



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 33 627 T2** 2009.07.30

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 250 434 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 33 627.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US01/02651**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 910 358.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2001/055391**

(86) PCT-Anmeldetag: **26.01.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.08.2001**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **23.10.2002**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **16.04.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.07.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/12 (2006.01)**

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A01K 67/027 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

178560 P 26.01.2000 US

(73) Patentinhaber:

Agensys, Inc., Santa Monica, Calif., US

(74) Vertreter:

LICHTI Patentanwälte, 76227 Karlsruhe

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE, TR**

(72) Erfinder:

JAKOBOVITS, Aya, Beverly Hills, CA 90210, US;

AFAR, Daniel E., Brisbane, CA 94005, US;

CHALLITA-EID, Pia M., Encino, CA 91436, US;

LEVIN, Elana, Los Angeles, CA 99034, US;

MITCHELL, Steve Chappell, Santa Monica, CA

90405, US; HUBERT, Rene S., Los Angeles, CA

90026, US

(54) Bezeichnung: **84P2A9: PROSTATA- UND TESTIS-SPEZIFISCHES PROTEIN DAS HOHE EXPRESSION IN PROSTATAKREBS AUFWEIST**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Anmeldung beansprucht die Priorität der US-amerikanischen provisorischen Patentanmeldung 60/178,560, die am 26. Januar 2000 eingereicht wurde.

GEBIET DER ERFINDUNG

[0002] Die vorliegend beschriebene Erfindung betrifft ein neuartiges Gen und das von ihm kodierte Protein, welches als 84P2A9 bezeichnet wird. Ferner sind diagnostische und therapeutische Verfahren und Zusammensetzungen beschrieben, die zur Behandlung verschiedener Karzinome geeignet sind, welche 84P2A9 exprimieren, insbesondere Prostatakarzinome.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0003] Krebs ist neben Erkrankungen der Herzkranzgefäße die zweithäufigste Todesursache beim Menschen. Weltweit sterben jedes Jahr Millionen an Menschen an Krebs. Allein in den Vereinigten Staaten von Amerika sterben jährlich weit mehr als eine halbe Million Menschen an Krebs, wobei jedes Jahr rund 1,4 Millionen neue Fälle diagnostiziert werden. Während Todesfälle infolge einer Herzkrankheit signifikant zurückgegangen sind, nehmen Todesfälle infolge von Krebs generell zu. Prognosen zufolge wird Krebs Anfang des nächsten Jahrhunderts die führende Todesursache sein.

[0004] Weltweit ragen mehrere Krebserkrankungen als Todesursache heraus. Insbesondere Karzinome der Lunge, der Prostata, der Brust, des Kolons, der Bauchspeicheldrüse und der Eierstöcke repräsentieren die führenden Ursachen von krebbedingten Sterbefällen. Diese und praktisch alle anderen Karzinome haben ein tödliches Merkmal gemein. Mit sehr wenigen Ausnahmen verläuft die Metastasierung eines Karzinoms tödlich. Die gängige Erfahrung hat gezeigt, dass sich darüber hinaus selbst bei solchen Krebspatienten, die ihre primäre Krebserkrankung zunächst überleben, das Leben drastisch ändert. Viele Krebspatienten haben Angst vor einer möglichen Rückkehr bzw. einem möglichen Rezidiv der Krankheit oder vor einem Versagen der Behandlung. Viele Krebspatienten erfahren infolge der Behandlung körperliche Behinderungen. Darüber hinaus erleiden viele Krebspatienten einen Rückfall.

[0005] Prostatakrebs ist weltweit bei Männern die vierthäufigste Krebserkrankung. In Nordamerika und Nordeuropa handelt es sich hierbei um die bei weitem häufigste Krebserkrankung bei Männern und die zweithäufigste Ursache krebbedingter Sterbefälle bei Männern. Allein in den USA sterben jährlich weit über 40.000 Männer an dieser Krankheit – übertroffen allein von Lungenkrebs. Trotz der Größenordnung dieser Zahlen gibt es noch immer keine wirksame Behandlung für metastasierten Prostatakrebs. Chirurgische Prostatektomie, Strahlentherapie, Hormonablationstherapie, chirurgische Kastration und Chemotherapie sind nach wie vor die hauptsächlichen Behandlungsmodalitäten. Leider sind diese Behandlungen bei Vielen unwirksam und häufig mit unerwünschten Folgen verbunden.

[0006] Was die Diagnostik anbelangt, bleibt das Fehlen eines Prostatatumormarkers, mit dem sich lokalisierte Tumore im Frühstadium akkurat erkennen lassen, eine signifikante Einschränkung bei der Diagnose und der Behandlung dieser Krankheit. Das prostataspezifische Antigen (PSA) im Serum war zwar ein sehr nützliches Hilfsmittel, aber seine Spezifität und allgemeine Nützlichkeit werden in mancherlei bedeutender Hinsicht gemeinhin als mangelhaft betrachtet.

[0007] Der Fortschritt bei der Identifizierung weiterer spezifischer Marker für Prostatakrebs ist durch die Generierung von Prostatakrebs-Xenografts verbessert worden, die verschiedene Stadien der Krankheit bei Mäusen wiedergeben können. Die LAPC (Los Angeles Prostate Cancer)-Xenografts sind Prostatakrebs-Xenografts, die die Passage in SCID-Mäuse (Mäuse mit schwerer kombinierter Immundefizienz) überlebt haben und den Übergang von der Androgenabhängigkeit zur Androgenunabhängigkeit imitieren können (Klein et al., 1997, Nat Med. 3: 402). In jüngerer Zeit identifizierte Prostatakrebsmarker umfassen PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), Prostataspezifisches Membranantigen (PSM-Antigen) (Pinto et al., Clin Cancer Res 1996 Sep; 2(9): 1445–51), STEAP (Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Dec 7; 96(25): 14523–8) und das Prostatastammzellenantigen (PSCA) (Reiter et al., 1998, Prot. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

[0008] Obgleich die bereits identifizierten Marker wie PSA, PSM, PCTA und PSCA die Diagnose und Behandlung von Prostatakrebs erleichtert haben, müssen weitere Marker und therapeutische Ziele für Prostatakrebs und verwandte Krebserkrankungen identifiziert werden, um die Diagnose und die Therapie weiter zu verbessern.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Die vorliegende Erfindung betrifft ein neuartiges, überwiegend mit der Prostata und den Hoden in Verbindung stehendes Gen mit der Bezeichnung 84P2A9, das in mehreren Karzinomen, einschließlich bei Prostata-, Hoden-, Nieren-, Gehirn-, Knochen-, Haut-, Eierstock-(Ovarial-), Brust-, Bauchspeicheldrüsen-(Pankreas-) und Darmkarzinomen(Kolon-), lymphozytären Karzinomen und bei Lungenkarzinomen überexprimiert ist.

[0010] Northern-Blot-Expressionsanalyse der 84P2A9-Genexpression in normalem Gewebe von Erwachsenen zeigt ein stark prostata- und hodenspezifisches Expressionsmuster. Die Analyse der 84P2A9-Expression in der normalen Prostata und in Prostata-Tumor-Xenografts zeigt eine Überexpression in LAPC4- und LAPC-9-Prostata-Tumor-Xenografts, wobei die Expression in LAPC-9 am stärksten ist.

[0011] Die Nukleotid-(SEQ ID Nr.: 1) und Aminosäure-(SEQ ID Nr.: 2)Sequenzen von 84P2A9 sind in **Fig. 2** angegeben. Teile der 84P2A9-Aminosäuresequenz zeigen gewisse Homologien zu ESTs in der dbEST-Datenbank. Das prostata- und hodenbezogene Profil von 84P2A9 in normalem Gewebe von Erwachsenen, kombiniert mit der bei Prostata-Tumor-Xenografts beobachteten Überexpression, zeigt, dass 84P2A9 zumindest in einigen Karzinomen irrtümlich überexprimiert ist und daher als geeignetes diagnostisches und/oder therapeutisches Ziel für Karzinome, wie beispielsweise Prostata-, Hoden-, Nieren-, Gehirn-, Knochen-, Haut-, Ovarial-, Brust-, Pankreas- und Kolonkarzinomen, lymphozytären Karzinomen und bei Lungenkarzinomen, dient (siehe z. B. **Fig. 4-Fig. 8**).

