP estejam mostradas separadamente, elas também podem ocorrer em qualquer combinação e em qualquer uma das variantes de transcritos listadas acima nas Figuras 2A a 2F.

Variante	Posição do ácido nucleico	Varição do ácido nucleico	Varição do aminoácido:
PSCA v.7	367	C/T	Variante silenciosa
PSCA v.8	424	A/C	Variante silenciosa
PSCA v.9	495	C/G	Variante silenciosa
PSCA v.10	499	C/T	Variante silenciosa
PSCA v.11	563	C/T	Variante silenciosa
PSCA v.12	567	G/A	Variante silenciosa

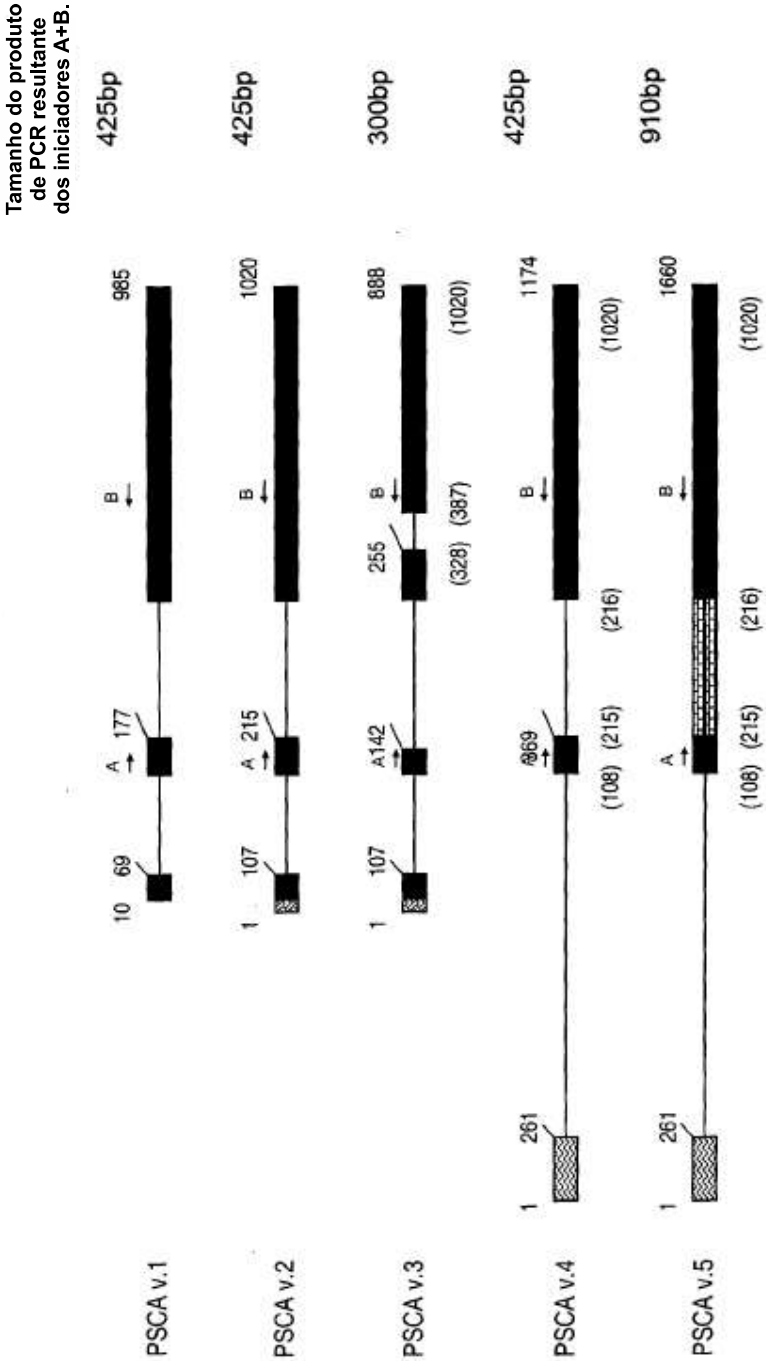
Figura 1G (Continuação)

Variante	Posição do ácido nucleico	Variação do ácido nucleico	Variação do aminoácido
PSCA v.13	627	G/A	Variante silenciosa
PSCA v.14	634	T/G	Variante silenciosa
PSCA v.15	835	G/A	Variante silenciosa
PSCA v.16	847	G/A	Variante silenciosa
PSCA v.17	878	G/A	Variante silenciosa
PSCA v.18	978	C/G	Variante silenciosa

Figura 1H. Variantes SNP de PSCA v.4, PSCA v.19 até v.30. As proteínas PSCA v.19 até v.30 possuem 189 aminoácidos. Variantes PSCA v.19 até v.30 são variantes com diferença de um único nucleotídeo em relação a PSCA v.4. As proteínas 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 estas variantes SNP estejam mostradas separadamente, elas também podem ocorrer em qualquer combinação e em qualquer uma das variantes de transcritos v.3 e v.4.

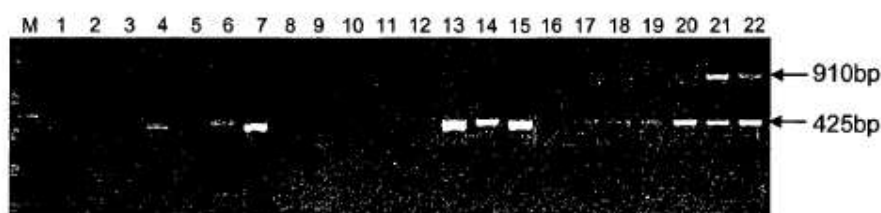
Variante	Posição do ácido nucleico	Variação do ácido nucleico	Posição do aminoácido	Variação do aminoácido
PSCA v.19	521	C/T	33	P/L
PSCA v.20	578	A/C	52	Y/S
PSCA v.21	649	C/G	76	H/D
PSCA v.22	653	C/T	77	P/L
PSCA v.23	717	C/T	98	Variante silenciosa
PSCA v.24	721	G/A	100	A/T
PSCA v.25	781	G/A	120	G/S
PSCA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

Figura 1I(a)



Expressão de PSCA v.4 e PSCA v.5. Figura 1J(a): Os iniciadores foram desenhados para distinguir entre PSCA v.4 e PSCA v.5. PSCA v.4 leva a um produto de PCR de 460 bp, ao passo que PSCA v.5 leva a um produto de PCR de 945 bp de tamanho.

Figura 1I(b)



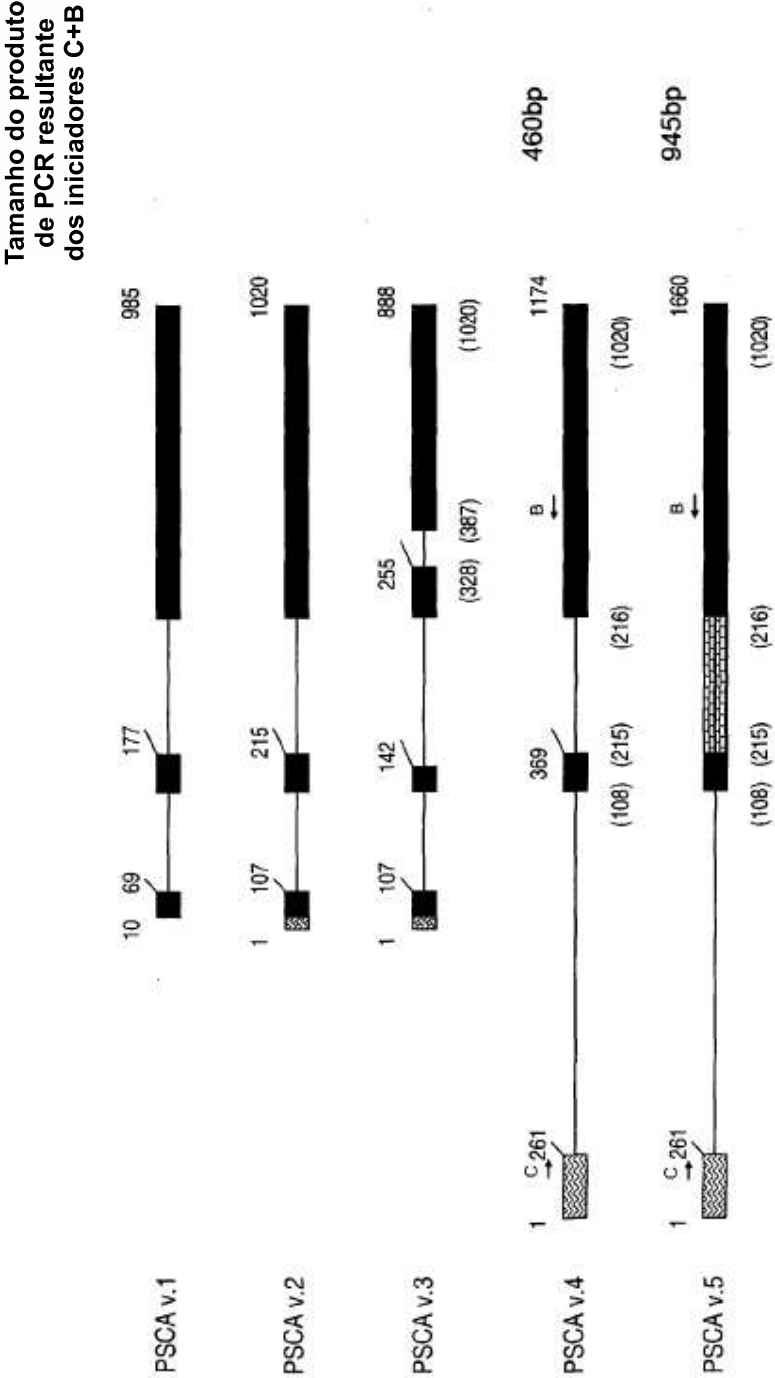
M=Marcador

- Bexiga
- Cérebro
- Coração
- Rim
- Fígado
- Pulmão
- Próstata
- Baço
- Músculo esquelético
- Testículo
- Pâncreas
- Cólon
- Estômago

- Câncer de próstata
- Câncer de bexiga
- Câncer de rim
- Câncer de cólon
- Câncer de pulmão
- Câncer de ovário
- Câncer de mama
- Câncer de metástase
- Cancer de pancreas

Expressão de PSCA v.4 e PSCA v.5. Figura 1J(b). O primeiro cordão de cDNA foi preparado a partir de bexiga normal, cérebro; coração; rim; fígado; pulmão; próstata; baço; músculo esquelético; testículo; pâncreas; cólon; estômago; lagos de câncer de próstata; câncer de bexiga; lago de múltiplos xenoinxertos (xenoinxertos de câncer de próstatas, câncer renal e câncer de bexiga). A normalização foi feita por PCR usando iniciadores para actina. PCR semi-quantitativa, usando iniciadores específicos para a variante, foi realizada em 30 ciclos de amplificação. Os resultados mostram a expressão de PSCA v.4 em câncer de próstata, câncer de bexiga, e lago de múltiplos xenoinxertos, rim e próstata normais. PSCA v.5 foi detectada somente em próstata normal e câncer de bexiga.

Figura 1J(a)



Expressão de PSCA v.4 e PSCA v.5. Figura 1J(a) Os iniciadores foram desenhados para distinguir entre PSCA v.4 e PSCA v.5. PSCA v.4 leva a um produto de PCR de 460 bp, ao passo que PSCA v.5 leva a um produto de PCR de 945 bp de tamanho.

Figura 1J(B)



M=Marcador

- Bexiga
- Cérebro
- Coração
- Rim
- Fígado
- Pulmão
- Próstata
- Baço
- Músculo esquelético
- Testículo
- Pâncreas
- Cólon
- Estômago

- Câncer de próstata
- Câncer de bexiga
- Lago de múltiplos xenoinxertos.

Expressão de PSCA v.4 e PSCA v.5. Figura 1J(b): O primeiro cordão de cDNA foi preparado a partir de bexiga normal, cérebro; coração; rim; fígado; pulmão; próstata; baço; músculo esquelético; testículo; pâncreas; cólon; estômago; lagos de câncer de próstata; câncer de bexiga; lago de múltiplos xenoinxertos (xenoinxertos de câncer de próstatas, câncer renal e câncer de bexiga). A normalização foi feita por PCR usando iniciadores para actina. PCR semi-quantitativa, usando iniciadores específicos para a variante, foi realizada em 30 ciclos de amplificação. Os resultados mostram a expressão de PSCA v.4 em câncer de próstata, câncer de bexiga, e lago de múltiplos xenoinxertos, rim e próstata normais. PSCA v.5 foi detectada somente em próstata normal e câncer de bexiga.

Figura 2A. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 13) de Ha1-4.117 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 VAAPRWVLSQ VQLQESGPGL VKPSQTLSTL CTVSGGSISS GGYWIIWIRQ HPGKGLEWIG
61 YIYVNGNTYY NPSLKSRTVM SVDTSKNQFS LKLSSVTAAD TAVYYCARDG ITMIRGYIYG
121 MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVKGPSVF

```

Figura 2B. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 14) de Ha1-4.117 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 QLTQSPSSVS ASVGDRVTIT CRASGISW LAWYQKPGK APKLLIYTAS SLQSGVPSRF
61 SGSGSGTDFT LTISLQPED FATYYCQAY SFRFTFGQGT KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD
121 EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSG

```

Figura 2C. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de Ha1-4.120 VH.

```

1 QCVAAPRWVL SQVQLQESGP GLVKPSQTLT LTCTVSGGSI SSGGYWSWI RQHPGKGLEW
61 IGYIYSGST YNPSLKSRTV TISVDTSKNQ FSLKLSSVTA ADTAVYYCAR DRITMVRGGI
121 PSGMDVWGQG TTVTVS

```

Figura 2D. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 16) de Ha1-4.120 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 SPFTCRASQS ITNYLNWYQQ KPGEAPKLLI HVASSLQSGV PSRFSGSGSG RDFTLTISL
61 QPEDFATYYC QSHSIPRTF GQGTKVEIKR TVAAPSVEFIF PPSDEQLKSG TASVCLLNN
121 FYPREAKVQW KVDNALQSG

```

Figura 2E. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 17) de Ha1-5.99 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 QVHLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSFY GYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTSYK
61 PSLKSRTVTS VDTSKNQFSL KLSYVTAADT AVYYCARDRG DYGDFLFDYW GQGTLVTVSS
121 ASTKGPSVFP LAPSSKST

```

Figura 2F. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) de Ha1-5.99 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 SPGERATLSC RASQSIGSTY LAWYQKPGQ APRLLIYGAS SRATGIPERF SGSGSGTDFT
61 LTISGLEPED FAVFYCQCG SSPFTFGQGT KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV
121 VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN A

```

Figura 2G. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 19) de Ha1-4.121 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  GLQCVAAPRW VLSQVQLQQW GAGLLKPSET LSLTCAVYGG SFSGNYWSWI RQPPGKGLEW
61  IGEINHSGST NYNPSLKSRV TISVDTSKNQ FSLKLSVTA ADTAVYYCAR GGSYNYFDYW
121 GQGTILVTVSS ASTKGPSVK

```

Figura 2H. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 20) de Ha1-4.121 VL c.5. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  MDMRVPALL GLLLLNLGA RCDIQMTQSP SLSASVGDRT VTITCQASQD ISNYLNWYQQ
61  SPGKAPKFLI SDASNLKTVG PSRFSGSGSG TDFSTISSL QPEDIATYCC QQYDSLPTTF
121 GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
181 SQESVTEQDS KDSTYLSST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

```

Figura 2I. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 21) de Ha1-4.121 VL c.26. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  MRLPAQLLGL LMLWVSGSSG DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSL LHSNGYNLVW
61  YLQKPGQSPQ LLIYLSIRA SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQPLQTP
121 ITFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ
181 SGNSQESVTE QDSKDYSL SSSLTSLKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

```

Figura 2J. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 22) de Ha1-1.16 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  QVQLQSGPG LVKPSQTL LSLTCAISGDSVS SNSAANWIR QSPSRGLEWL GRTYYRSKWY
61  NGYAVSVKSR MTINPDTSKN QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA RERLGELYGM DVWGQGTITV
121 VSSASTKGPS VFPLAPSSK T

```

Figura 2K. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 23) de Ha1-1.16 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  QLTQSPDSL VSLGERATIN CKSSQNILYR SSKKNHLVWY QQKPGQPPKL LIYWASTRES
61  GVPARFSGSG SGTDFTLTIS TLQAEDVAVY YCQQYSTPP TFGQGTRLEI KRTVAAPSVF
121 IFPPSDEQLK SGTASVCLLN NNFYPREAKV QWKVDNALQS G

```

Figura 2L. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 24) de Ha1-4.5 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  GPGXXKPSQX LSLTGTVSGG SISSGGYYWS WIRQHPGKGL EMIGNIYVSG
51  STYYNPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSAV TAADTAVYYC ARDNITMVRG
101 VYYGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTY

```

Figura 2M. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 25) de Ha1-4.5 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  YAASSLQSGV PSRFSGSGSG TDFTLTISL QPEDFATYYC QQAHSPLPTF
51  GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPRKAKVQW
101 KVDNTLQ

```

Figura 2N. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 26) de Ha1-4.40 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS RHGVHWVRQA PGKGLEWVAV
51  IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARGG
101  LIAVRPGYYY YGMDVWGQGT TTVTSSASTK GPSVFPLAPS SKST

```

Figura 2O. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 27) de Ha1-4.40 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  EMQLTQSPSS LSASVGRVT ITCRASQSI SYLNWYQKP GKAPKLLIYA
51  ASSLQSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQ SYSTPLTFGG
101  GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV
151  DNALQSG

```

Figura 2P. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 28) da Ha1-4.37 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  CPGALQESGP GLVRPSQTL LICTVSGGSI SSGGTYTWIW IRQHPGKGLE
51  WIGYIYSGS TYYNPSLKS RTISVDTSKN QPSLKLSSVT AADTAVYYCA
101  RDGITMVRGI SSGMDVWGQG TTVTVSSAST KGPSVKGPSV F

```

Figura 2Q. a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 29) de Ha1-4.37 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  ASVGRVTIT CRASQSISS LNWYQKPGK APKLLIYAAS SLQSGVPSRF
51  SGSGSGTDFT LSISSLQPED PATYFCQSY SIPRTFGQGT KVEITRTVAA
101  PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQWKVDN ALQSG

```

Figura 2R. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 30) de Ha1-1.43 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  QLQSGPGLV KPSQTLSTC AISGDSVSSN SAAWNIRQS PSRGLEWLGR
51  TYRSKWKYNE YAVSVKSRMT INPDTSKNQF SLQLNSVTPE DTAVYYCARE
101  RLGEYGM DVWGQGTMTVS SASTKGPSVF PLAPSSKST

```

Figura 2S. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 31) de Ha1-1.43 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1  LQVQPECLYT VSDKNNFLCW YQKPGQPPK LLMYWASIRE SGVPDRFSGS
51  GSGTDFTLT LSIQLAEDVAV YYCQYYSTP PTFGQGTRE IKRTVAAPSV
101  FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRE

```

Figura 2T. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 32) de ha1-1.152 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1  QVQLQSGPG LVKPSQTLST TCAISGDSVS SNSAAWNIR QSPWRGLEWL
51  GRITYRSKWKY NEYAVSVKSR MTINPDTSKN QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA
101  RERLGEYGM DVWGQGTMTV VSSASTKGPS VFPLAPSSKS T

```

Figura 2U. A sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 33) de Ha1-1.152 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```
1  MQLTQSPDSL AVSLGERATI NCKSSQNVLY RSNKKNFLVW YQKPGQPPK
51  LLIYWASIRE SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQTEDVAV YYCQYYSTP
101 PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SG
```

Figura 3A. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 34) e sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 36) de Ha1-4.117 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P G L
1 gtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactg
21 V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S S
61 gtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatcagcagt
41 G G Y Y W I W I R Q H P G K G L E W I G
121 ggtggttactactggatctggatccgccagcaccaggaaggccctggagtggttggg
61 Y I Y Y N G N T Y Y N P S L K S R V T M
181 tacatctattacaatgggaacacctactacaaccgcctccctcaagagtcgagttaccatg
81 S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D
241 tcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgaggac
101 T A V Y Y C A R D G I T M I R G Y Y Y G
301 acggccgtgtattactgtgcgagagatgggtattactatgatacgcggctactactacggt
121 M D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P
361 atggacgtctggggccaagggaaccacgggtcacggtctcctcagcctccaccaagggccca
141 S V K G P S V F
421 tcgggtcaagggcccatcggtcttca

```

Figura 3B. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 36) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 37) de Ha1-4.117 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 Q L T Q S P S S V S A S V G D R V T I T
1 cagctgaacncagtcctccatcttccgtgtctgcactctgtaggagacagagtcaccatcact
21 C R A S R G I S S W L A W Y Q Q K P G K
61 tgtcgggcagtcgggggtattagcagctggtagcctggtagcagcagaaccaggga
41 A P K L L I Y T A S S L Q S G V P S R F
121 gcccctaagctcctgatctatactgcacccagtttgcaaagtgaggctcccatcaagggtc
61 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D
181 agcggcagtggttctgggacagatttccactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat
81 F A T Y Y C Q Q A Y S P P R T F G Q G T
241 tttgcaacttactattgtcaacaggtttacagtttccctcggacgttcggccaaggga
101 K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D
301 aagggtggaatcaaacgaactgtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgat
121 E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R
361 gagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccaga
141 E A K V Q W K V D N A L Q S G
421 gaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggta

```

Figura 3C. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 38) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) de Ha1-4.120 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 Q C V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P
1 cagtgtgtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggccc
21 G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I
61 ggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctggtggctccatc
41 S S G G Y Y W S W I R Q H P G K G L E W
121 agcagtggtggttactactggagctggatccgccagcaccaggaaggccctggagtg
61 I G Y I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V
181 attgggtacatatattacagtgaggacacctactacaaccgcctccctcaagagtcgagtt
81 T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
241 accatatcagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactgcc
101 A D T A V Y Y C A R D R I T M V R G G I
301 gcgacacggccgtgtattactgtgcgagagatcgaattactatggttcggggagggtatt
121 P S G M D V W G Q G T T V T V S
361 cccagtggtatggacgtctggggccaagggaaccacgggtcacggtctcct

```

Figura 3D. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 40) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) de Ha1-4.120 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 S P F T C R A S Q S I T N Y L N W Y Q Q
1 tcaccattcacttgcgggcaagtcagagcattaccaactatttaaatgggtatcagcag
21 K P G E A P K L L I H V A S S L Q S G V
61 aaaccaggggaagccccctaagctcctgatccatgttgcatccagtttgcaaagtggggtc
41 P S R F S G S G S G R D F T L T I S S L
121 ccatcaagggttcagtgggcagtggtctgggagagatttcactctcaccatcagcagctctg
61 Q P E D F A T Y Y C Q Q S H S I P R T F
181 caacctgaagattttgcaacttactactgtcaacagagtcacagtatccctcggagcttc
81 G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F
241 ggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgttctcatcttc
101 P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
301 ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttctgtgacctgtgaataac
121 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
361 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggt

```

Figura 3E. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 42) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 43) de Ha1-5.99 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 Q V H L Q Q W G A G L L K P S E T L S L
1 caggtgcatctacagcagtgggggcagggactgttgaaagccttcggagaccctgtccctc
21 T C A V Y G G S P S G Y Y W S W I R Q P
61 acctgcgctgtctatgggtgggtccttcagtggttactactggagctggagtcgccagccc
41 P G K G L E W I G E I N H S G S T S Y K
121 ccggggaagggactggagtggttggggaatcaatcatagtggaagcaccagctacaag
61 P S L K S R V T V S V D T S K N Q F S L
181 ccgtccctcaagagtcagtcacccgtatcagtggaacagtcaccaagaaccagttctccctg
81 K L S Y V T A A D T A V Y Y C A R D R G
241 aagctgagctatgtgaccgcgcggacacggctgtgtattactgtgagagataggggt
101 D Y G D F L F D Y W G Q G T L V T V S S
301 gactacgggtgacttctctcttgactactggggccaggggaaccctggtcacgtctctctca
121 A S T K G P S V F P L A P S S K S T
361 gcctccaccaagggcccatcgggtcttccctcctggcaccctcctccaagagcaccta

```

Figura 3F. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 44) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 45) de Ha1-5.99 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 S P G E R A T L S C R A S Q S I G S T Y
1 tctccaggggaagagccaccctctctgcagggccagtcagagtattggcagcacctac
21 L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
61 ttagcctgggtaccagcagaaacctggccaggtctccaggtctctcatctatgggtgatcc
41 S R A T G I P E R F S G S G S G T D T
121 agcagggccactggcatccagaaaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaact
61 L T I S G L E P E D F A V F Y C Q Q C G
181 ctaccatcagcggactggagcctgaagattttgcagtggtttactgtcaacagtggtggt
81 S S P P T F G Q G T K V E I K R T V A A
241 agctcacctccgacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcaaacgaactgtggctgca
101 P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
301 ccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
121 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N
361 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac
141 A
421 gcctt

```

Figura 3G. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 46) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 47) de Ha1-4.121 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 G L Q C V A A P R W V L S Q V Q L Q Q W
1 ggtctgcagtggtggcagcacccagatgggtcctgtcccaggtgcagctacagcagtggt
21 G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G

```

```

61 ggcgaggactgttgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgctgtctatgggtggg
41 S F S G N Y W S W I R Q P P G K G L E W
121 tccttcagtggttaactactggagctggatccgccagccccagggagggtgagtggtg
61 I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V
181 attggggaaatcaatcatagtgaagcaccacactacaacccgtccctcaagagtcgagtc
81 T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
241 accatatcagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgcc
101 A D T A V Y Y C A R G G S Y N Y F D Y W
301 gcgagacacggctgtgtattactgtgcgagagggggagctacaactactttgactactgg
121 G Q G T L V T V S S A S T K G P S V K
361 ggccagggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggccatcggtcaag

```

Figura 3H. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 48) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 49) de Ha1-4.121 VL c.5. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 M D M R V P A Q L L G
1 aaaaaagtcagtcaccaaccaggacacagcATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGCTCCTGG
12 L L L L W L S G A R C D I Q M T Q S P S
61 GGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAT
32 S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q D I
121 CCTCCCTGCTGCTCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACA
52 S N Y L N W Y Q Q S P G K A P K F L I S
181 TTAGCAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAGTCCCGGAAAGCCCTAAGTTCCTGATCT
72 D A S N L K T G V P S R F S G S Q S G T
241 CCGATGCATCCAATTTAAAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAGTGGATCTGGGA
92 D F S P T I S S L Q P R D I A T Y C C Q
301 CAGATTTTCTTTCACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATATTGCGACCTATTGCTGTC
112 Q Y D S L P P T F G P G T K V D I K R T
361 AACAGTATGATAGTCTCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAAAGAA
132 V A A P S V P I F P P S D E Q L K G T
421 CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
152 A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K
481 CTGCCTCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGA
172 V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K
541 AGGTGGATAACGCCCTCCAACTCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
192 D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H
601 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
212 K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F
661 ACAAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCCGTACAAAGAGCT
232 N R G E C *
721 TCAACAGGGGAGAGTGTAGaggggagaagtgccccacctgtcctcagttccagcctga
781 cccccctccatcctttggcctctgaccctttttccacaggggacctaaccctattgcggt
841 cctccagctcatctttcacctcacccccctcctcctccttggctttaattatgctaattgt
901 tggaggagaatgaataaataaagtggaatctttg

```

Figura 3I. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 50) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 51) de Ha1-4.121 VL c.26. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 M R L P A Q L L G
1 aaagatcaggactcctcagttcaccttctcacaATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGG
10 L L M L W V S G S S G D I V M T Q S P L
61 CTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTC
30 S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L
121 TCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTC
50 L H S N G Y N Y L V W Y L Q K P G Q S P
181 CTACATAGTAATGGATACAACCTATTGGTTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGACAGTCTCCA
70 Q L L I Y L G S I R A S G V P D R F S G
241 CAGCTCCTGATCTATTTGGGTTCTATTCCGGCCCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGC
90 S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G
301 AGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
110 V Y Y C M Q P L Q T P I T F G Q G T R L
361 GTTATTACTGCATGCAACCTCTACAACTCCGATCACCTTCGOCCAAAGGACACGACTG
130 E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q

```



```

421 GAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
150 L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A
481 TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCC
170 K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
541 AAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACA
190 E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A
601 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCA
210 D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
661 GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
230 V T K S F N R G E C *
721 GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGaggggagaagtgcacccacctgtctctc
781 agttccagcctgacccccctcccatcctttggcctctgaccccttttccacaggggaccta
841 cccctattgcggtcctccagctcatctttcacctcacccccctcctcctccttggcttta
901 attatgctaattgttggaggagaatgaataaataaagtgaattctttgcaaaaaaaaaaaaaa
961 aaaaaaaa

```

Figura 3J. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 52) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 53) de Ha1-1.16 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L
1 caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctgcagaccctctcactc
21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
61 acctgtgccatctccggggacagtgctctctagcaacagtgctgcttggaaactggatcagg
41 Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
121 cagtccccatcgagaggccttgagtggtggtgggaaggacatactacaggtccaagtgttat
61 N G Y A V S V K S R M T I N P D T S K N
181 aatggttatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaac
81 Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A
241 cagttctccctgcagctgaactctgtgactcccgaggacacggctgtgtattactgtgca
101 R E R L G E L Y G M D V W G Q G T T V T
301 agagagaggttaggggagttatacgggtatggacgtctggggccaagggaccacgttcacc
121 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
361 gtctctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagc
141 T
421 accta