[0012] Die Erfindung stellt Polynukleotide bereit, die den Genen, mRNAs und/oder Kodierungssequenzen von 84P2A9 ganz oder teilweise entsprechen bzw. ganz oder teilweise dazu komplementär sind, vorzugsweise in isolierter Form, einschließlich Polynukleotide, die 84P2A9-Proteine und Fragmente aus 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 oder mehr Aminosäuren kodieren, DNA, RNA, DNA/RNA-Hybride und verwandte Moleküle, Polynukleotide oder Oligonukleotide, die zu den 84P2A9-Genen oder -mRNA-Sequenzen oder Teilen davon komplementär sind oder eine Homologie von mindestens 90% dazu aufweisen, und Polynukleotide oder Oligonukleotide, die mit den 84P2A9-Genen, -mRNAs oder mit 84P2A9 kodierenden Polynukleotiden hybridisieren. Es werden außerdem Mittel zum Isolieren von cDNAs und der 84P2A9 kodierenden Gene bereitgestellt. Ferner werden rekombinante DNA-Moleküle, die 84P2A9-Polynukleotide enthalten, Zellen, die mit solchen Molekülen transformiert oder transduziert sind, und Wirt-Vektor-Systeme für die Expression von 84P2A9-Genprodukten bereit gestellt. Die Erfindung stellt ferner Antikörper bereit, die an 84P2A9-Proteine und – Polypeptidfragmente davon binden, einschließlich polyklonale und monoklonale Antikörper, Antikörper von Mäusen und anderen Säugern, chimäre Antikörper, humanisierte und vollständig humane Antikörper und mit einem detektierbaren Marker markierte Antikörper. Es werden auch Verfahren für das Nachweisen des Vorhandenseins und Zustandes von 84P2A9-Polynukleotiden und -Proteinen in verschiedenen biologischen Proben sowie Verfahren zum Identifizieren von Zellen, die 84P2A9 exprimieren, bereit gestellt. Eine typische Ausführungsform dieser Erfindung stellt Verfahren zum Überwachen von 84P2A9-Genprodukten in einer Gewebe- oder einer hämatologischen Probe bereit, die eine gewisse Form einer Wachstumsregulationsstörung wie beispielsweise Krebs aufweisen oder bei denen eine gewisse Form einer Wachstumsregulationsstörung wie beispielsweise Krebs vermutet wird. Ferner stellt die Erfindung verschiedene immunogene oder therapeutische Zusammensetzungen und Strategien zum Behandeln von Karzinomen bereit, die 84P2A9 exprimieren, wie beispielsweise Prostatakarzinome, einschließlich Therapien, die auf die Hemmung der Transkription, Translation, Prozessierung oder Funktion von 84P2A9 abzielen, sowie Krebsimpfstoffe.

KURZE BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0013] **Fig. 1** zeigt die DNA-Sequenz von 84P2A9 nach Suppression Subtractive Hybridization (SSH) mit einer Länge von etwa 425 Nukleotiden (SEQ ID Nr.: 3). Diese Sequenz wurde bei Vergleichen der cDNAs aus verschiedenen androgenabhängigen und androgenunabhängigen LAPC-Xenografts identifiziert.

[0014] **Fig. 2** zeigt die Nukleotid- (SEQ ID Nr.: 1) und Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr.: 2) von 84P2A9. Siehe Beispiel 2, unten. Die das Start-ATG umgebende Sequenz (AAC ATG G) (SEQ ID Nr.: 4) weist eine Kozak-Sequenz (A an Position -3 und G an Position +1) auf. Das Startmethionin mit der Kozak-Sequenz ist fett gedruckt, die Kernlokalisierungssignalsequenzen sind eingerahmt.

[0015] **Fig. 3A** und **Fig. 3B** zeigen die Ausrichtung der Aminosäuresequenz von 84P2A9 (SEQ ID Nr.: 2) mit KIAA1552 (SEQ ID Nr.: 5) und LUCA15 (SEQ ID Nr.: 6). **Fig. 3A** zeigt, dass die 84P2A9-Proteinsequenz (untere Zeile) eine gewisse Homologie mit dem menschlichen Gehirnprotein KIAA1152 aufweist (39,5%ige Identität in einer 337 Aminosäuren langen Region. Score: 407,0; Lückenhäufigkeit (Gap Frequency): 5,9%).

Fig. 3B zeigt, dass die 84P2A9-Proteinsequenz (untere Zeile) eine Domäne enthält, die zu einem Teil des Tumorsuppressorproteins LUCA15 homolog ist (64,3%ige Identität in einer 42 Aminosäuren langen Region. Score 138,0; Lückenhäufigkeit (Gap Frequency): 0,0%).

[0016] Fig. 4A–Fig. 4C zeigen die Northern-Blot-Analyse der restringierten 84P2A9-Expression in verschiedenen normalen Humangeweben (unter Verwendung des 84P2A9-SSH-Fragments als Sonde) und in LAPC-Xenografts. Zwei multiple Northern-Gewebeblots (Clontech) (**Fig. 4A** und **Fig. 4B**) und ein Northern-Xenograftblot (**Fig. 4C**) wurden mit dem 84P2A9-SSH-Fragment als Sonde behandelt. Spur 1–8 in **Fig. 4A** bestehen aus mRNA aus Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Leber, Skelettmuskel, Niere bzw. Pankreas. Spur 1–8 in **Fig. 4B** bestehen aus Gesamt-RNA aus Milz, Thymus, Prostata, Hoden, Eierstock, Dünndarm, Kolon bzw. Leukozyten. Spur 1–5 in **Fig. 4C** bestehen aus mRNA aus Prostata, LAPC-4 AD, LAPC-4 AI, LAPC-9 AD bzw. LAPC-9 AI. Die Größenstandards sind an der Seite in Kilobasen (kb) angegeben. Jede Spur enthält 2 µg mRNA bei den Normalgeweben und 10 µg Gesamt-RNA bei den Xenograftgeweben. Die Ergebnisse zeigen die Expression von 84P2A9 in Hoden und Prostata sowie in den LAPC-Xenografts.

[0017] Fig. 5 zeigt die Northern-Blot-Analyse der Expression von 84P2A9 in Prostata- und mehreren Krebszelllinien. Spur 1–56 zeigen Expression in LAPC-4 AD, LAPC-4 AI, LAPC-9 AD, LAPC-9 AI, LNCaP, PC-3, DU 145, TsuPr1, LAPC-4 CL, HT1197, SCaBER, UM-UC-3, TCCSUP, J82, 5637, 293T, RD-ES, PANC-1, BxPC-3, HPAC, Capan-1, SK-CO-1, CaCo-2, LoYo, T84, Colo-205, KCL 22, PFSK-1, T98G, SK-ES-1, HOS, U2-OS, RD-ES, CALU-1, A427, NCI-H82, NCI-H146, 769-P, A498, CAKI-1, SW839, BTIO, CAMA-1, DU4475, MCF-7, MDA-MB-435s, NTERRA-2, NCCIT, TERA-1, TERA-2, A431, HeLa, OY-1063, PA-1, SW626 bzw. CAOY-3. Eine hochgradige 84P2A9-Expression wurde in Krebszelllinien aus Gehirn (pFSK-1, T98G), Knochen (HOS, U2-OS), Lunge (CALU-1, NCI-H82, NCI-H146) und Niere (769-P, A498, CAKI-1, SW839) festgestellt. Mittelgradige Expression wurde in mehreren Krebszelllinien aus Pankreas (pANC-1, BxPC-3, HPAC, CAPAN-1), Kolon (SK-CO-1, CACO-2, LOVO, COLO205), Knochen (SK-ES-1, RD-ES), Brust (MCF-7, MDA-MB-435s) und Hoden (NCCIT) festgestellt.

[0018] Fig. 6. zeigt die Northern-Blot-Analyse der Expression von 84P2A9 in Proben von Patienten mit Prostatakrebs. Die Proben von Patienten mit Prostatakrebs exprimieren 84P2A9 sowohl im normalen Teil des Prostatagewebes als auch im vom Tumor befallenen Teil. Spur 1–7 zeigen normale Prostata, normales umliegendes Gewebe von Patient 1, Tumor im Stadium Gleason 9 von Patient 1, normales umliegendes Gewebe von Patient 2, Tumor im Stadium Gleason 7 von Patient 2 bzw. Tumor im Stadium Gleason 7 von Patient 3. Diese Ergebnisse belegen, dass es sich bei 84P2A9 um ein sehr hodenspezifisches Gen handelt, das bei Prostatakrebs und möglicherweise bei auch anderen Karzinomen hochreguliert ist. 84P2A9 könnte sich daher, ähnlich wie die MAGE-Antigene, als Hodenkrebsantigen qualifizieren (Van den Eynde and Boon, Intl Clin Lab Res. 27: 81–86, 1997).

[0019] Fig. 7 zeigt RNA, die aus Nierentumoren (T) und deren benachbartem normalem Gewebe (N) von Nierentumorkranken isoliert wurde: Spur 1–15 zeigen 769-P-Klarzelltyp; A498-Klarzelltyp; SW839-Klarzelltyp; Normale Niere; Patient 1, N; Patient 1, Tumor; Patient 2, N; Patient 2, Tumor, Klarzelltyp, Grad III; Patient 3, N; Patient 3, Tumor, Klarzelltyp, Grad II/IV; Patient 4, N; Patient 4, Tumor, Klarzelltyp, Grad II/IV; Patient 5, N; Patient 5, Tumor, Klarzelltyp, Grad II; und Patient 6, Tumor bzw. Metastase in die Brustwand (N = normales benachbartes Gewebe und CL = Zelllinie). Die Northern-Analyse wurde mit 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe durchgeführt. Expression von 84P2A9 wurde in allen 6 getesteten Tumorproben sowie in den drei Nierenzelllinien 769-P, A498 und SW839 festgestellt.