```

Figura 3K. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 54) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 55) de Ha1-1.16 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 Q L T Q S P D S L A V S L G E R A T I N
1 cagctgaacgcagctctccagactccctggctgtgtctctgggagagagggccaccatcaac
21 C K S S Q N I L Y R S S K K N H L V W Y
61 tgcaagtccagccagaatattttatacaggtccagcaagaagaaccacttagtttggtac
41 Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S
121 cagcagaaaccaggacagcctcctaagctgtctcatttactgggcatctaccgggaatcc
61 G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S
181 ggggtccctgccccgattcagtgaggcgggtctgggacagatttactctcaccatcagc
81 T L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P P
241 accctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtaactcctccc
101 T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F
301 accttcggccaagggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttc
121 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L
361 atcttcccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctg
141 N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S
421 aataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcg
161 G
481 ggta

```

Figura 3L. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 56) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 57) de Ha1-4.5 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 A Q D X X S L H R P V P H R H C L W W P
1 Ggcccaggacngngaâgccttcacagacctgtccctcaccggcactgtctctgggtggcc
21 I S S G G Y Y W S W I R Q H P G K G L E
61 catcagcagtggtggttattactggagctggatccgccagcaccaggaaggcctgga
41 W I G N I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R
121 gtggattgggaacatctattacagtgggagcacctactacaacccgtccctcaagagtcg
61 V T I S V D T S K N Q F S L K L S A V T
181 agttaccatatcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagcgtgtgac
81 A A D T A V Y Y C A R D N I T M V R G V
241 tgcgcggacacggcgtgtattactgtgcgagagataatattactatgggtcggggagt
101 Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T
301 ctactacggtatggagctctggggccaaggaccaggtcaccgtctctcctcagcctccac
121 K G P S V F P L A P S S K S T Y
361 caagggcccatcggtcttccctctggcaccctcctccaagagcacctat

```

Figura 3M. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 58) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 59) de Ha1-4.5 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G
1 tatgcagcatccagtttgcâagtggtggtcccatcaagggtcagcggcagtggtatctgga
21 T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C
61 acagacttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttactattgt
41 Q Q A H S L P R T F G Q G T K V E I K R
121 caacaggtctcacagtcctccctcggacgttcggccaagggaaccaagtggaatcaaacga
61 T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
181 actgtggtgcaccatctgtcttctatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctgga
81 T A S V V C L L N N F Y P R K A K V Q W
241 actgcctctgttgcctgctgaataacttctatcccagaaaggccaaagtacagtggt
101 K V D N T L Q
301 aagggtgataacaccctccaa

```

Figura 3N. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 60) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 61) de Ha1-4.40 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
1 Caggtgcagctggtgagtcctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc
21 S C A A S G F T F S R H G V H W V R Q A
61 tcctgtgcagcgtccggattcaccctcagtcgcatggcgtgcactgggtccgccaggct
41 P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y
121 ccaggcaagggtcgtgagtggtggcagttatattggtatgatggaagtaataataactat
61 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 gcagactccgtgaaggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G G
241 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggagge
101 L I A V R P G Y Y Y G M D V W G Q G T
301 cttatagcagttcgtccgggtactactactacggtatggacgtctggggccaagggacc
121 T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S
361 acggtcaccgtctctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccctctggcaccctcc
141 S K S T
421 tccaagagcacct

```

Figura 3O. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 62) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 63) de Ha1-4.40 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 E M Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 Gaaatgcagctgacccagctctccatcctccctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
21 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
61 atcacttgccgggcaagtcaagcattagcagctattttaaattggatcagcagaaacca
41 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
121 ggaaaagccctaaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtgggtcccatca
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 aggttcagtgaggatctgggacagatttcactctcaccatcagcagctctgcaacct
81 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P L T F G G
241 gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaaccccgctcactttcggggga
101 G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
301 gggaccaaggtggagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcattctcccgcca
121 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
361 tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataacttctat
141 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
421 cccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataacgccctccaatcgggt

```

Figura 3P. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 64) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 65) de Ha1-4.37 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

```

1 C P G A L Q E S G P G L V R P S Q T L S
1 tgtccaggtgcactgcaggagtcgggcccaggactggtagggccttcacagacctgtcc
21 L T C T V S G G S I S S G G T Y Y W I W
61 ctccactgcactgtctctgggtggtccatcagcagtggtggtacttactactggatctgg
41 I R Q H P G K G L E W I G Y I Y Y S G S
121 atccgccagcaccaggggaagggcctggagtggtggtacatctattacagtgaggagc
61 T Y Y N P S L K S R V T I S V D T S K N
181 acctactacaacccgtccctcaagagtcgagttaccatattcagtagacacgtctaagaac
81 Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A
241 cagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgggacacggcgcgtgtattactgtgg
101 R D G I T M V R G I S G G M D V W G Q G
301 agagatggaattactatggttcgggggaattagcgggggcatggacgtctctggggccaaggg
121 T T V T V S S A S T K G P S V K G P S V
361 accacggtcacccgtctctcagcctccaccaagggcccatcggtcaagggcccatcggtc
141 F
421 ttca

```

Figura 3Q. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 66) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 67) de Ha1-4.37 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S H
1 Gcatctgtaggagacagagtcacccatcacttgccgggcaagtcaagcattagtagtcat
21 L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S
61 ttaaattggatcagcagaaaccagggaaagccctaaagctcctgatctatgctgcttcc
41 S L Q S G V P S R F S G S G T D F T
121 agttttgcaaagtgggtcccatcaaggttcagtgaggatctgggacagatttcact
61 L S I S S L Q P E D F A T Y F C Q Q S Y
181 ctctccatcagcagctctgcaacctgaagattttgcaacttacttctgtcaacagagttac
81 S I P R T F G Q G T K V E I T R T V A A
241 agtatccctcggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcacacgaactgtggctgca
101 P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
301 ccattctgtcttctcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
121 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N
361 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtgggaaggtggataac

```

141 A L Q S G
421 gccctccaatcgggta

Figura 3R. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 68) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 69) de Ha1-1.43 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

1 Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C
1 Cagctgcagcagtcaggtccaggactgggtgaagccctcgcagaccctctcactcaccctgt
21 A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S
21 A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S
61 gccatctccggggacagtggtctctagcaacagtgctgcttggaaactggatcaggcagtc
41 P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N E
121 ccctcgagaggcccttgagtggtgggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgaa
61 Y A V S V K S R M T I N P D T S K N Q F
181 tatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaaccagttc
81 S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A R E
241 tccctgcagctgaactctgtgactcccgaggacacggctgtgtattactgtgcaagagag
101 R L G E L Y G M D V W G Q G T M V T V S
301 aggttaggggagttatcaggtatggacgtctggggccaagggaaccatggtaaccgtctcc
121 S A S T K G P S V F P L A P S S K S T
361 tcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacc

Figura 3S. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 70) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 71) de Ha1-1.43 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

1 L Q V Q P E C L Y T V S D K N N F L C W
1 Ctgcaagtcagccagcagtggtctttatcacagtggtccgacaagaacaactctctatgttgg
21 Y Q Q K P G Q P P K L L M Y W A S I R E
21 Y Q Q K P G Q P P K L L M Y W A S I R E
61 taccagcagaaaccaggacagcctcctaaactgctcatgtactgggcattctatccgggaa
41 S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I
121 tccgggggtccctgaccgattcagtggtcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatc
61 S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P
181 agcagcctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagttactcct
81 P T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V
241 cccaccttcggccaagggaacagcagctggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
101 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
301 ttcatcttccccccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgggtgctg
121 L N N F Y P R E
361 ctgaataacttctatccagagag

Figura 3T. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 72) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 73) de Ha1-1.152 VH. A região constante da cadeia pesada está sublinhada.

1 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L
1 caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactgggtgaagccctcgcagaccctctcactc
21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
61 acctgtgccatctccggggacagtggtctctagcaacagtgctgcttggaaactggatcagg
41 Q S P W R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
121 cagtcceccatggagaggcccttgagtggtgggaaggacatactacaggtccaagtggtat
61 N E Y A V S V K S R M T I N P D T S K N
181 aatgaatatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaac
81 Q P S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A
241 cagttctccctgcagctgaactctgtgactcccgaggacacggctgtgtattactgtgca
101 R E' R L G E L Y G M D V W G Q G T T V T
301 agagagaggttaggggagttatcaggtatggacgtctggggccaagggaaccacgtcacc
121 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
361 gtctctcagcctccaccaaggggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc
141 T
421 accta

Figura 3U. A sequência de cDNA (SEQ ID NO: 74) e a sequência de aminoácidos (SEQ ID NO: 75) de Ha1-1.152 VL. A região constante da cadeia leve está sublinhada.

```

1 M Q L T Q S P D S L A V S L G E R A T I
1 atgcagctgacncagttctccagactccctggctgtgtctctctgggcgagagggccaccatc
21 N C K S S Q N V L Y R S N K K N F L V W
61 aactgcaagtccagccagaatgtttatacaggtccaacaagaagaacttcttagtttgg
41 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S I R E
121 taccagcagaaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctatccgggaa
61 S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I
181 tccggggtccctgaccgattcagtggtcagcgggtctctgggacagatttcactctcaccatc
81 S S L Q T E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P
241 agcagcctgcagactgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtagtactct
101 P T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V
301 cccaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
121 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
361 ttcattcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctg
141 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
421 ctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaa
161 S G
481 tcgggta

```

Figura 4A. Alinhamento de Ha1-4.117 VH com VH4-31 humana.

```

      <-----FWR1-----> <-CDR1> <-----FWR2-----> <-----CDR2-----> <--
Ha1-4.117VH 10 QVQLQESGPGLVKPFSQTLSELTCTVSGGIS SGGYYWI -WIRQHPGKGLEWIG YIY---YNG-N-T-Y---YNPSLK S RVT 79
(VH4-31/D3-22/JH6)
VH4-31 1 .....S .....S-..... 70
      <-----FWR3-----> <-----CDR3-----> <constant region>
Ha1-4.117VH 80 MSVDTSKNOFSLKLSSTVAADPAVYYCAR DGITMIRGYYGMDV WQQTITVTYSS ASTKGPSVKGPSVF
(VH4-31/D3-22/JH6)
VH4-31 71 I..... 70

```

Figura 4B. Alinhamento de Ha1-4.117 VL com L19 humana.

```

      <-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2> <-----FWR3----->
Ha1-4.117 VL 1 --QLTQSPSSVSASVDRAVTITC RASRGISS-NLA WYQKPGKAPKLLIY TASSLOS GVPSPFSGSGSGTDFTLTISLQ 77
(L19/JK1)
L19 1 DI.M.....Q.....A..... 79
      <-----> <-CDR3-> <constant region>
Ha1-4.117 VL 78 PEDFATYYC QQAV SPP RTFGQGTKEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(L19/JK1)
L19 80 .....N.....

```

Figura 4C. Alinhamento de Ha1-4.120 VH com VH4-31.

Ha1-4.120 VH	12	<-----FWR1----->	<-CDR1>	<-----FWR2----->	<-----CDR2----->	<----->
(VH4-31/D3-10/JH6)		QVQLQESGPCLVKPSCQTLSTCTVSGCSIS	SGGYWS	WIRQHPGKGLEMI-G	YIY---YSG-S-T-Y--YNPSLKS	RVTI 82
VH4-31	1 71
Ha1-4.120 VH	83	-----FWR3----->	<-----CDR3----->	<----->	<constant region>	
(VH4-31/D3-10/JH6)		SVDTSKNQPSLKLSSVPAADTAVVYCAR	DRITMVRGGIPSCMDV	WGQCTTVTVSS	ASTKGPSVKGPSVF	
VH4-31	72	-----	-----	-----	

Figura 4D. Alinhamento de Ha1-4.120 VL com O2 humana.

Ha1-4.120 VL	4	<-----FWR1----->	<-----CDR1----->	<-----FWR2----->	<-CDR2>	<-----FWR3----->
(O2/JK1)		-----TC	RASQSITN-YLN	WYQKPGEAPKLLIH	VASSLQS	GVPSRFSGSGSRDFTLTISLIQ 61
O2	1	DIQMTQSPSSLSASVGDAVTI..SS-...K.....Y	A.....T..... 79
Ha1-4.120 VL	62	----->	<-CDR3>	<constant region>		
(O2/JK1)		PEDFATYYC	QQSHSIP	RTFGQGTKEIK	RTVAAPSVFIFPPSDEQ	
O2	80Y.T.	-----	-----	

Figura 4E. Alinhamento de Ha1-5.99 VH com VH4-34 humana.

```

<-----FWR1-----> <-----CR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
Hal1-5.99 VH 1 QVHLQMGAGLLKPSETLSLTCAVYGSFS --G--Y-Y--W--S WIRQPPKRGLEWIG EIN---HS-G-S--T-S-YKPS 62
(VH4-34/D4-17/JH4)
VH4-34 1 ..Q.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-N..N.. 62

--> <-----FWR3-----> <-----CDR3-----> <constant region>
Hal1-5.99 VH 63 LKS RVTVSNTTSKNQFSLKLSYVTAADTAVYYCAR DRDYGDFLEFDY WGQGTLLTVSS ASTKGPSVKGCPSPVF
(VH4-34/D4-17/JH4)
VH4-34 63 ... ..I.....S.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-.....-..... 62

```

Figura 4F. Alinhamento de Ha1-5.99 VL com A27 humana.

Hal-5.99 VL 1	<-----FWR1----->	<---CDR1--->	<-----FWR2----->	<-CDR2>	<-----FWR
(A27/JK1)	-----SPGERATLSC	RAQSIS	-----GSTYLA	WYQKPGQAPPELLIY	GIPERFSGSGGTDFTLT
A27	1	EIVLTQSPGTLSLV.....S.S...D.....
					75
Hal-5.99 VL 63	3----->	<-CDR3->		<constant region>	
(A27/JK1)	ISGLEPDEFAVPYC	QQCGSSPP	TFQGGTRKVEIK	RTVAAPSVFIFPPPSDEQ	
A27	76	..R.....V..	..Y-----		

Figura 4G. Alinhamento de Ha1-4.121 VH com VH4-34 humana.

```

Ha1-4.121 VH 14 QVQLQWAGLLKPSSETLSLTCAVYGGSPS <---FWR1-----> <---CDR1-----> <---FWR2-----> <---CDR2----->
(VH4-34/D1-26/JH4) 72 WIRQPPKQGLEWIG EI---N---HS-G-S--T-N-Y
VH4-34 1 .....Y----- 59
<---FWR3-----> <---CDR3--> <constant region>
Ha1-4.121 VH 73 N-PSLKS RVTISVDTSKQFSLKLSVTRADTAIVYCAR GGSNYFDY WQGGTLVTVSS ASTKGPSVKGPSVF
(VH4-34/D1-26/JH4)
VH4-34 60 -----

```

Figura 4H. Alinhamento de Ha1-4.121 c.5 VL com O8 humana.

```

Ha1-4.121c5 VL 23 DIQMTQSPFSSLSASVGDRVTTC QASQDISN-YLN WYQSPGKAPKFLIS <---FWR1-----> <---CDR1--> <---FWR2--> <---CDR2> <---FWR3----->
(O8/JK3) 101 GVPSRFSGSGSGTDFTSPITSSIQ
O8 1 .....K.....L..Y .....E. ....T..... 79
<---FWR4-----> <---CDR4--> <constant region>
Ha1-4.121c5 VL 102 PEDIATVCC QQYDSL PTFGPCTKVDIK RTVAAPSVFIPPPSDEQ
(O8/JK3)
O8 80 .....Y. ....N.. -----

```

Figura 4I. Alinhamento de Ha1-4.121 c.26 VL com A3 humana.

```

Ha1-4.121c26 VL 21 DIVMTQSPFLSEPTTPGEPASISC RSSQSLHS-N-GYNIV WYLQKPGQSPQLLIY <---FWR1-----> <---CDR1-----> <---FWR2--> <---CDR2> <---FWR3----->
(A3/JK6) 98 LGSIRAS GVPSRFSGSGSGTDFTL
A3 1 .....D .....N... 78
<---FWR4-----> <---CDR4--> <constant region>
Ha1-4.121c26 VL 99 KISRVEAEDEVYVC MQPIQTP ITPGQQTLEIK RTVAAPSVFIPPPSDEQ
(A3/JK6)

```

```

A1 79 .....A.....
                                     <-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
Ha1-1.16 VH 1 QVQLQQSGPGLVKPSQTLSTLCAISGDSVS SNSAAN-N WIRQSPSRGLEWL-----G R-TYRSKWY-NG-----YAVS 66
(VH6-1/D3-10/JH6)
VH6-1 1 .....-.....-.....D----- 66

--> <-----FWR3-----> <-----CDR3----->
Ha1-1.16 VH 67 VKS RMTINPDTSEKNQPSLQLNSVTPEDTAVYYCAR ERLGELYGMDV WGQGTIVT 120
(VH6-1/D3-10/JH6)
VH6-1 67 ... .I.....-.....-..... 101

```

Figura 4J. Alinhamento de Ha1-1.16 VH com VH6-1 humana.

```

-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2-----> <-----FWR3----->
Ha1-1.16 VL 1 QLTQSPDLSAVSLGERATINC KSSQNILYRSSKKNHLV WYQQKPGQPPKLLIY WASTRES GVPARFSGSGSGTDFTLTIS 80
(B3/JK5)
B3 4 -M.....SV..S.NN..Y.A .....D..... 82

-----> <-----CDR3-----> <constant region>
Ha1-1.16 VL 81 TLQAEDVAVYYC QQYYSTPP TFGQGRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(B3/JK5)
B3 83 S.....-.....-..... 82

```

Figura 4K. Alinhamento de Ha1-1.16 VL com B3 humana.

Figura 4L. Alinhamento de Ha1-4.37 VH com VH4-31 humana.

Ha1-4.37 VH	5	<-----FWR1----->	<-CDR1->	<-----FWR2----->	<-----CDR2----->	<--
(VH4-31/D3-10/JH6)		---LQESOPGLVRPSOTLSLTCIVSGGSIS	SGQTYWI	-WIRQHPGKLEWIG	YIY---YSG-S-T-Y--YNPSLKS	RVT 72
<u>VH4-31</u>	1	QVQ.....K.....S 70
Ha1-4.37 VH	73	<-----FWR3----->	<-----CDR3----->	<constant region>		
(VH4-31/D3-10/JH6)		ISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAIVYCAR	DGITHVRGISQGMNV	WGQTTVTWSS	ASTKGPSVKGPSVF	
<u>VH4-31</u>	71	

Figura 4M. Alinhamento de Ha1-4.37 VL com O2 humana.

Ha1-4.37 VL	1	<-----FWR1----->	<-----CDR1----->	<-----FWR2----->	<-CDR2>	<-----FWR3----->
(O2/JK1)		-----ASVGRVTITC	RASQSISS-HLN	WYQKPGKAPKILIIY	AASSIQS	GVPSRPSGSGSGTDFTLSSISLQ 67
<u>O2</u>	1	DIQMTQSPSSLS.....Y.....T..... 79
Ha1-4.37 VL	68	<----->	<-CDR3-->	<constant region>		
(O2/JK1)		PEDFATVPC	QQ--SVSIP	RTFGQGTKEIT	RTVAAPSVFIFPPPSDEQ	
<u>O2</u>	80Y.....T.....	

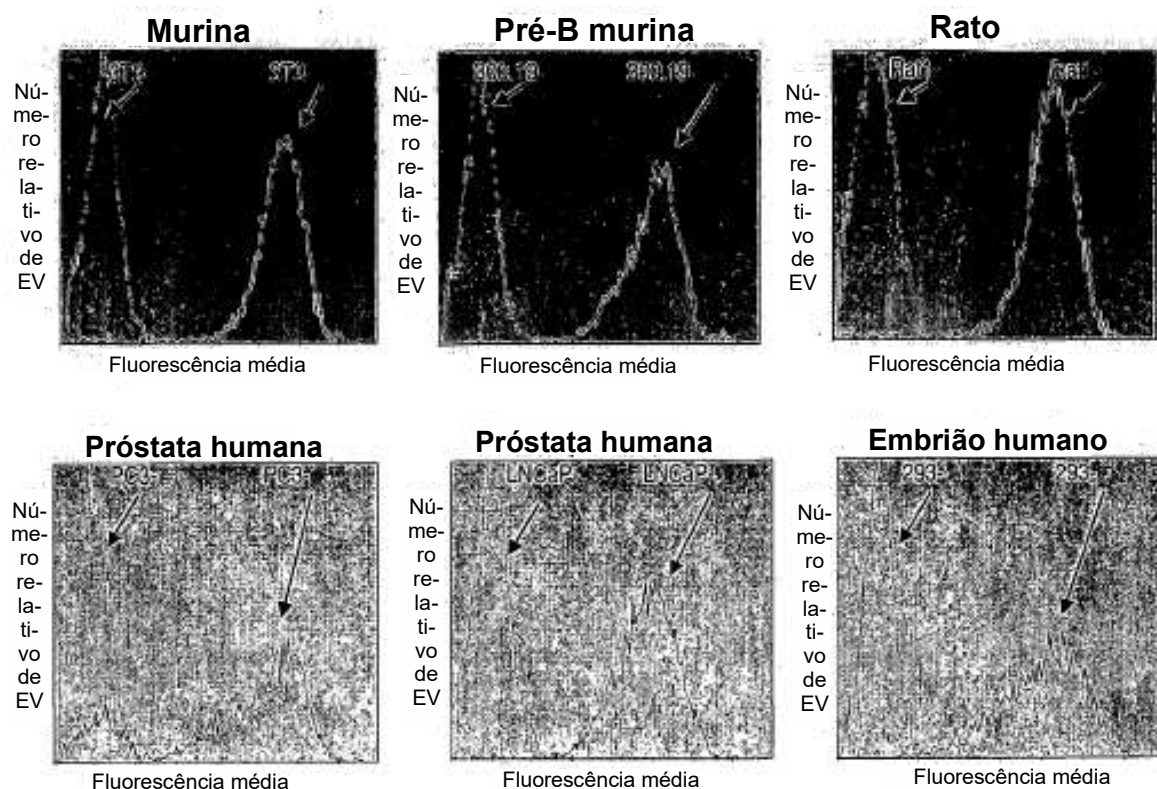


Figura 5
Expressão de PSCA em linhagens de células recombinantes murinas, de rato e humanos.

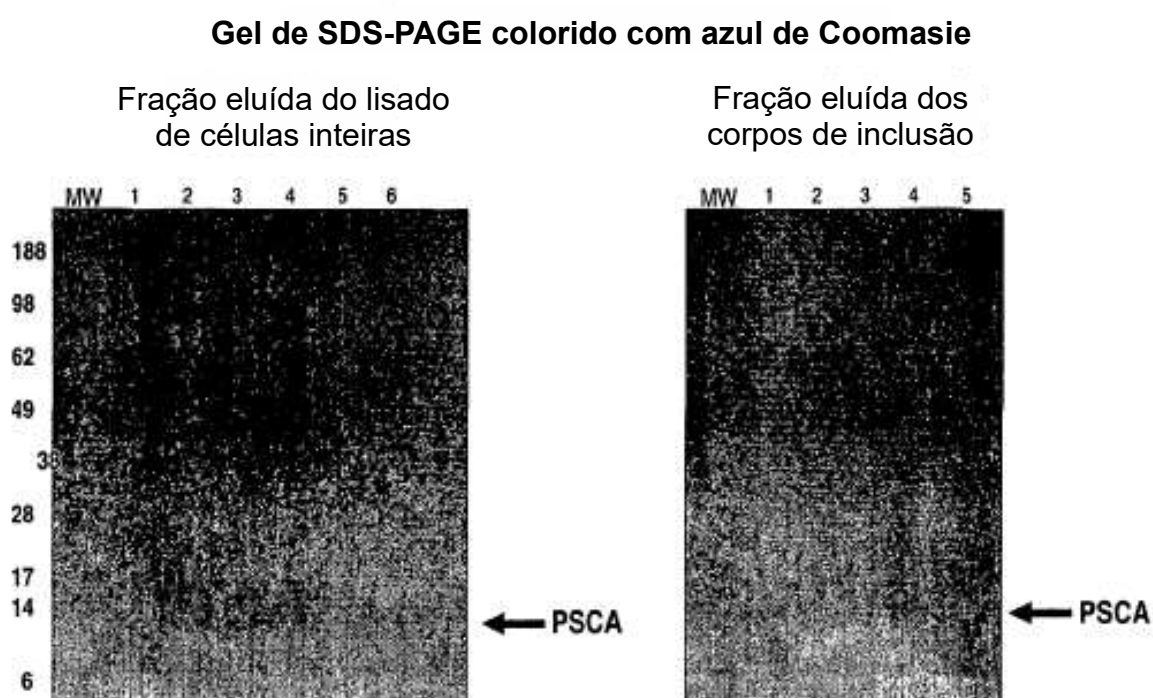


Figura 6
**Purificação de PSCA a partir de E. Coli
(vetor pET-21b codificando os aminoácidos 21-94).**

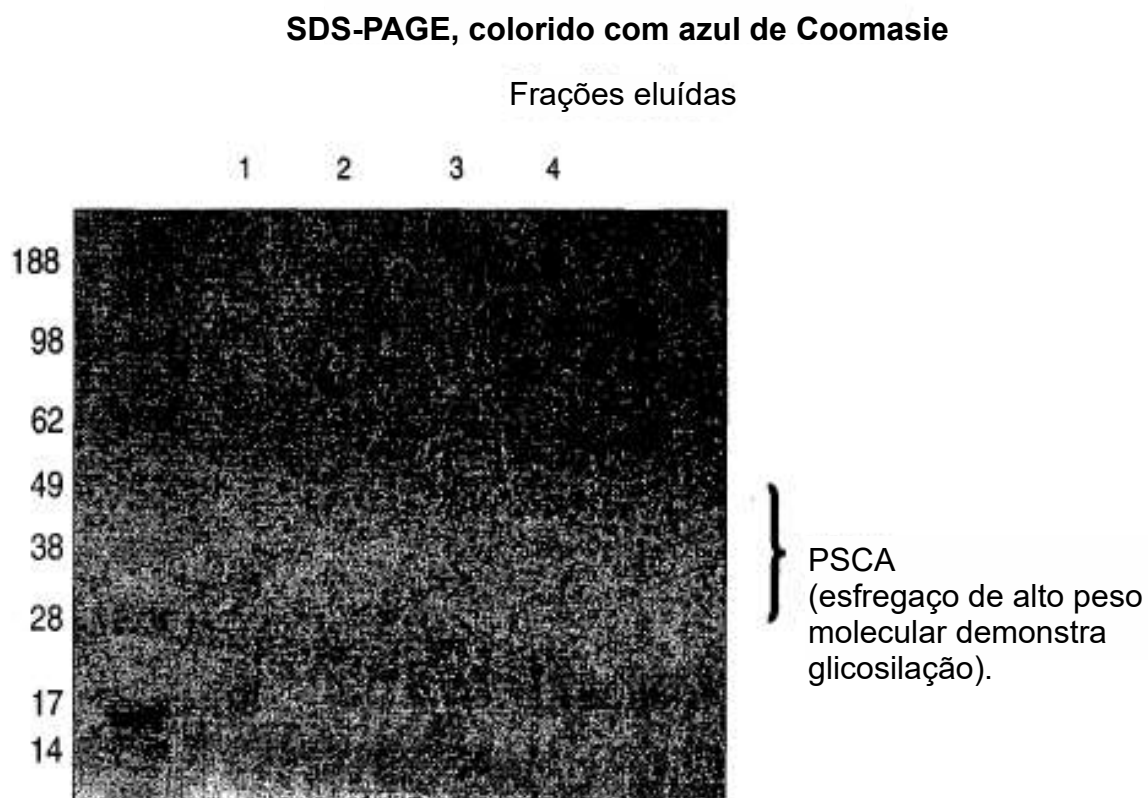


Figura 7

Purificação de PSCA glicosilada recombinante expressa a partir de células 293T.