[0020] Fig. 8 zeigt RNA, die aus Kolonkarzinomen (T) und deren benachbartem normalem Gewebe (N) von Kolonkarzinompatienten isoliert wurde. Spur 1–11 zeigen Colo 205; LoVo; T84; Caco-2; Patient 1, N; Patient 1, Tumor, Grad 2, T3N1Mx (positiv auf Lymphknotenmetastasen); Patient 2, N; Patient 2, Tumor, Grad 1, T2N0Mx; Patient 3, N; Patient 3, Tumor, Grad 1, T2N1Mx (positiv auf Lymphknotenmetastasen); und Patient 4, Tumor, Grad 2, T3N1Mx (positiv auf Lymphknotenmetastasen) (N = normales benachbartes Gewebe und CL = Zelllinie). Die Northern-Analyse wurde mit 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe durchgeführt. Expression von 84P2A9 wurde in allen 4 getesteten Tumorproben sowie in den 4 Kolonkarzinom-Zelllinien Colo 205, LoVo, T84 und Caco-2 festgestellt.

[0021] Fig. 9 zeigt die Expression von 84P2A9 nach Testung in einer Reihe von humanen Karzinomen (T) und ihren jeweils entsprechenden Normalgeweben (N) auf RNA-Dotblots. Bei den Krebszelllinien von links nach rechts handelte es sich um HeLa (Zervixkarzinom), Daudi (Burkitt-Lymphom), K562 (CML), HL-60 (pML), G361 (Melanom), A549 (Lungenkarzinom), MOLT-4 (Lymphoblasten-Leukämie), SW480 (Kolonkarzinom) und Raji (Burkitt-Lymphom). Expression von 84P2A9 wurde in Nierentumoren, Brustkarzinomen, Prostata-

karzinomen, Lungenkarzinomen, Magenkarzinomen, Kolonkarzinomen, Zervixkarzinomen und Rektumkarzinomen festgestellt. 84P2A9 wurde außerdem in hohem Maß in einer Reihe von Krebszelllinien exprimiert, insbesondere in den Lymphoblasten-Leukämie-Zelllinie MOLT4 und in der Lungenkarzinom-Zelllinie A549. Die in normalem benachbartem (aus erkranktem Gewebe isoliertem) Gewebe, aber nicht in normalem, aus gesunden Spender isoliertem Gewebe festgestellte Expression könnte darauf verweisen, dass diese Gewebe nicht gänzlich normal sind und dass 84P2A9 in einem Krebsfrühstadium exprimiert werden könnte.

[0022] [Fig. 10](#) zeigt die Expression von 84P2A9 in Proben von Patienten mit Blasenkrebs. In 4 getesteten Proben von Blasenkrebspatienten und in drei Blasenkrebszelllinien (CL), UM-UC-3 (Spur 1), J82 (Spur 2) und SCABER (Spur 3) wurde 84P2A9-Expression festgestellt. RNA wurde aus normaler Blase (Nb), Blasentumoren (T) und deren benachbartem normalen Gewebe (N) aus 6 Patienten mit Blasenkrebs (P) isoliert. Bei dem Tumor von P1 handelt es sich um ein „Transitional Cell Carcinoma“ (TCC, Karzinom des Übergangsepithels), Grad 4; P2 ist ein invasives Plattenepithelkarzinom; P3 ist ein „Transitional Cell Carcinoma“ (TCC, Karzinom des Übergangsepithels), Grad 3; P4 ist ein nicht invasives papilläres Karzinom, Grad 1/3; P5 ist ein papilläres Karzinom, Grad 3/3 und P6 ist ein „Transitional Cell Carcinoma“ (TCC, Karzinom des Übergangsepithels), Grad 3/2. Die Northern-Analyse wurde mit 10 µg Gesamt-RNA jeder Probe durchgeführt.

[0023] [Fig. 11](#) zeigt die Expression von 84P2A9-Protein in 293T-Zellen. 293T-Zellen wurden transient mit dem mit dem pCDNA3.1-V5-HIS-Epitop markierten 84P2A9-Plasmid oder mit leerem Kontrollvektor transfiziert und 2 Tage später geerntet. Die Zellen wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer lysiert, und die Lysate wurden auf einem 10-20%igen SDS-PAGE-Gel getrennt und anschließend auf Nitrozellulose übertragen. Der Blot wurde in Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) + 2% Magermilch blockiert und anschließend mit einer 1:3000-Verdünnung eines monoklonalen Maus-Anti-V3-Antikörpers (Invitrogen) in TBS + 0,15 % Tween-20 + 1% Milch inkubiert. Der Blot wurde gewaschen und anschließend mit einer 1:4000-Verdünnung eines sekundären Anti-Maus-IgG-GRP-Konjugatantikörpers inkubiert.

[0024] Nach dem Waschen wurden die immunreaktiven Anti-VS-Epitop-Banden mit verstärkter Chemilumineszenz entwickelt und durch Belichten eines Autoradiographiefilms sichtbar gemacht. Der Pfeil zeigt auf eine spezifische immunreaktive Anti-VS-Bande von etwa 87 kD, die der Expression des Epitop-markierten 84P2A9-Proteins in den transfizierten Zellen entspricht.

AUSFÜHRLICHE BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0025] Sofern nicht anders definiert, sollen alle hierin verwendeten Begriffe aus dem Stand der Technik, Anmerkungen und sonstige wissenschaftliche Begriffe oder Terminologie die Bedeutungen haben, die von einem Fachmann, den diese Erfindung betrifft, üblicherweise verstanden werden. In manchen Fällen sind Begriffe mit allgemein verständlicher Bedeutung zur Verdeutlichung und/oder zur schnellen Bezugnahme hierin definiert, und das Vorhandensein solcher Definitionen hierin ist nicht zwingend als wesentlicher Unterschied gegenüber den allgemein im Stand der Technik verstandenen aufzufassen. Viele der Techniken und Verfahren, die hierin beschrieben sind oder auf die hierin verwiesen wird, sind allgemein gut verständlich und werden von einem Fachmann üblicherweise mittels herkömmlicher Verfahrensweisen eingesetzt, beispielsweise den gemeinhin verwendeten molekularen Klonierungsverfahren, wie sie in Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2. Auflage (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., beschrieben sind. Je nach Erforderlichkeit werden Verfahren, welche die Verwendung handelsüblicher Kits und Reagenzien beinhalten, generell nach vom Hersteller definierten Protokollen und/oder Parametern ausgeführt, sofern nicht anders angegeben.

DEFINITIONEN:

[0026] Wie hierin verwendet, bedeuten die Begriffe „fortgeschrittenes Prostatakarzinom“, „lokal fortgeschrittenes Prostatakarzinom“, „fortgeschrittene Krankheit“ und „lokal fortgeschrittene Krankheit“ Prostatakarzinome, die sich durch die Prostatakapsel hindurch ausgebreitet haben und sollen das Krankheitsstadium C nach dem System der American Urological Association (AUA), das Krankheitsstadium C1–C2 nach dem Whitmore-Jewett-System und das Krankheitsstadium T3–T4 und N+ nach dem System TNM (Tumor, Nodus, Metastasen) umfassen. Bei Patienten mit lokal fortgeschrittener Krankheit wird im Allgemeinen keine Operation angedenkt, und diese Patienten haben einen im Wesentlichen weniger günstigen Ausgang im Vergleich zu Patienten mit klinisch lokalisiertem (auf das Organ beschränktem) Prostatakarzinom. Eine lokal fortgeschrittene Krankheit ist klinisch durch tastbare Evidenz einer Härtung jenseits der lateralen Grenze der Prostata oder einer Asymmetrie oder Härtung über der Prostatabasis identifizierbar. Lokal fortgeschrittener Prostatakrebs wird derzeit pathologisch nach Radikalprostatektomie diagnostiziert, wenn der Tumor in die Prostatakapsel ein-

dringt oder diese penetriert, bis in die Resektatränder verläuft oder in die Samenbläschen eindringt.

[0027] Der Begriff „Antikörper“ wird im weitesten Sinn verwendet. Daher kann ein „Antikörper“ natürlich vorkommend oder künstlich sein, beispielsweise monoklonale Antikörper, die durch herkömmliche Hybridomtechnologie hergestellt werden. Anti-84P2A9-Antikörper umfassen monoklonale und polyklonale Antikörper sowie Fragmente, welche die Antigenbindungsdomäne und/oder mindestens eine Komplementarität bestimmende Region dieser Antikörper enthalten. Wie hierin verwendet, ist ein „Antikörperfragment“ definiert als mindestens ein Teil der variablen Region des Immunglobulinmoleküls, der an sein Ziel bindet, d. h. die Antigenbindungsregion. In einer Ausführungsform sind dadurch einzelne Anti-84P2A9-Antikörper (einschließlich Agonist, Antagonist und neutralisierende Antikörper) und Anti-84P2A9-Antikörperzusammensetzungen mit polyepitoper Spezifität abgedeckt. Der Begriff „monoklonaler Antikörper“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf einen Antikörper, der aus einer Population von im Wesentlichen homogenen Antikörpern erhalten wird, d. h. die Antikörper, welche die Population umfasst, sind identisch, ausgenommen möglicher, natürlich vorkommender Mutationen, die in kleinen Mengen vorhanden sind.

[0028] Der Begriff „zytotoxisches Agens“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf eine Substanz, welche die Funktion von Zellen hemmt oder verhindert und/oder die Vernichtung von Zellen verursacht. Der Begriff soll radioaktive Isotope (z. B. At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} und radioaktive Isotope von Lu), Chemotherapeutika und Toxine wie kleinmolekulare Toxine oder enzymatisch aktive Toxine bakterieller, fungaler, pflanzlicher oder tierischer Herkunft umfassen, einschließlich Fragmente und/oder Varianten davon.

[0029] Wie hierin verwendet, sollen sich die Begriffe „hybridisieren“, „hybridisierend“, „hybridisiert“ und dergleichen bei Gebrauch im Zusammenhang mit Polynukleotiden auf herkömmliche Hybridisierungsbedingungen beziehen, vorzugsweise beispielsweise eine Hybridisierung in 50% Formamid/6 X SSC/0,1% SDS/100 µg/ml ssDNA, bei denen die Hybridisierungstemperaturen über 47 Grad Celsius liegen und die Temperaturen zum Waschen in 0,1 X SSC/0,1% SDS über 55 Grad Celsius liegen.

[0030] Wie hierin verwendet, gilt ein Polynukleotid als „isoliert“, wenn es im Wesentlichen von kontaminierenden Polynukleotiden getrennt wurde, welche Genen entsprechen bzw. zu Genen komplementär sind, bei denen es sich nicht um das 84P2A9-Gen handelt, oder die Polypeptide kodieren, bei denen es sich nicht um das Genprodukt von 84P2A9 oder dessen Fragmente handelt. Ein Fachmann kann leicht Nukleinsäureisolierungsverfahren anwenden, um ein isoliertes 84P2A9-Polynukleotid zu erhalten.

[0031] Wie hierin verwendet, gilt ein Protein als isoliert, wenn physikalische, mechanische oder chemische Verfahren angewandt werden, um das 84P2A9-Protein von zellulären Bestandteilen, die normalerweise mit dem Protein assoziiert sind, zu entfernen. Ein Fachmann kann leicht Standardreinigungungsverfahren anwenden, um ein isoliertes 84P2A9-Protein zu erhalten.

[0032] Der Begriff „Säuger“, wie hierin verwendet, bezieht sich auf jeden als Säuger klassifizierten Säuger, einschließlich Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hunde, Katzen, Kühe, Pferde und Menschen. In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Säuger eine Maus. In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der Erfindung ist der Säuger ein Mensch.

[0033] Wie hierin verwendet, bedeuten die Begriffe „metastasierter Prostatakrebs“ und „metastasierte Krankheit“ Prostatakarzinome, die in regionale Lymphknoten oder entfernte Stellen gestreut haben, und sollen das Krankheitsstadium D nach dem AUA-System und das Krankheitsstadium TxNxM+ nach dem TNM-System umfassen. Wie es bei lokal fortgeschrittenem Prostatakarzinom der Fall ist, ist bei Patienten mit metastasierter Krankheit in der Regel eine Operation nicht angezeigt, und eine bevorzugte Behandlungsmodalität ist eine hormonelle (Androgenablations-)Therapie. Patienten mit metastasiertem Prostatakarzinom entwickeln innerhalb von 12 bis 18 Monaten nach Beginn der Behandlung schließlich einen androgenrefraktären Zustand. Rund die Hälfte dieser androgenrefraktären Patienten verstirbt innerhalb von 6 Monaten, nachdem sich dieser Status entwickelt hat. Der häufigste Ort für Prostatakrebsmetastasen sind die Knochen. Prostatakrebs-Knochenmetastasen sind charakteristischerweise oft eher osteoblastisch als osteolytisch (d. h. das Nettoergebnis ist eine Knochenbildung). Knochenmetastasen werden am häufigsten in der Wirbelsäule gefunden, gefolgt vom Oberschenkelknochen, Becken, Rippenkäfig, Schädel und Oberarmknochen. Sonstige häufige Metastasierungsorte sind Lymphknoten, Lunge, Leber und Gehirn. Ein metastasiertes Prostatakarzinom wird typischerweise durch offene oder laparoskopische Beckenlymphadenektomie, Ganzkörper-Radionuklid-Scans, Skelettradiographie und/oder Biopsie von Knochenläsionen diagnostiziert.

[0034] „Mäßig stringente Bedingungen“ sind solche, die in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory

Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, beschrieben und identifiziert sind, sind aber nicht auf diese beschränkt. Sie umfassen die Verwendung von Waschlösung und Hybridisierungsbedingungen (z. B. Temperatur, Ionenstärke und % SDS), die weniger stringent sind als die oben beschriebenen. Ein Beispiel mäßig stringenter Bedingungen ist eine Übernachtinkubation bei 37°C in einer Lösung umfassend: 20% Formamid, 5 × SSC (150 mM NaCl, 15 mM Trisnatriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 7,6), 5 × Denhardt-Lösung, 10% Dextransulfat und 20 mg/ml denaturierte gescherte Lachsspermien-DNA, gefolgt vom Waschen der Filter in 1 × SSC bei etwa 37–50°C. Der Fachmann weiß, wie Temperatur, Ionenstärke etc. erforderlichenfalls einzustellen sind, um Faktoren wie Sondenlänge und dergleichen Rechnung zu tragen.

[0035] Wie hierin verwendet, bezieht sich „Motiv“, wie beispielsweise „biologisches Motiv in einem mit 84P2A9 verwandten Protein“ auf jeden Satz von Aminosäuren, die einen Teil der Primärsequenz eines Proteins bilden und die entweder kontig sind oder zu bestimmten, im Allgemeinen invarianten oder konservierten Positionen ausgerichtet werden können, der mit einer bestimmten Funktion oder Modifikation assoziiert ist (z. B. phosphoryliert, glykosyliert oder amidiert ist).

[0036] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „Polynukleotid“ eine polymere Form von Nukleotiden mit einer Länge von mindestens 10 Basen oder Basenpaaren, entweder Ribonukleotide oder Desoxynukleotide, oder eine modifizierte Form einer dieser Arten von Nukleotiden, und soll einzel- und doppelsträngige Formen von DNA und/oder RNA umfassen. Im Stand der Technik wird dieser Begriff häufig im Wechsel mit „Oligonukleotid“ verwendet. Wie hierin erläutert, kann ein Polynukleotid eine hierin beschriebene Nukleotidsequenz aufweisen, wobei Thymidin (T) (wie beispielsweise in SEQ ID Nr.: 1 gezeigt) auch Uracil (U) sein kann; diese Definition bezieht sich auf Unterschiede zwischen der chemischen Struktur von DNA und RNA, insbesondere auf die Beobachtung, dass eine der vier Hauptbasen in RNA Uracil (U) anstelle von Thymidin (T) ist.

[0037] Wie hierin verwendet, bedeutet der Begriff „Polypeptid“ ein Polymer aus mindestens etwa 4, 5, 6, 7 oder 8 Aminosäuren. In dieser Beschreibung werden durchgängig Drei-Buchstaben oder Ein-Buchstaben-Standardbezeichnungen für Aminosäuren verwendet. Im Stand der Technik wird dieser Begriff häufig im Wechsel mit „Peptid“ verwendet.

[0038] Die „Stringenz“ einer Hybridisierungsreaktion kann von einem durchschnittlichen Fachmann leicht bestimmt werden und ist generell eine empirische Berechnung, die von der Sondenlänge, Waschtemperatur und Salzkonzentration abhängt. Längere Sonden erfordern im Allgemeinen höhere Temperaturen, damit ein korrektes Annealing (Anlagern) stattfindet, während kürzere Sonden niedrigere Temperaturen erfordern. Eine Hybridisierung hängt im Allgemeinen von der Fähigkeit denaturierter Nukleinsäuresequenzen ab, ein Reannealing (eine Wiederanlagerung) einzugehen, wenn in einer Umgebung unter ihrer Schmelztemperatur komplementäre Stränge vorhanden sind. Je höher der Grad der gewünschten Homologie zwischen der Sonde und der hybridisierbaren Sequenz ist, desto höher ist die verwendbare relative Temperatur. Daraus folgt, dass höhere relative Temperaturen im Gegensatz zu niedrigeren Temperaturen die Reaktionsbedingungen tendenziell stringenter machen. Für weitere Einzelheiten und eine Erläuterung der Stringenz von Hybridisierungsreaktionen siehe Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0039] „Stringente Bedingungen“ oder „Bedingungen hoher Stringenz“, wie hierin definiert, sind unter anderem wie folgt identifiziert: (1) Verwendung niedriger Ionenstärke und hoher Temperatur zum Waschen, beispielsweise 0,015 M Natriumchlorid/0,0015 M Natriumcitrat/0,1% Natriumdodecylsulfat bei 50°C; (2) Verwendung eines Denaturierungsmittels wie Formamid, während der Hybridisierung, beispielsweise 50% (Vol./Vol.) Formamid mit 0,1% Rinderserumalbumin/0,1% Ficoll/0,1% Polyvinylpyrrolidon/50 mM Natriumphosphatpuffer bei pH 6,5 mit 750 mM Natriumchlorid, 75 mM Natriumcitrat bei 42°C; oder (3) Verwendung von 50% Formamid, 5 × SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M Natriumcitrat), 50 mM Natriumphosphat (pH 6,8), 0,1% Natriumpyrophosphat, 5 × Denhardt-Lösung, ultraschallbehandelter Lachsspermien-DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS und 10% Dextransulfat bei 42°C, während Waschschriffe bei 42°C in 0,2 × SSC (Natriumchlorid/Natriumcitrat) und 50% Formamid bei 55°C durchgeführt werden, gefolgt von einem Waschschriff mit hoher Stringenz, bestehend aus 0,1 × SSC mit EDTA bei 55°C.