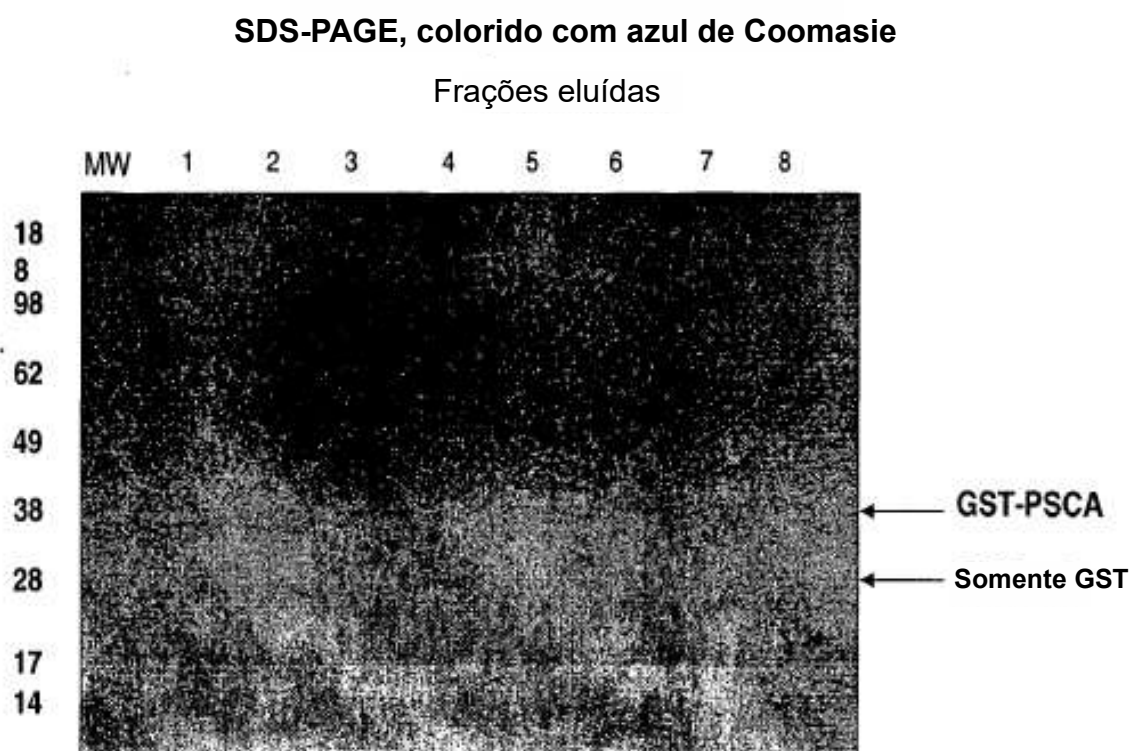


Figura 8
Purificação de GST-PSCA a partir de E. Coli
(aminoácidos 18-98)

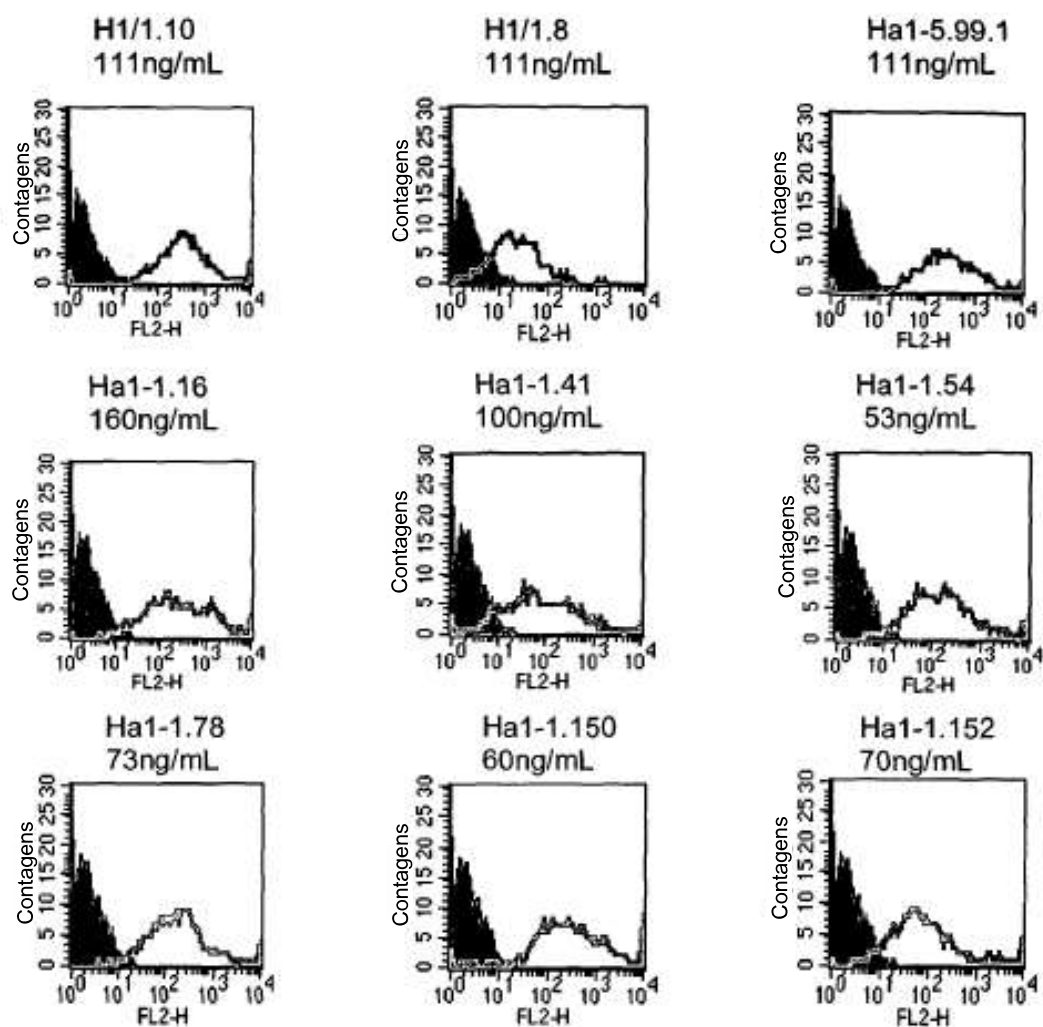


Figura 9A
Análise por FACS de anticorpos para PSCA
(LAPC9AI)