[0040] Ein „transgenes Tier“ (z. B. eine Maus oder eine Ratte) ist ein Tier, das Zellen aufweist, welche ein Transgen enthalten, wobei das Transgen in das Tier oder in einen Vorfahr des Tiers in einem pränatalen, z. B. embryonalen Stadium, eingeführt worden ist. Ein „Transgen“ ist eine DNA, die in das Genom einer Zelle, aus der sich ein transgenes Tier entwickelt, integriert ist.

[0041] Wie hierin verwendet, sollen das 84P2A9-Gen und 84P2A9-Protein die 84P2A9-Gene und -Proteine umfassen, die hierin spezifisch beschrieben sind, und die anderen von 84P2A9 kodierten Proteinen bzw. Pep-

tiden entsprechenden Gene und Proteine sowie strukturell ähnliche Varianten der vorangehenden. Solche anderen 84P2A9-Peptide und Varianten weisen im Allgemeinen Kodierungssequenzen auf, die eine hohe Homologie zu der 84P2A9-Kodierungssequenz aufweisen und vorzugsweise eine Aminosäurehomologie von mindestens etwa 50% (nach BLAST-Kriterien) und vorzugsweise eine Nukleinsäurehomologie von 50%, 60%, 70%, 80%, 90% oder mehr (nach BLAST-Kriterien) und vorzugsweise eine Aminosäurehomologie von mindestens etwa 60% (nach BLAST-Kriterien) aufweisen, wobei sie mehr bevorzugt eine Homologie von mindestens 70% (nach BLAST-Kriterien) zueinander aufweisen.

[0042] Die erfindungsgemäßen, mit 84P2A9 verwandten Proteine umfassen solche, die hierin spezifisch identifiziert sind, sowie Allelvarianten, konservative Substitutionsvarianten und Homologe, die ohne übermäßige Experimentierung nach den hierin ausgeführten Verfahren isoliert/erzeugt und charakterisiert werden können oder leicht aus dem Stand der Technik verfügbar sind. Dazu gehören auch Fusionsproteine, die Teile verschiedener 84P2A9-Proteine oder Fragmente davon kombinieren, sowie Fusionsproteine eines 84P2A9-Proteins und eines heterologen Polypeptids. Solche 84P2A9-Proteine werden kollektiv als die mit 84P2A9 verwandten Proteine, die erfindungsgemäßen Proteine oder als 84P2A9 bezeichnet. Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff „mit 84P2A9 verwandtes Polypeptid“ auf ein Polypeptidfragment oder eine 84P2A9-Proteinsequenz aus 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 oder mehr Aminosäuren.

STRUKTUR UND EXPRESSION VON 84P2A9

[0043] Wie nachfolgend ausführlich erläutert ist, haben Experimente mit dem LAPC-4 AD-Xenograft bei männlichen SCID-Mäusen zur Identifizierung von Genen geführt, die an dem Fortschreiten von androgenabhängigem (AD) Prostatakrebs zu androgenunabhängigem (AI) Krebs beteiligt sind. Kurz beschrieben, wurden Mäuse, die LAPC-4 AD-Xenografts trugen, kastriert, als die Tumoren eine Größe von 1 cm im Durchmesser erreicht hatten. Die Tumoren verkleinerten sich und produzierten vorübergehend kein androgenabhängiges PSA-Protein mehr. Sieben bis vierzehn Tage nach der Kastration war im Blut der Mäuse erneut ein PSA-Spiegel detektierbar. Solche Tumore entwickeln schließlich einen AI-Phänotyp und beginnen, in den kastrierten Männchen wieder zu wachsen. Die Tumore wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Kastration entnommen, um Gene zu identifizieren, die während des Übergangs zur Androgenunabhängigkeit ein- oder ausgeschaltet werden.

[0044] Anschließend wurde das Verfahren der Suppression Subtractive Hybridization (SSH) (Diatchenko et al., 1996, PNAS 93: 6025) angewandt, um neuartige Gene zu identifizieren, beispielsweise solche, die bei Prostatakrebs überexprimiert sind, indem cDNAs von verschiedenen androgenabhängigen und androgenunabhängigen LAPC-Xenografts verglichen wurden. Diese Strategie führte zur Identifizierung neuartiger Gene mit gewebe- und krebsspezifischer Expression. Eines dieser Gene, das als 84P2A9 bezeichnet wurde, wurde bei einer Subtraktion identifiziert, bei der cDNA aus einem LAPC-4-Tumor vom AD-Typ, die 3 Tage nach der Kastration gewonnen wurde, von der cDNA aus einem LAPC-4-Tumor vom AD-Typ subtrahiert wurde, der in einem intakten männlichen Tier wuchs. Die SSH-DNA-Sequenz von etwa 425 bp ([Fig. 1](#)) ist neu und weist nur zu exprimierten Sequenzmarkern (Expressed Sequence Tags, ESTs) in der Datenbank dbEST Homologie auf.

[0045] 84P2A9 kodiert ein putatives Kernprotein, das Prostata- und Hoden-bedingte Expression aufweist. Die Charakterisierung von 84P2A9 zeigte zunächst, dass es in mehreren Karzinomen, einschließlich Prostata-, Hoden-, Nieren-, Gehirn-, Knochen-, Haut-, Eierstock-, Brust-, Pankreas-, Kolon-, Lymphozyten- und Lungenkarzinomen, fälschlicherweise exprimiert ist. Die Expression von 84P2A9 in Prostatakarzinomen liefert einen Hinweis darauf, dass dieses Protein bei der Tumorentstehung eine funktionelle Aufgabe hat. Möglicherweise wirkt 84P2A9 als Transkriptionsfaktor, der bei der Aktivierung von Genen mitwirkt, die an der Tumorentstehung beteiligt sind, oder an der Repression von Genen mitwirkt, welche die Tumorentstehung blockieren.

[0046] Wie in den folgenden Beispielen weiter beschrieben ist, sind die 84P2A9-Gene und -Proteine anhand einer Reihe von Analyseansätzen charakterisiert worden. Beispielsweise wurden Analysen der Nukleotidkodierungs- und Aminosäuresequenzen durchgeführt, um potenziell verwandte Moleküle sowie erkennbare Strukturdomänen, topologische Merkmale und andere Elemente in der 84P2A9-mRNA- und -Proteinstruktur zu identifizieren. Es wurden Northern Blot-Analysen der 84P2A9-mRNA-Expression durchgeführt, um festzustellen, in welchem Umfang normale und kanzeröse Gewebe 84P2A9-mRNA exprimieren.

[0047] Aus einer LAPC-4-AD-cDNA-Bibliothek (Lambda ZAP Express, Stratagene) wurde ein 84P2A9-cDNA-Klon in Volllänge (Klon 1) mit 2345 Basenpaaren (SEQ ID Nr.: 1) kloniert ([Fig. 2](#)). Die cDNA kodiert ein offenes Leseraster (ORF) aus 504 Aminosäuren (SEQ ID Nr.: 2). Die Sequenzanalyse zeigte das Vorhandensein von sechs potenziellen Kernlokalisierungssignalen, und die Lokalisierung im Zellkern wurde anhand

des PSORT-Programmes (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/jform.html>) vorhergesagt. Die Proteinsequenz weist eine gewisse Homologie zu einem menschlichen Gehirnprotein KIAA1152 (SEQ ID Nr.: 5) auf (39,5%ige Identität über eine Region von 337 Aminosäuren) und enthält eine Domäne, die zu dem Tumorsuppressorprotein LUCA15 homolog ist (SEQ ID Nr.: 6) (64,3%ige Identität über eine Region von 42 Aminosäuren) (GenBank-Zugangsnr. P52756) (Fig. 3).

[0048] Die Expression von 84P2A9 ist in normalem Gewebe erwachsener Menschen auf die Prostata und Hoden bezogen, wird aber auch in bestimmten Karzinomen, wie beispielsweise in Prostata-, Hoden-, Nieren-, Gehirn-, Knochen-, Haut-, Eierstock-, Brust-, Pankreas-, Kolon-, Lymphozyten- und Lungenkarzinomen festgestellt (siehe z. B. Fig. 4 bis Fig. 8). Tumor-Xenografts aus der menschlichen Prostata, die ursprünglich aus einem Patienten mit hochgradigem metastasierendem Prostatakarzinom stammten, exprimieren große Mengen von 84P2A9 (Fig. 4).

[0049] Wie hierin beschrieben, weist 84P2A9 spezifische Eigenschaften auf, die analog zu den in einer Genfamilie Gefundenen sind, deren Polynukleotide, Polypeptide, reaktive zytotoxische T-Zellen (ZTL), T-Helferzellen (HTL) und Anti-Polypeptidantikörper in wohlbekannten diagnostischen Tests verwendet werden, um Krankheitsbilder in Verbindung mit fehlreguliertem Zellwachstum wie beispielsweise Krebs, insbesondere Prostatakrebs, zu untersuchen (siehe z. B. sowohl sein hoch spezifisches Gewebeexpressionsmuster sowie seine Überexpression in Prostatakarzinomen, wie beispielsweise in Beispiel 3 beschrieben). Das am besten bekannte Mitglied dieser Klasse ist PSA, der archetypische Marker, der seit Jahren von Ärzten verwendet wird, um das Vorhandensein von Prostatakrebs zu identifizieren und zu überwachen (siehe z. B. Merrill et al., J. Urol. 163(2): 503–5120 (2000); Polascik et al., J. Urol. Aug; 162(2): 293–306 (1999) und Fortier et al., J. Nat. Cancer Inst. 91(19): 1635–1640(1999)). In diesem Kontext werden noch verschiedene andere diagnostische Marker verwendet, einschließlich p53 und Kras (siehe z. B. Tulchinsky et al., Int J Mol Med 1999 Jul; 4(1): 99–102 und Minimoto et al., Cancer Detect Prev 2000; 24(1): 1–12). Diese Beschreibung der 84P2A9-Polynukleotide und -Polypeptide (sowie der 84P2A9-Polynukleotidsonden und der Anti-84P2A9-Antikörper, die zur Identifizierung des Vorhandenseins dieser Moleküle verwendet werden) und deren Eigenschaften ermöglicht es daher dem Fachmann, diese Moleküle in Verfahren zu nutzen, die analog zu den beispielsweise in verschiedenen diagnostischen Tests Verwendeten sind, welche auf die Untersuchung von mit Krebs in Zusammenhang stehenden Bedingungen ausgerichtet sind.

[0050] Typische Ausführungsformen diagnostischer Verfahren, welche die hierin beschriebenen 84P2A9-Polynukleotide, -Polypeptide und -Antikörper nutzen, sind analog zu solchen Verfahren von gut etablierten diagnostischen Tests, die PSA-Polynukleotide, -Polypeptide, und -Antikörper verwenden. So wie beispielsweise PSA-Polynukleotide als Sonden (beispielsweise bei der Northern-Analyse, siehe z. B. Sharief et al., Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3): 567–74(1994)) und Primer (beispielsweise bei der PCR-Analyse, siehe z. B. Okegawa et al., J. Urol. 163(4): 1189–1190 (2000)) zur Beobachtung des Vorhandenseins und/oder der Menge an PSA-mRNAs in Verfahren zur Überwachung der PSA-Überexpression oder der Metastasierung von Prostatakarzinomen verwendet werden, können die hierin beschriebenen 84P2A9-Polynukleotide auf dieselbe Weise eingesetzt werden, um eine 84P2A9-Überexpression oder die Metastasierung von Prostata- und anderen Karzinomen, die dieses Gen exprimieren, festzustellen. So wie PSA-Polynukleotide verwendet werden, um PSA-spezifische Antikörper herzustellen, die dann in Verfahren zur Überwachung der Überexpression des PSA-Proteins (siehe z. B. Stephan et al., Urology 55(4): 560–3 (2000)) oder der Metastasierung von Prostatazellen (siehe z. B. Alanen et al., Pathol. Res. Pract. 192(3): 233–7 (1996)) zum Beobachten des Vorhandenseins und/oder der Menge an PSA-Proteinen verwendet werden, können die hierin beschriebenen 84P2A9-Polypeptide alternativ verwendet werden, um Antikörper zur Verwendung bei der Feststellung einer Überexpression von 84P2A9 oder der Metastasierung von Prostatazellen und Zellen anderer Karzinomen, die dieses Gen exprimieren, herzustellen.

[0051] Weil eine Metastasierung die Bewegung von Krebszellen von einem Ursprungsorgan (wie beispielsweise der Hoden oder Prostata-drüse, etc.) zu einem anderen Körperbereich (wie beispielsweise einem Lymphknoten) beinhaltet, können insbesondere Tests, welche eine biologische Probe auf das Vorhandensein von Zellen, die 84P2A9-Polynukleotide und/oder -Polypeptide exprimieren, untersuchen, verwendet werden, um einen Hinweis auf eine Metastasierung zu liefern. Wenn beispielsweise festgestellt wird, dass eine biologische Probe von Gewebe, das 84P2A9-exprimierende Zellen normalerweise nicht enthält (Lymphknoten), 84P2A9-exprimierende Zellen enthält, wie beispielsweise die Expression von 84P2A9 in LAPC4- und LAPC9-Xenografts aus Lymphknoten bzw. Knochenmetastasen, deutet dieser Befund auf Metastasierung hin.

[0052] Alternativ können 84P2A9-Polynukleotide und/oder -Polypeptide verwendet werden, um eine Evidenz für eine Krebserkrankung zu liefern, beispielsweise wenn festgestellt wird, dass Zellen in einer biologischen

Probe, die 84P2A9 normalerweise nicht oder in einer anderen Menge exprimieren, 84P2A9 exprimieren oder 84P2A9 verstärkt exprimieren (siehe z. B. die 84P2A9-Expression in Nieren-, Lungen- und Kolonkarzinomzellen und in Patientenproben, etc., die in **Fig. 4–Fig. 10** gezeigt ist). Möglicherweise möchte ein Fachmann bei solchen Tests ergänzende Hinweise auf eine Metastasierung erhalten, indem die biologische Probe auf das Vorhandensein eines zweiten geweberestringierten Markers (außer 84P2A9) getestet wird, wie beispielsweise PSA, PSCA etc. (siehe z. B. Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233–237 (1996)).

[0053] So wie PSA-Polynukleotidfragmente und -Polynukleotidvarianten vom Fachmann in Verfahren zur Überwachung von PSA eingesetzt werden, werden 84P2A9-Polynukleotidfragmente und -Polynukleotidvarianten auf analoge Weise verwendet. Insbesondere sind typische PSA-Polynukleotide, die in Verfahren zum Überwachen von PSA verwendet werden, Sonden oder Primer, die aus Fragmenten der PSA-cDNA-Sequenz bestehen. Als Veranschaulichung müssen die zur PCR-Amplifizierung eines PSA-Polynukleotids verwendeten Primer weniger als die ganze PSA-Sequenz aufweisen, um in der Polymerasekettenreaktion zu funktionieren. Im Kontext solcher PCR-Reaktionen stellt der Fachmann im Allgemeinen verschiedene Polynukleotidfragmente her, die als Primer verwendet werden können, um verschiedene Anteile eines relevanten Polynukleotids zu amplifizieren oder um Amplifizierungsreaktionen zu optimieren (siehe z. B. Caetano-Anolles, *G. Biotechniques* 25(3): 472–476, 478–480 (1998); Robertson et al., *Methods Mol. Biol.* 98: 121–154 (1998)). Eine weitere Veranschaulichung der Verwendung solcher Fragmente liefert Beispiel 3, wo ein 84P2A9-Polynukleotidfragment als Sonde verwendet wird, um die Überexpression von 84P2A9-RNAs in Krebszellen aufzuzeigen. Darüber hinaus werden Polynukleotidsequenzvarianten in der ärztlichen Praxis typischerweise als Primer und Sonden für die entsprechenden mRNAs in PCR- und Northern-Analysen verwendet (siehe z. B. Sawai et al., *Fetal Diagn. Ther.* 1996, Nov-Dez; 11(6): 407–13 und *Current Protocols In Molecular Biology*, Band 2, Unit 2, Frederick M. Ausubel et al. Hrsg., 1995)). Polynukleotidfragmente und -varianten sind in diesem Kontext typischerweise geeignet, wenn sie das gemeinsame Attribut bzw. Merkmal aufweisen, unter Bedingungen hoher Stringenz an eine Polynukleotidzielsequenz (z. B. das in SEQ ID Nr.: 1 gezeigte 84P2A9-Polynukleotid) binden zu können.

[0054] So wie der Fachmann PSA-Polypeptidfragmente und -Polypeptidvariante für Verfahren zur Überwachung des PSA-Moleküls verwendet, können auch 84P2A9-Polypeptidfragmente und -Polypeptidvarianten auf analoge Weise verwendet werden. Typische, bei Verfahren der PSA-Überwachung verwendete PSA-Polypeptide sind insbesondere Fragmente des PSA-Proteins, die ein Antikörperepitop enthalten, das von einem Antikörper oder einer T-Zelle erkannt werden kann, welche spezifisch an das PSA-Protein binden können. Diese Praxis der Verwendung von Polypeptidfragmenten oder Polypeptidvarianten zur Erzeugung von Antikörpern (wie beispielsweise Anti-PSA-Antikörper oder T-Zellen) ist im Stand der Technik typisch, wobei ein breites Spektrum an Systemen, beispielsweise Fusionsproteine, vom Praktiker verwendet wird (siehe z. B. *Current Protocols In Molecular Biology*, Band 2, Unit 16, Frederick M. Ausubel et al. Hrsg., 1995). In diesem Kontext dient jedes Epitop in einem relevanten Protein zur Bereitstellung der Architektur, mit der ein Antikörper oder eine T-Zelle reagiert. Typischerweise stellt der Fachmann unterschiedliche Polypeptidfragmente her, die verwendet werden können, um Antikörper zu erzeugen, welche für verschiedene Anteile eines relevanten Polypeptids spezifisch sind (siehe z. B. US 5 840 501 A und US 5 939 533 A). Beispielsweise kann es bevorzugt sein, ein Polypeptid zu verwenden, das eines der hierin erörterten oder aus dem Stand der Technik verfügbaren biologischen Motive von 84P2A9 aufweist. Typischerweise sind in diesem Kontext Polypeptidfragmente, -varianten oder -analoge geeignet, so lange sie ein Epitop aufweisen, das einen Antikörper oder eine T-Zelle hervorbringen kann, die für eine Polypeptidzielsequenz (z. B. das in SEQ ID Nr.: 2 gezeigte 84P2A9-Polypeptid) spezifisch sind.