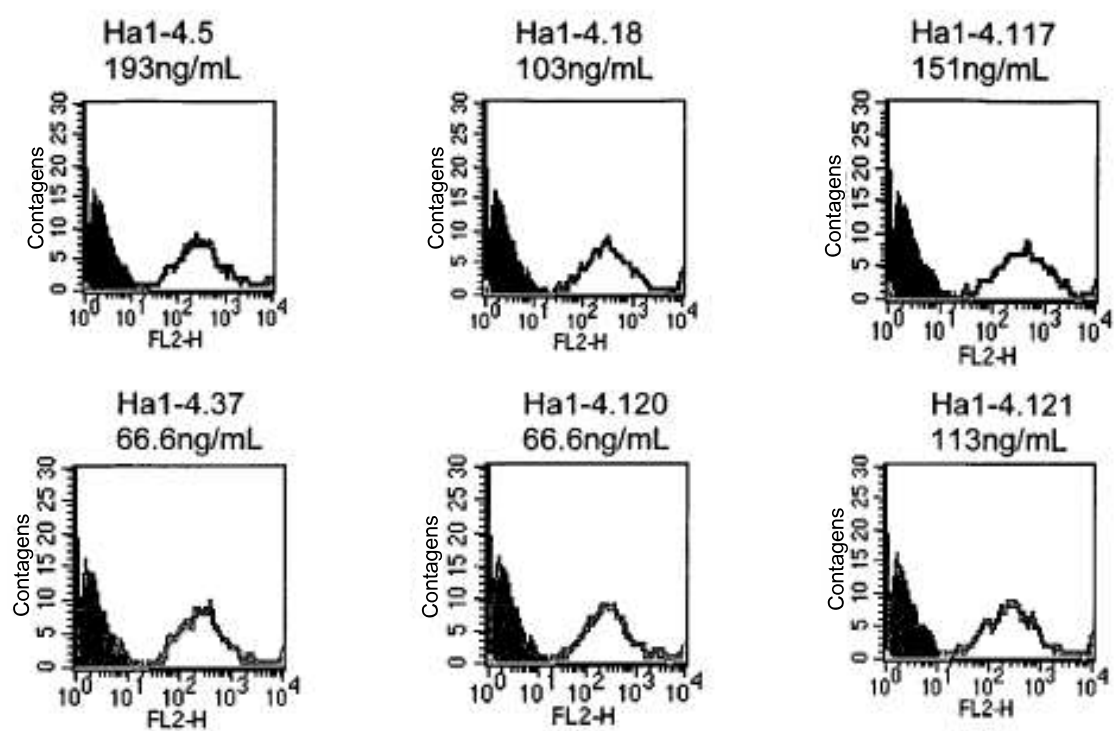


Figura 9B

**Análise por FACS de anticorpos para PSCA
(LAPC9AI)**

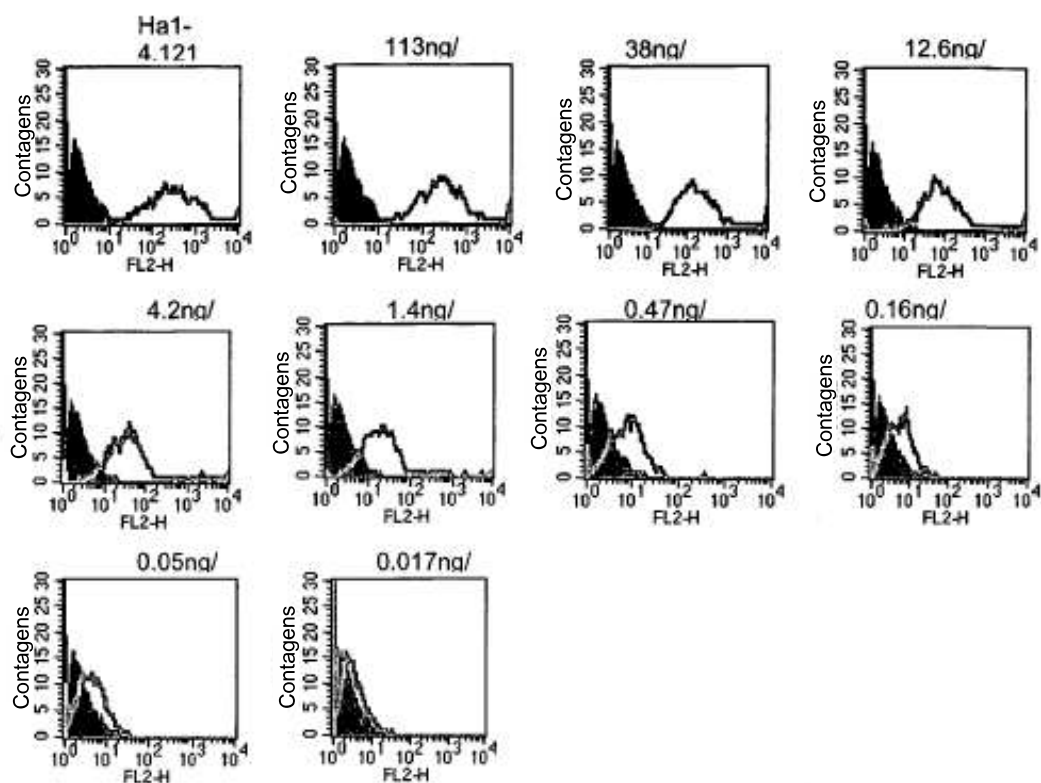


Figura 10
Análise da afinidade de PSCA mAb 4.121 por FACS

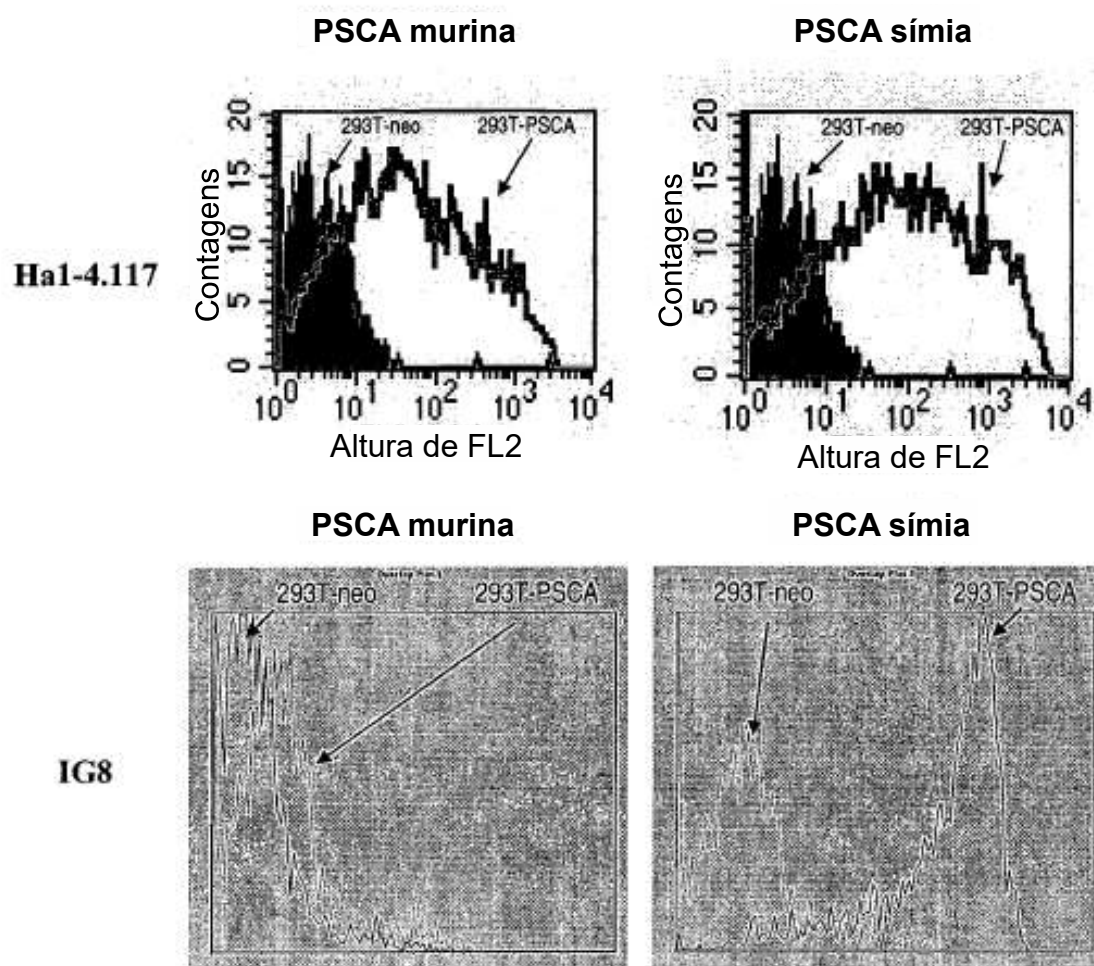


Figura 11

**Expressão de PSCA murina e símia em células 293T:
reconhecimento por mAbs anti-PSCA humana**

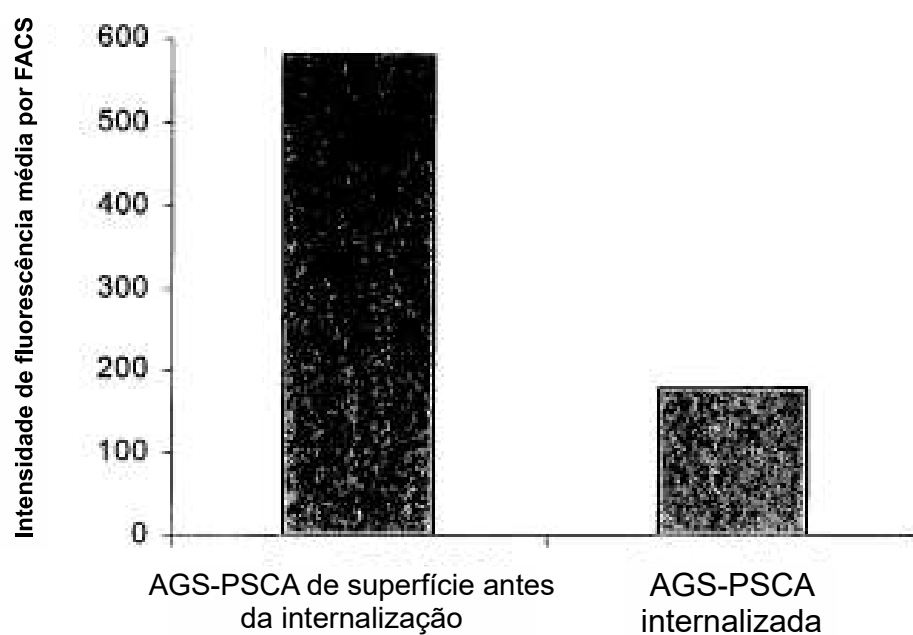


Figura 12

**Internalização de PSCA 4.121 em células PC3-PSCA
depois de 2 horas de incubação a 37°C**

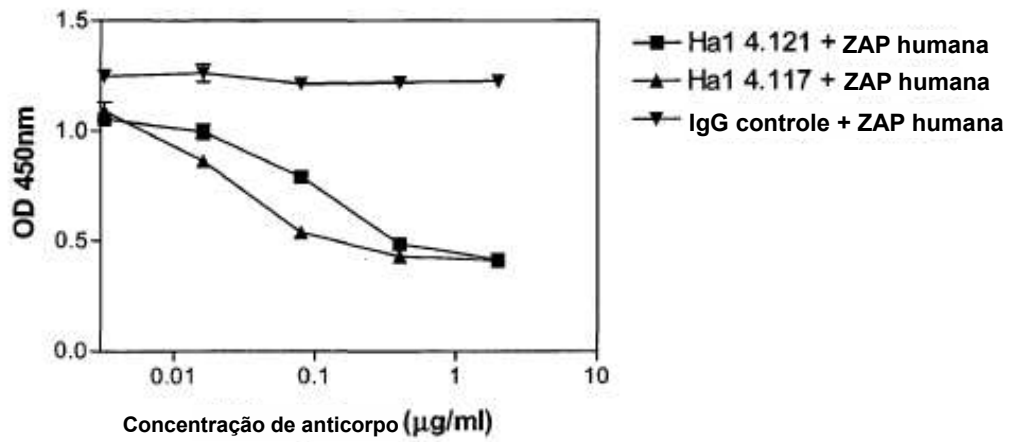


Figura 13A

Anticorpos para destruição saporina-dependente mediada por PSCA em células expressando PSCA

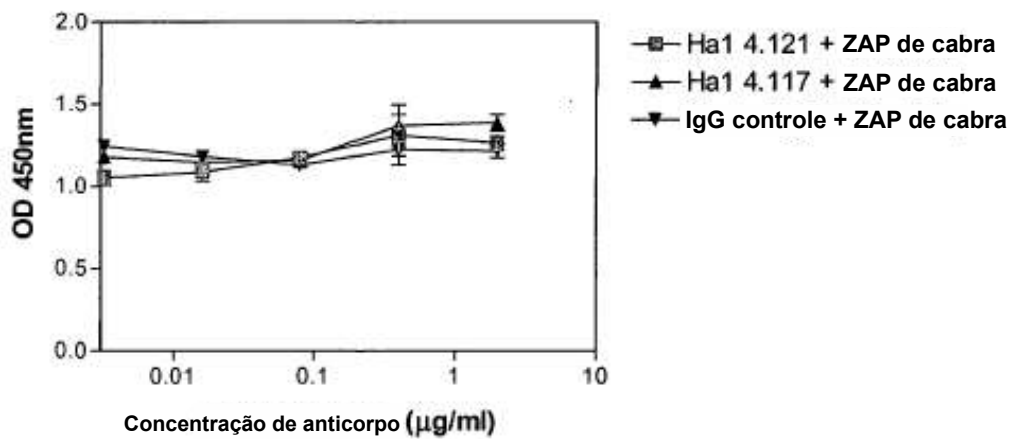


Figura 13B

Anticorpos para destruição saporina-dependente mediada por PSCA em células expressando PSCA

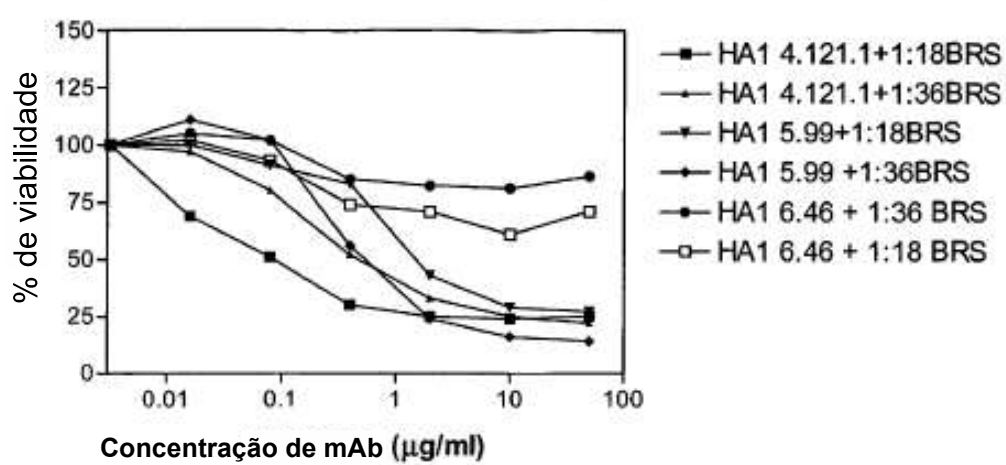
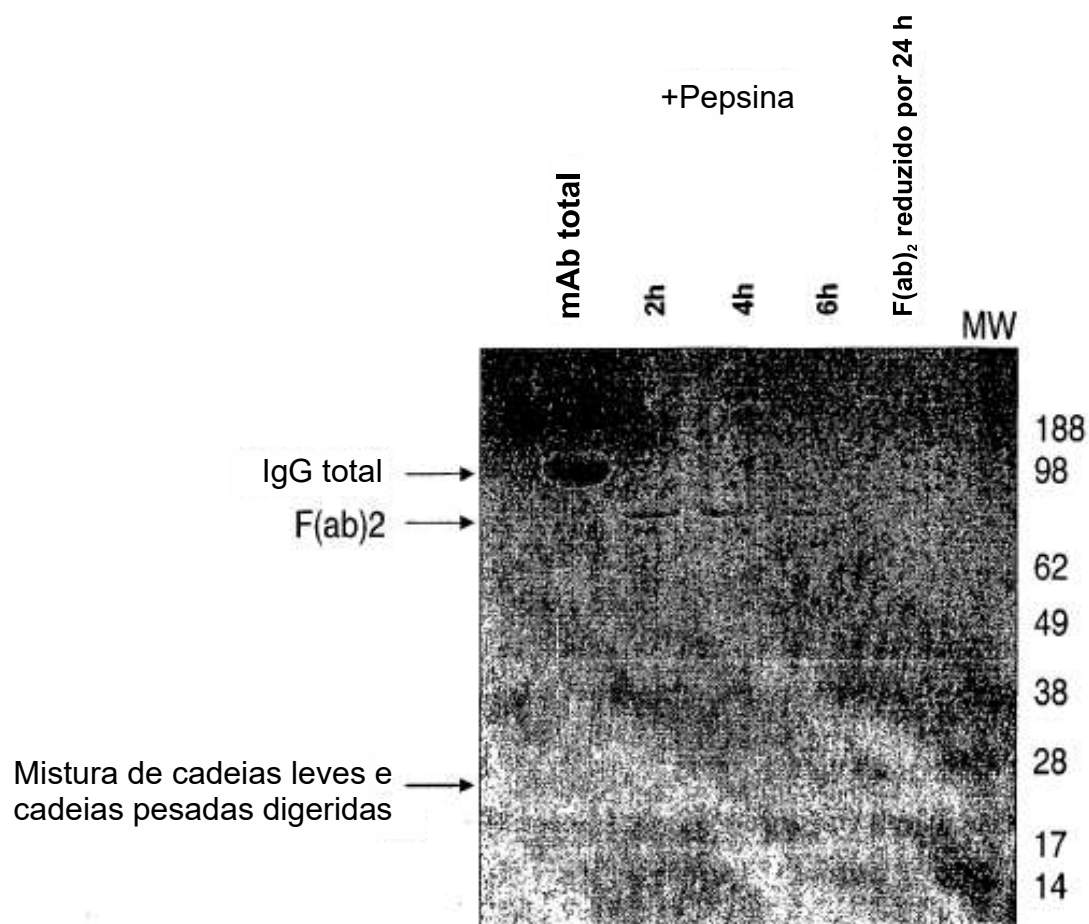


Figura 14

Citotoxicidade mediada pelo complemento de filhote de coelho em B300.19/PSCA (100.00 células/poço)

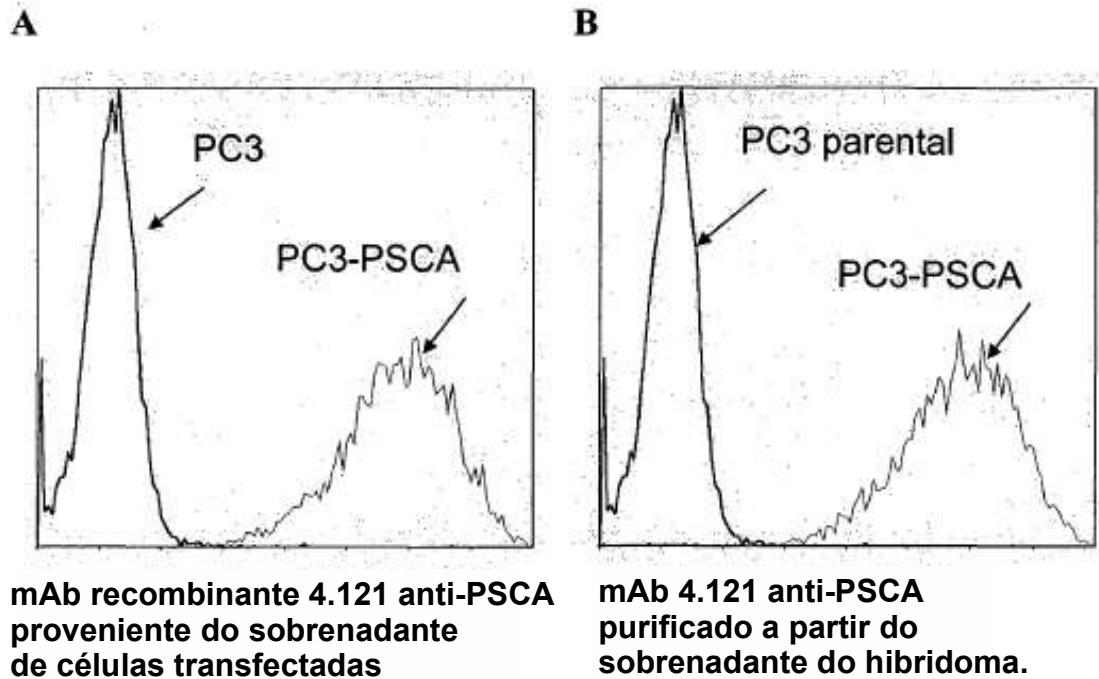


Geração de fragmentos $F(ab')_2$ de mAb Ha1-4.121 por digestão com pepsina.

20 mg de MAb Ha1-4.121 em tampão acetato de sódio 20 mM pH 4,5 foram incubados com e sem pepsina imobilizada (Pierce. Rockford IL) pelos períodos de tempo indicados. mAb intacto e fragmentos Fc digeridos foram removidos por cromatografia da proteína A. Um SDS-PAGE em gel colorido com azul de Coomassie de MAb intacto, não digerido e não reduzido, alíquotas não reduzidas de material digerido coletado nos instantes indicados, e uma amostra reduzida do produto $F(ab')_2$ digerido final estão mostrados.

Figura 15

Geração de fragmentos $F(ab')_2$ de mAb Ha1-4.121 por digestão com pepsina.



(A) células 293T foram transfectadas com construtos de expressão codificando a cadeia pesada e a cadeia leve de mAb humano anti-PSCA. O sobrenadante foi recolhido depois de 48 horas e analisado quanto à ligação à PSCA.

(B) mAb humano anti-PSCA foi purificado a partir do sobrenadante do hibridoma e usado para ensaios de ligação à PSCA. A ligação à PSCA foi testada da seguinte maneira. Células PC3 parentais ou células PC3-PSCA foram incubadas com os mAbs humanos anti-PSCA descritos acima por 30 minutos em gelo. As células foram lavadas e incubadas com Ig anti-humana conjugada a PE por 30 minutos em gelo. As células foram lavadas e em seguida analisadas por citometria de fluxo.