[0055] Wie hierin gezeigt, weisen die 84P2A9-Polynukleotide und -Polypeptide (sowie die 84P2A9-Polynukleotidsonden und Anti-84P2A9-Antikörper oder T-Zellen, die zur Identifizierung des Vorhandenseins dieser Moleküle verwendet werden) spezielle Eigenschaften auf, aufgrund derer sie bei der Diagnostizierung von Krebserkrankungen der Prostata geeignet sind. Diagnostische Tests, welche das Vorhandensein von -84P2A9-Genprodukten messen, um das Vorhandensein oder das Einsetzen eines hierin beschriebenen Krankheitszustandes wie beispielsweise Prostatakrebs zu beurteilen, sind besonders geeignet, um Patienten für Präventivmaßnahmen oder weitere Überwachung zu identifizieren, so wie es erfolgreich mit PSA geschah. Darüber hinaus erfüllen diese Materialien einen Bedarf im Stand der Technik nach Molekülen mit ähnlichen oder komplementären Eigenschaften zu PSA in Situationen, in denen beispielsweise eine definitive Diagnose der von der Prostata ausgehenden Metastasierung nicht auf Basis eines PSA-Tests alleine erfolgen kann (siehe z. B. Alanen et al., *Pathol. Res. Pract.* 192(3): 233–237 (1996)), und demnach müssen Materialien wie beispielsweise 84P2A9-Polynukleotide und -Polypeptide (sowie die 84P2A9-Polynukleotidsonden und Anti-84P2A9-Antikörper, die zur Identifizierung des Vorhandenseins dieser Moleküle verwendet werden) eingesetzt werden, um Metastasen aus der Prostata zu bestätigen.

[0056] Die hierin beschriebenen 84P2A9-Polynukleotide sind nicht nur für diagnostische Tests geeignet, sondern finden schließlich darüber hinaus einer Reihe weiterer spezifischer Anwendungen, beispielsweise bei der Identifizierung von onkogenetisch assoziierten chromosomalen Anomalien in 1q32.3. Außer ihrer Anwendung in diagnostischen Tests haben die hierin beschriebenen, mit 84P2A9 verwandten Proteine und Polynukleotide noch weitere Anwendungen, wie beispielsweise bei der forensischen Analyse von Geweben unbekannter Herkunft (siehe z. B. Takahama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28; 80(1-2): 63-9).

84P2A9-POLYNUKLEOTIDE

[0057] Ein Aspekt der Erfindung stellt Polynukleotide bereit, die dem ganzen oder einem Teil eines 84P2A9-Gens, einer 84P2A9-mRNA und/oder einer 84P2A9-Kodierungssequenz entsprechen oder dazu komplementär sind, vorzugsweise in isolierter Form, einschließlich Polynukleotide, die ein 84P2A9-Protein und Fragmente davon kodieren, DNA, RNA, DNA/RNA-Hybride und verwandte Moleküle, Polynukleotide oder Oligonukleotide, die zu einem 84P2A9-Gen oder einer mRNA-Sequenz oder einem Teil davon komplementär sind, und Polynukleotide oder Oligonukleotide, die mit einem 84P2A9-Gen, mit 84P2A9-mRNA oder einem 84P2A9-kodierenden Polynukleotid (kollektiv „84P2A9-Polynukleotide“) hybridisieren.

[0058] Bei einer Ausführungsform eines 84P2A9-Polynukleotids handelt es sich um ein 84P2A9-Polynukleotid, das die in SEQ ID Nr.: 1 gezeigte Sequenz aufweist. Ein 84P2A9-Polynukleotid kann ein Polynukleotid mit der Nukleotidsequenz des humanen 84P2A9 wie in SEQ ID Nr.: 1 gezeigt aufweisen, wobei T auch U sein kann, ein Polynukleotid, welches das gesamte 84P2A9-Protein oder einen Teil davon kodiert, eine zu den vorstehenden komplementäre Sequenz oder ein Polynukleotidfragment eines der vorstehenden aufweisen. Eine weitere Ausführungsform weist ein Polynukleotid mit der in SEQ ID Nr.: 1 gezeigten Sequenz von Nukleotidrest-Nummer 163 bis Nukleotidrest-Nummer 1674 oder von Rest-Nummer 718 bis Rest-Nummer 1390 auf, wobei T auch U sein kann. Eine weitere Ausführungsform weist ein Polynukleotid auf, welches ein 84P2A9-Polypeptid kodiert, dessen Sequenz von der in dem Plasmid enthaltenen cDNA kodiert wird, das bei der American Type Culture Collection unter der Zugangsnummer PTA-1151 abgelegt ist.

[0059] Eine weitere Ausführungsform umfasst ein Polynukleotid, das unter stringenten Bedingungen an die cDNA des menschlichen 84P2A9, gezeigt in SEQ ID Nr. 1, oder an ein Polynukleotidfragment davon binden kann. Typische Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung umfassen 84P2A9-Polynukleotide, die spezifische Teile der Sequenz der 84P2A9-mRNA (und solche, die zu solchen Sequenzen komplementär sind) kodieren, beispielsweise solche, die das Protein und Fragmente davon kodieren, beispielsweise aus 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 oder mehr kontigen Aminosäuren. Repräsentative Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung umfassen beispielsweise: Polynukleotide, die etwa Aminosäure-Position 1 bis etwa Aminosäure 10 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins (SEQ ID Nr.: 2) kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 10 bis etwa Aminosäure 20 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 20 bis etwa Aminosäure 30 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 30 bis etwa Aminosäure 40 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 40 bis etwa Aminosäure 50 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 50 bis etwa Aminosäure 60 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 60 bis etwa Aminosäure 70 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 70 bis etwa Aminosäure 80 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 80 bis etwa Aminosäure 90 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, Polynukleotide, die etwa Aminosäure 90 bis etwa Aminosäure 100 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins kodieren, etc. Nach diesem Schema sind Polynukleotide (aus mindestens 10 Nukleotiden), die Teile der Aminosäuresequenz von Aminosäure 100-504 des 84P2A9-Proteins kodieren, typische Ausführungsformen der Erfindung.

[0060] Es sind auch Polynukleotide berücksichtigt, die größere Teile des 84P2A9-Proteins kodieren. Beispielsweise lassen sich Polynukleotide, die etwa Aminosäure 1 (oder 20 oder 30 oder 40, etc.) bis etwa Aminosäure 20 (oder 30 oder 40 oder 50 etc.) des 84P2A9-Proteins kodieren, durch vielerlei, aus dem Stand der Technik bekannte Techniken herstellen. Eine veranschaulichende Ausführungsform eines solchen Polynukleotids umfasst ein Polynukleotid mit der in **Fig. 2** gezeigten Sequenz von Nukleotidrest-Nummer 718 bis Nukleotidrest-Nummer 1390.

[0061] Weitere veranschaulichende Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung umfassen 84P2A9-Polynukleotidfragmente, die mindestens eines der in der 84P2A9-Proteinsequenz enthaltenen biologischen Motive kodieren. In einer Ausführungsform kodieren typische Polynukleotidfragmente der Erfindung mindestens eine der hierin beschriebenen Kernlokalisierungssequenzen. In einer anderen Ausführungsform

können typische Polynukleotidfragmente der Erfindung mindestens eine der Regionen von 84P2A9 kodieren, die Homologie zu LUCA15 und/oder KIAA1152 und/oder dem Lungenkrebsantigen NY-Lu-121 (AF 042857) aufweisen, das Zinkfinger- und RNA-Bindungsmotive umfasst (siehe z. B. Gure et al., *Cancer Res.* 58(5): 1034–1041 (1998)). In einer anderen Ausführungsform der Erfindung können typische Polynukleotidfragmente der Erfindung mindestens eine der N-Glykosylierungsstellen, cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen, Caseinkinase-II-Phosphorylierungsstellen oder N-Myristoylierungsstellen und Amidierungsstellen von 84P2A9 kodieren, wie ausführlicher in der hierin enthaltenen Erläuterung des 84P2A9-Proteins und der 84P2A9-Polypeptide beschrieben ist. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können typischer Polynukleotidfragmente Sequenzen kodieren, die nur in mindestens einer alternativen Splice-Variante von 84P2A9 vorkommen, beispielsweise in der Splice-Variante, die das Transkript mit 4,5 KB hervorbringt, welches in den in **Fig. 4** gezeigten Prostatakarzinomen überexprimiert ist.