Figura 16
**Ligação de mAb humano recombinante anti-PSCA à PSCA
por citometria de fluxo**

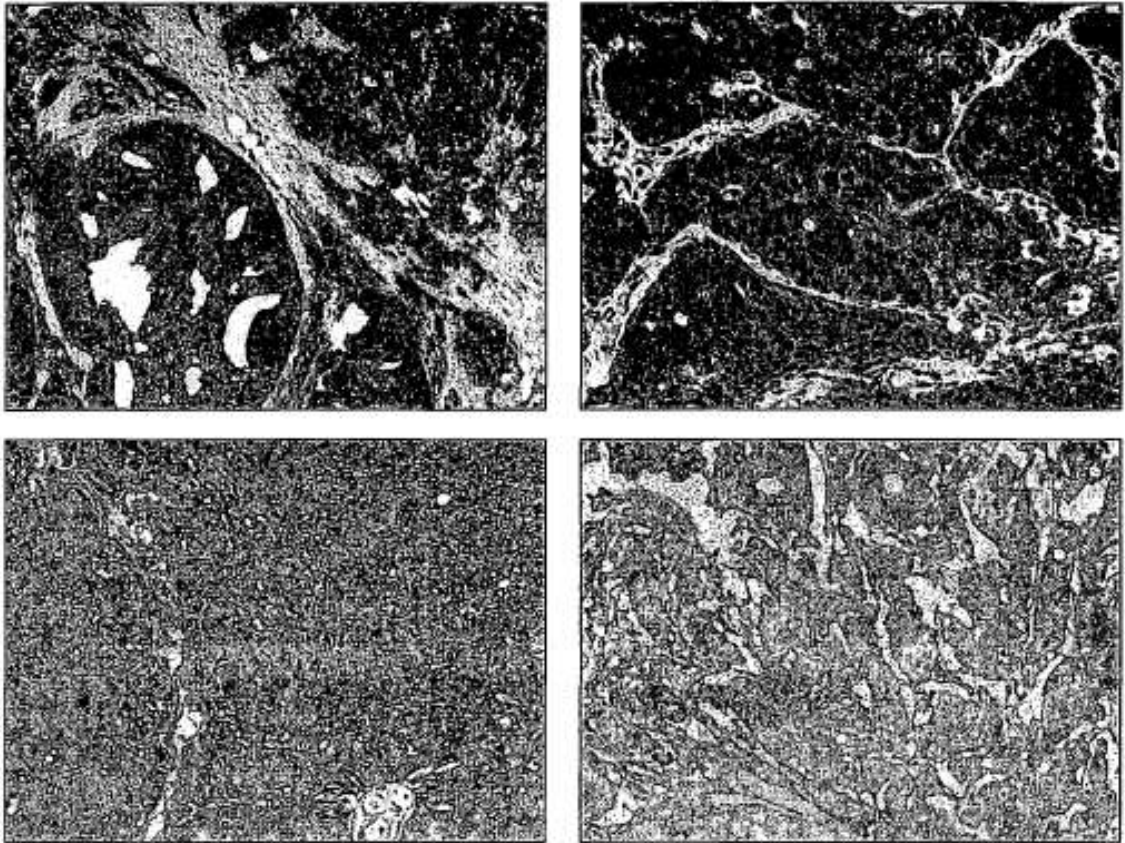
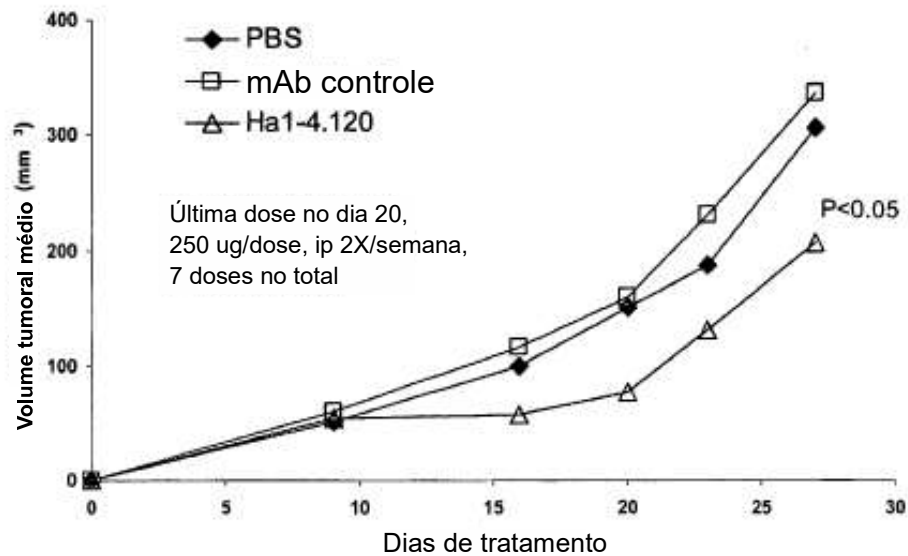


Figura 17

Detecção da proteína PSCA por imuno-histoquímica em vários espécimes de pacientes com câncer

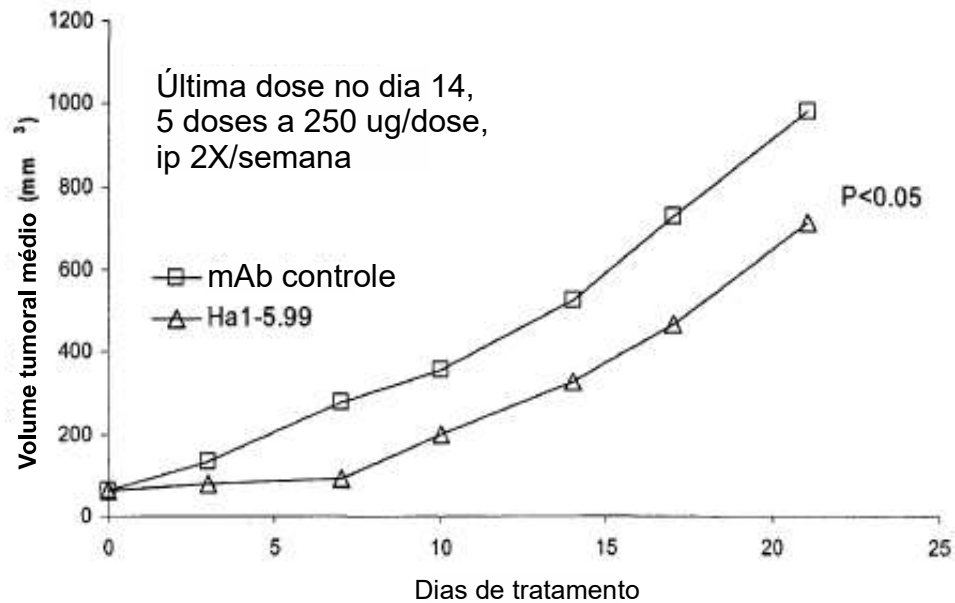


Materiais e Métodos: Células tumorais LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID machos. Os camundongos foram randomizados em grupos ($n = 10$ em cada grupo) e o tratamento foi iniciado por via intraperitoneal (i.p.) no Dia 0 com HA1-4.120 ou com isótipo de MAb controle, conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana com um total de 7 doses até o dia 28 do estudo. O crescimento tumoral foi monitorado por meio de medições com compasso a cada 3 a 4 dias, conforme indicado.

Conclusões: O anticorpo monoclonal humano Ha1-4.120 anti-PSCA inibiu significativamente o crescimento dos xenoinxertos de câncer de próstata humano implantados subcutaneamente em camundongos SCID ($p < 0,05$)

Figura 18

PSCA mAb Ha1-4.120 inibe o crescimento de xenoinxertos subcutâneos de câncer de próstata

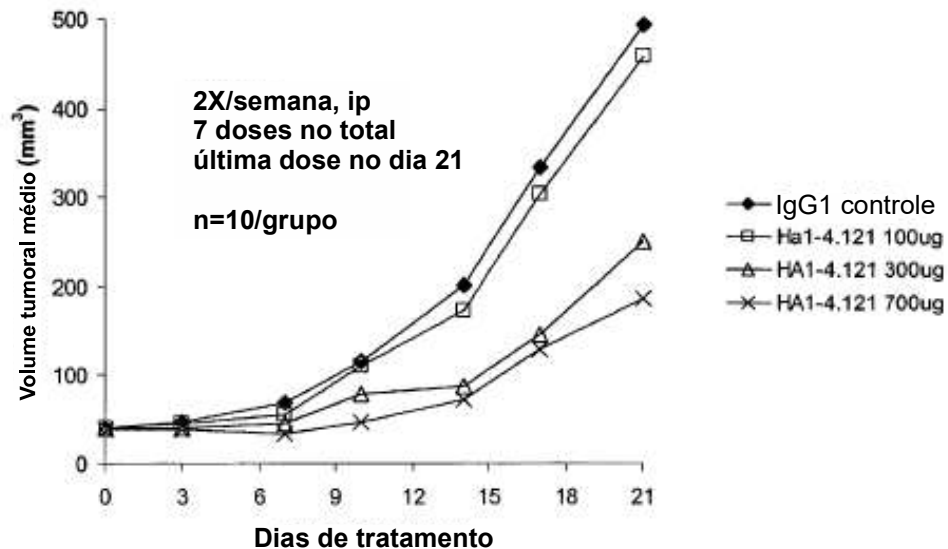


Materiais e Métodos: Células tumorais LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID machos. Quando o volume tumoral atingiu 50 mm³, os camundongos foram randomizados em grupos (n = 10 em cada grupo) e o tratamento foi iniciado por via intraperitoneal (i.p.) com HA1-5.99.1 ou com isótipo de MAb controle, conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana com um total de 5 doses até o dia 14 do estudo. O crescimento tumoral foi monitorado por meio de medições com compasso a cada 3 a 4 dias, conforme indicado.

Conclusões: O anticorpo monoclonal totalmente humano Ha1-5.99 anti-PSCA inibiu significativamente o crescimento dos xenoinxertos estabelecidos de câncer de próstata humano androgênio-dependente implantados subcutaneamente em camundongos SCID (p < 0,05).

Figura 19

PSCA mAb Ha1-5.99 inibe o crescimento de xenoinxertos estabelecidos de câncer de próstata em camundongos SCID

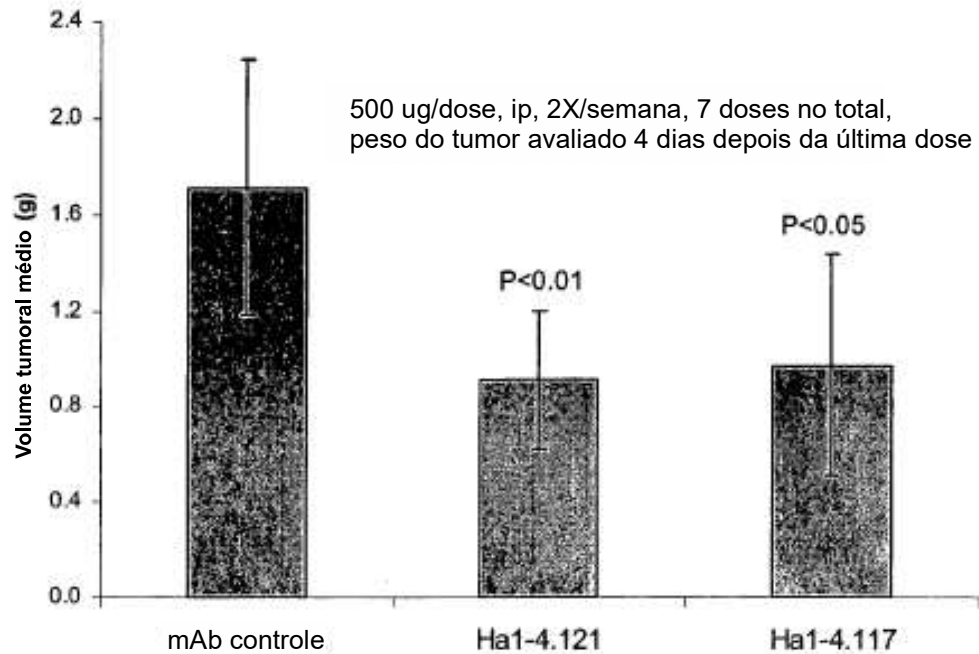


Materiais e Métodos: Células tumorais LAPC-9AD ($2,5 \times 10^6$ células) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID machos. Quando o volume tumoral atingiu 40 mm³, os camundongos foram randomizados em grupos (n = 10 em cada grupo) e o tratamento foi iniciado por via intraperitoneal (i.p.) com concentrações crescentes de HA1-4.121 ou com isótipo de MAb controle, conforme indicado. Os animais foram tratados duas vezes por semana com um total de 7 doses até o dia 21 do estudo. O crescimento tumoral foi monitorado por meio de medições com compasso a cada 3 a 4 dias, conforme indicado.

Conclusões: Os resultados deste estudo demonstraram que HA1-4.121 inibiu significativamente o crescimento dos xenoinxertos subcutâneos estabelecidos de câncer de próstata humano androgênio-dependente em camundongos SCID. Os resultados foram estatisticamente significativos para o grupo de dose de 300 ug nos dias 14, 17 e 21 ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, dois lados com $\alpha = 0,05$) e para o grupo de dose de 700 ug nos dias 10, 14, 17 e 21 ($p < 0,05$, teste de Kruskal-Wallis, dois lados com $\alpha = 0,05$).

Figura 20

PSCA mAb Ha1-4.121 inibe o crescimento de xenoinxertos estabelecidos de câncer de próstata androgênio-dependente

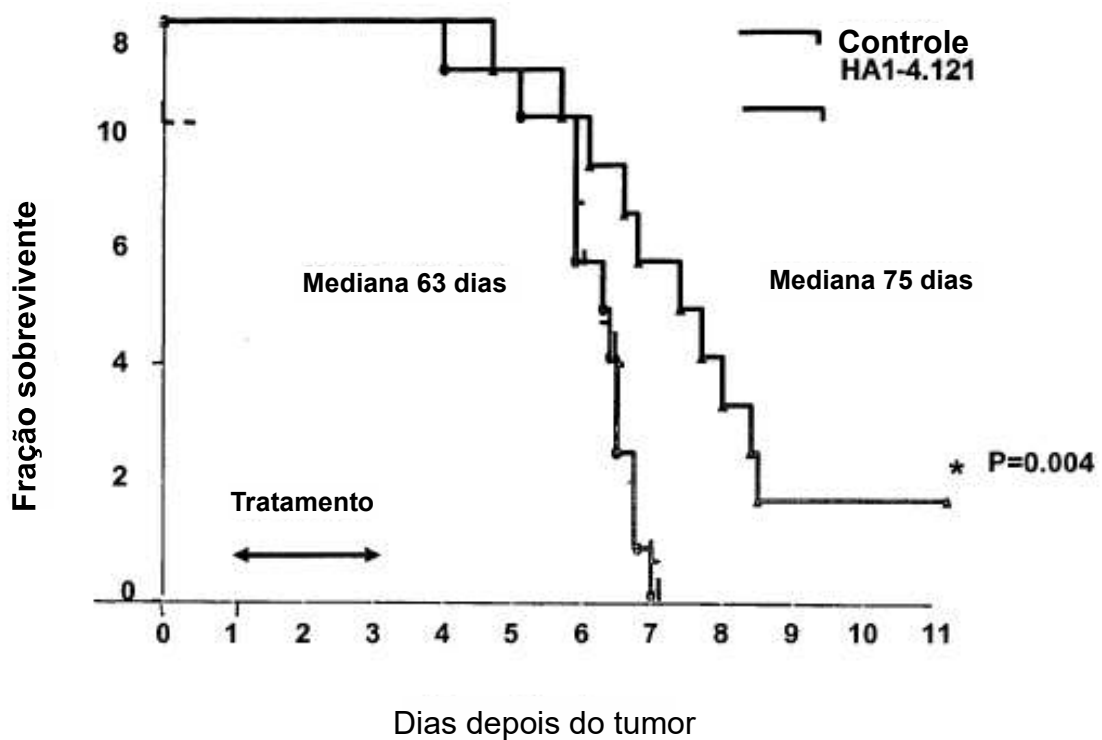


Materiais e Métodos: Células tumorais LAPC-9AC androgênio-dependentes derivadas do paciente ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas nos lobos dorsais das próstatas de camundongos SCID machos. Os tumores foram deixados crescer por aproximadamente 10 dias quando então os camundongos foram randomizados em grupos. Tratamento com 500 mg de HA1-4.117, HA1-4.121 humanos ou com isótipo de MAb controle foi iniciado 10 dias depois da implantação do tumor. Os anticorpos foram distribuídos por via intraperitoneal duas vezes por semana em um total de 7 doses. Quatro dias depois da última dose, os animais foram sacrificados e os tumores primários foram excisados e pesados.

Conclusões: Os anticorpos monoclonais humanos Ha1-4.121 ($p < 0,01$) e Ha1-4.117 ($p < 0,5$) anti-PSCA inibiram significativamente o crescimento dos xenoinxertos de câncer de próstata humano LAPC-9AD implantados ortotopicamente em camundongos SCID.

Figura 21

PSCA mAbs Ha1-4.121 e Ha1-4.117 inibem o crescimento de xenoinxertos ortotópicos estabelecidos de câncer de próstata humano

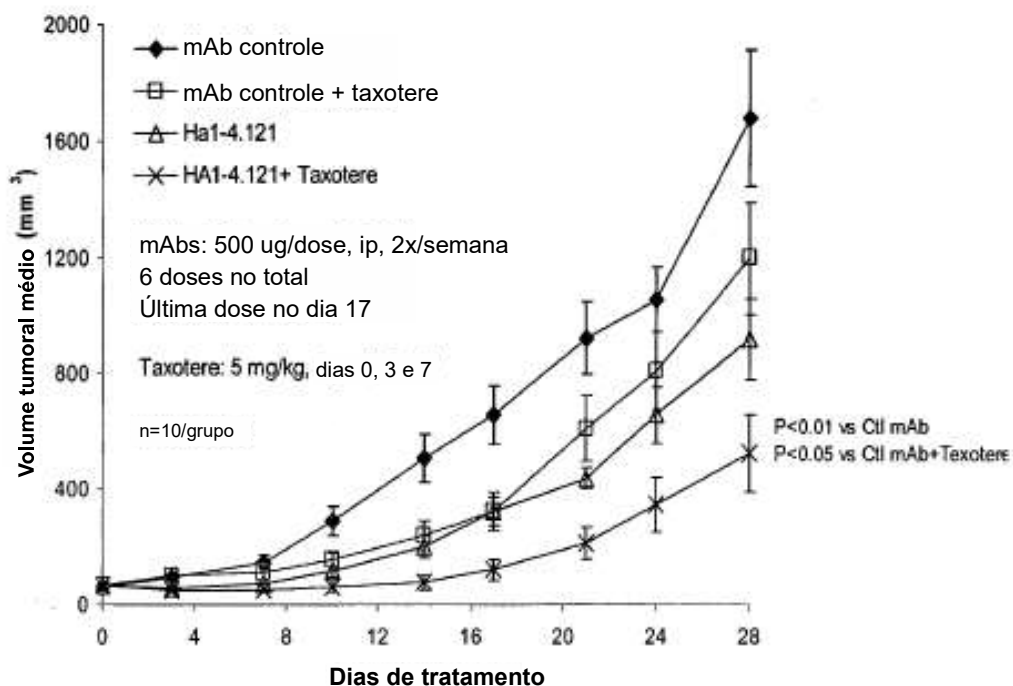


Materiais e Métodos: Células tumorais LAPC-9AD androgênio-dependentes derivadas do paciente ($2,0 \times 10^6$ células) foram injetadas nos lobos dorsais das próstatas de camundongos SCID machos. Os tumores foram deixados crescer por aproximadamente 9 dias quando então os camundongos foram randomizados em grupos. Os animais randomizados nos grupos de sobrevivência incluem 11 camundongos no grupo tratado com isótipo de MAb controle e 12 camundongos no grupo tratado com HA1-4.121. Os animais foram tratados i.p. com 1000 ug de Ha1-4.121 ou 1000 ug de isótipo de MAb controle duas vezes por semana com um total de 9 doses.

Conclusões: Os resultados demonstraram que HA1-4.121 prolongou significativamente (teste log-rank: $p < 0,01$) a sobrevida dos camundongos SCID cm tumores de próstata androgênio-dependentes humanos. Dois camundongos no grupo tratamento com HA1-4.121 continuavam livres de tumores palpáveis no dia 110, o último dia do experimento.

Figura 22

HA1-4.121 prolonga a sobrevida de camundongos SCID com tumores de próstata humanos androgênio-dependentes ortotópicos estabelecidos

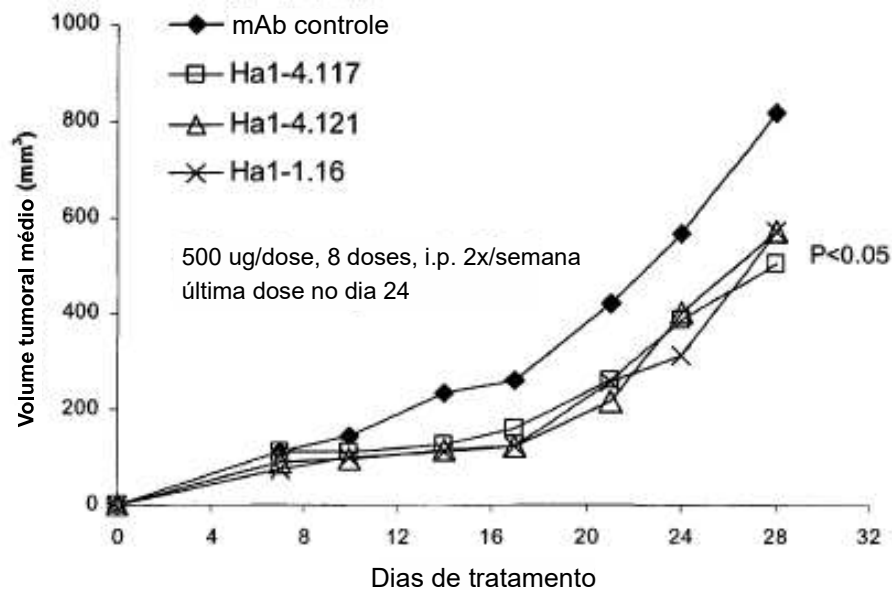


Materiais e Métodos: Células tumorais LAPC-9AI ($2,0 \times 10^6$ células por animal) foram injetadas por via subcutânea em camundongos SCID machos. Quando o volume tumoral atingiu 65 mm³, os animais foram randomizados em grupos e designados para quatro grupos diferentes (n = 10 em cada grupo), conforme indicado. Com início no dia 0, HA1-4.121 ou isótipo de mAb controle foram administrados i.p. duas vezes por semana a uma dose de 500 ug por um total de 6 doses. A última dose foi dada no dia 17. Taxotere foi dado por via intravenosa a uma dose de 5 mg/kg nos dias 0, 3 e 7. O crescimento tumoral foi monitorado em intervalos de 3-4 dias por meio de medições com compasso.

Conclusões: Os resultados deste estudo demonstram que HA1-4.121 como agente único inibiu o crescimento de xenoinxertos de próstata androgênio-dependentes em camundongos SCID em 45% em relação ao tratamento com apenas o anticorpo controle no dia 28 (ANOVA/teste de Tukey: p < 0,05). A administração do isótipo de mAb controle mais taxotere inibiu o crescimento tumoral em 28% quando comparado ao tratamento com apenas o anticorpo controle, o que não foi estatisticamente significativo. A administração de HA1-4.121 em combinação com taxotere aumentou o efeito e resultou em uma inibição de 69% do crescimento tumoral quando comparado ao anticorpo controle isoladamente (ANOVA/teste de Tukey: p < 0,01). Uma diferença estatisticamente significativa também foi demonstrada quando o grupo tratado com a combinação HA1-4.121 mais taxotere foi comparado com o grupo tratado com HA1-4.121 ou com isótipo de mAb controle (ANOVA/teste de Tukey: p < 0,05).

Figura 23

Inibição aumentada do crescimento de tumor de próstata com a terapia combinada HA1-4.21 e Taxotere®

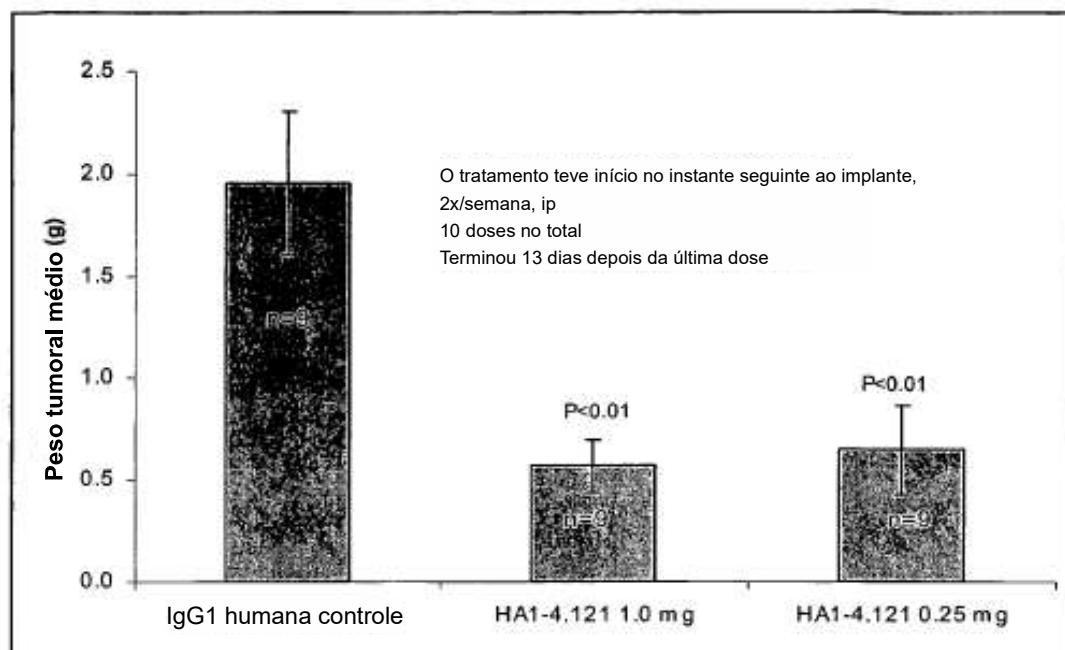


Materiais e Métodos: Células HPAC de câncer de pâncreas humano ($2,0 \times 10^6$ /camundongo) foram injetadas por via subcutânea em camundongos ICR SCID imunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Os camundongos foram randomizados em grupos ($n = 10$ animais/grupo) e o tratamento com o anticorpo monoclonal humano para PSCA foi iniciado no mesmo dia. Os anticorpos (500 mg/camundongo) foram distribuídos por via intraperitoneal duas vezes por semana em um total de 8 doses.

Conclusões: Os resultados demonstraram que os anticorpos monoclonais Ha1-4.121, Ha1-4.117 e Ha1-1.16 anti-PSCA inibiram significativamente o crescimento de xenoinxertos de câncer de pâncreas humano implantados subcutaneamente em camundongos SCID. As análises estatísticas foram feitas usando um teste t (de dois lados, $\alpha = 0,05$).

Figura 24

PSCA MAbs humanos inibem o crescimento de xenoinxertos de câncer de pâncreas em camundongos SCID



Materiais e Métodos: Células HPAC ($3,0 \times 10^6$ células) foram implantadas ortotopicamente no pâncreas de camundongos SCID. Os camundongos foram aleatoriamente designados para três grupos ($n = 9$ em cada grupo), conforme indicado. O tratamento com HA1-4.121 (250 ug ou 1000 ug) ou com isótipo de mAb controle (1000 ug) foi iniciado no dia da implantação. Os anticorpos foram administrados i.p. duas vezes por semana em um total de 10 doses. Treze dias depois da última dose, os animais foram sacrificados e os tumores primários foram excisados e pesados.

Conclusões: Os resultados deste estudo demonstraram que HA1-4.121 inibiu significativamente o crescimento ortotópico de xenoinxertos de câncer de pâncreas humano em camundongos SCID nos dois níveis de dose examinados. O tratamento com 250 ug e 1000 ug de AGS-PSCA inibiu o crescimento tumoral em 66% e 70%, respectivamente (teste de Kruskal-Wallis/Tukey: $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente).

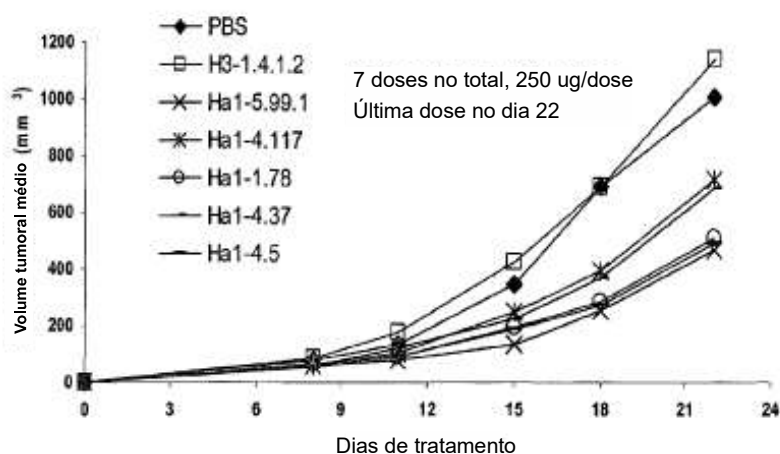
Figura 25

HA1-4.121 inibe o crescimento de tumores de pâncreas implantados ortotopicamente em camundongos SCID

Resumo de metástases

Grupo	Incidência de metástase por exame microscópico				Incidência de metástase e invasões por exame grosseiro	
	Pulmão	Valor p	LN	Valor p	Todos os sítios	Valor p
H3-1.4.1.2	5/8	-	7/9	-	8/9	-
HA1-4.121 1.0 mg	1/9	0.0498	1/9	0.0152	2/9	0.0152
HA1-4.121 0.25 mg	2/9	0.1534	1/9	0.0152	2/9	0.0152
LN = nódulo linfático						
Tratado vs. Controle pelo teste exato de Fisher						
Os sítios de invasão incluem a parede abdominal, o cólon, o baço, o rim, a glândula adrenal, o retroperitônio etc						
Os sítios de metástase incluem os nódulos linfáticos						

Figura 26
PSCA mAb HA1-4.121 inibe metástases



Materiais e Métodos: Células SW780 de câncer de bexiga humano (2×10^6 /camundongo) foram injetadas por via subcutânea em camundongos ICR SCID imunodeficientes (Taconic Farm, Germantown, NY). Os camundongos foram randomizados em grupos ($n = 10$ animais/grupo) e o tratamento com o mAb humano para PSCA foi iniciado no mesmo dia. Os anticorpos (250 μ g/camundongo) foram distribuídos por via intraperitoneal duas vezes por semana em um total de 7 doses.

Conclusões: Os resultados demonstraram que HA1-4.117 ($p = 0,014$), HA1-4.37 ($p = 0,0056$), HA1-1.78 ($p = 0,001$), Ha1-5.99 ($p = 0,0002$) e HA1-4.5 ($p = 0,0008$) inibiram significativamente o crescimento de tumores de bexiga SW780 implantados subcutaneamente em camundongos SCID. As análises estatísticas foram feitas usando um teste t (de dois lados, $\alpha = 0,05$).

Figura 27
PSCA mAbs humanos inibem o crescimento de tumores de bexiga SW780 em camundongos SCID