[0062] Die Polynukleotide der vorhergehenden Absätze finden eine Reihe unterschiedlicher spezifischer Verwendungen. Da das 84P2A9-Gen auf Chromosom 1 q32.3 liegt, werden Polynukleotide, die verschiedene Regionen des 84P2A9-Proteins kodieren, beispielsweise verwendet, um zytogenetische Anomalien auf Chromosom 1, Bande q32, zu charakterisieren, die als in Verbindung mit verschiedenen Krebserkrankung stehend identifiziert wurden. Insbesondere wurden verschiedene chromosomale Anomalien in 1q32, einschließlich Translokationen und Deletionen, bei einer Reihe unterschiedlicher Karzinome als häufige zytogenetische Anomalien identifiziert (siehe z. B. Bieche et al., *Genes Chromosomes Cancer*, 24(3): 255–263 (1999); Gorunova et al., *Genes Chromosomes Cancer*, 26(4): 312–321 (1999); Reid et al., *Cancer Res.* (22): 5415–5423 (1995)). Polynukleotide, die spezifische Regionen des 84P2A9-Proteins kodieren, stellen daher neue Hilfsmittel dar, die verwendet werden können, um die besondere Art der zytogenetischen Anomalien in dieser Region von Chromosom 1, die zu dem malignen Phänotyp beitragen könnten, mit größerer Präzision, als zuvor möglich war, zu beschreiben. In diesem Kontext erfüllen diese Polynukleotide einen Bedarf im Stand der Technik zur Steigerung der Empfindlichkeit der chromosomalen Untersuchung, um subtilere und weniger häufige chromosomale Anomalien zu identifizieren (siehe z. B. Evans et al., *Am. J. Obstet. Gynecol.* 171(4): 1055–1057 (1994)).

[0063] Da sich herausgestellt hat, dass 84P2A9 beim Prostatakarzinom stark exprimiert ist (**Fig. 4**), können diese Polynukleotide darüber hinaus in Verfahren eingesetzt werden, in denen der Status von 84P2A9-Genprodukten in normalem im Vergleich zu karzinogenem Gewebe bestimmt wird. Typischerweise können Polynukleotide, die spezifische Regionen des 84P2A9-Proteins kodieren, verwendet werden, um das Vorhandensein von Perturbationen (wie beispielsweise Deletionen, Insertionen, Punktmutationen oder Veränderungen, die zu einem Verlust eines Antigens führen, etc.) in spezifischen Regionen der Genprodukte von 84P2A9 (beispielsweise Regionen, die ein Kernlokalisierungssignal enthalten) zu bestimmen. Beispielhafte Tests umfassen RT-PCR-Tests sowie die Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (SSCP) (siehe z. B. Marrogi et al., *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369–378 (1999)), die beide Polynukleotide verwenden, die spezifische Regionen eines Proteins kodieren, um diese Regionen in dem Protein zu untersuchen.

[0064] Andere, spezifisch in Betracht gezogene, hierin beschriebene Ausführungsformen in Verbindung mit Nukleinsäuren sind genomische DNA, cDNAs, Ribozyme und Antisense-Moleküle, sowie Nukleinsäuremoleküle, die auf einem Alternativgerüst basieren oder alternative Basen aufweisen, ob natürlicher Herkunft oder synthetisiert. Beispielsweise können Antisense-Moleküle RNAs oder andere Moleküle sein, einschließlich Peptidnukleinsäuren (PNAs) oder Nichtnukleinsäuremoleküle, wie beispielsweise Phosphorthioratderivate, die DNA oder RNA in Basenpaar-abhängiger Weise spezifisch binden. Ein Fachmann kann diese Klassen von Nukleinsäuremolekülen durch Verwendung der hierin beschriebenen 84P2A9-Polynukleotid- und -Polynukleotidsequenzen leicht erhalten.

[0065] Die Antisense-Technologie umfasst die Verabreichung exogener Oligonukleotide, die an ein sich in den Zellen befindendes Zielpolynukleotid binden. Der Begriff „Antisense“ bezieht sich auf die Tatsache, dass solche Oligonukleotide zu ihren intrazellulären Zielen komplementär sind, z. B. zu 84P2A9. Siehe beispielsweise Jack Cohen, *Oligodeoxynukleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression*, CRC Press, 1989; und *Synthesis* 1: 1–5 (1988). Die 84P2A9-Antisense-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung umfassen Derivate wie beispielsweise S-Oligonukleotide (Phosphorthioatderivate oder S-Oligos, siehe Jack Cohen, oben), die verstärkte Hemmwirkung auf das Wachstum von Krebszellen ausüben. S-Oligos (Nukleosidphosphorthioate) sind isoelektronische Analoge eines Oligonukleotids (O-Oligo), bei denen ein nicht Brücken bildendes Sauerstoffatom der Phosphatgruppe durch ein Schwefelatom ersetzt ist. Die S-Oligos der vorliegenden Erfindung können durch Behandlung der entsprechenden O-Oligos mit 3H-1,2-Benzodithiol-3-on-1,1-dioxid, einem Schwefelübertragungsreagens, hergestellt werden. Siehe Iyer, R. P. et al., *J. Org. Chem.* 55: 4693–4698 (1990); und Iyer, R. P. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 112: 1253–1254 (1990). Weitere 84P2A9-Antisense-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung umfassen aus dem Stand der Technik bekannte Morpholino-Antisense-Oli-

gonukleotide (siehe z. B. Partridge et al., 1996, *Antisense & Nucleic Acid Drug Development* 6: 169–175).

[0066] Die 84P2A9-Antisense-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung können typischerweise RNA oder DNA sein, die zu den ersten 100 N-terminalen Codons oder den letzten 100 C-terminalen Codons der genomischen Sequenz von 84P2A9 oder der entsprechenden mRNA komplementär sind oder damit stabil hybridisieren. Absolute Komplementarität ist keine Voraussetzung, obgleich ein hoher Komplementaritätsgrad bevorzugt ist. Die Verwendung eines Oligonukleotids, das zu dieser Region komplementär ist, ermöglicht die selektive Hybridisierung mit 84P2A9-mRNA und nicht an mRNA, die andere regulatorische Untereinheiten der Proteinkinase spezifiziert. In einer Ausführungsform sind die 84P2A9-Antisense-Oligonukleotide der vorliegenden Erfindung 15- bis 30-mer-Fragmente des DNA-Antisense-Moleküls, die eine Sequenz aufweisen, die mit 84P2A9-mRNA hybridisiert. Gegebenenfalls ist das 84P2A9-Antisense-Oligonukleotid ein 30-mer-Oligonukleotid, das zu einer Region in den ersten 10 N-terminalen Codons oder den letzten 10 C-terminalen Codons von 84P2A9 komplementär ist. Alternativ sind die Antisense-Moleküle modifiziert, um Ribozyme bei der Hemmung der Expression von 84P2A9 anzuwenden. L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; *Trends Genet* 12: 510–515 (1996).

[0067] Weitere spezifische Ausführungsformen dieses Aspektes der Erfindung umfassen Primer und Primerpaare, welche die spezifische Amplifizierung der erfindungsgemäßen Polynukleotide oder spezifischer Teile davon ermöglichen, und Sonden, die selektiv oder spezifisch mit erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen oder einem beliebigen Teil davon hybridisieren. Sonden können mit einem detektierbaren Marker, wie beispielsweise einem Radioisotop, einer Fluoreszenzverbindung, einer Biolumineszenzverbindung, einer Chemilumineszenzverbindung, einem Metallchelatlagerer oder einem Enzym, gelabelt sein. Solche Sonden und Primer können verwendet werden, um das Vorhandensein eines 84P2A9-Polynukleotids in einer Probe festzustellen, sowie als Mittel zum Detektieren einer Zelle, die ein 84P2A9-Protein exprimiert.

[0068] Beispiele solcher Sonden umfassen Polypeptide, welche die ganze oder einen Teil der cDNA-Sequenzen von humanem 84P2A9, gezeigt in **Fig. 2**, aufweisen. In den folgenden Beispielen sind auch Beispiele von Primer-Paaren beschrieben, die 84P2A9-mRNAs spezifisch amplifizieren können. Wie ein Fachmann weiß, können ausgehend von den hierin bereit gestellten Sequenzen viele verschiedene Primer und Sonden hergestellt und effektiv zur Amplifizierung und/oder zum Feststellen einer 84P2A9-mRNA verwendet werden.

[0069] Die erfindungsgemäßen 84P2A9-Polynukleotide sind für unterschiedliche Zwecke geeignet, einschließlich unter anderem als Sonden und Primer für die Amplifizierung und/oder die Feststellung des 84P2A9-Gens bzw. der 84P2A9-Gene, -mRNAs oder Fragmenten davon; als Reagenzien für die Diagnose und/oder Prognose von Prostatakrebs und anderen Krebserkrankungen; als Kodierungssequenzen, welche die Expression von 84P2A9-Polypeptiden steuern; als Hilfsmittel zum Modulieren oder Hemmen der Expression des 84P2A9-Gens bzw. der 84P2A9-Gene und/oder der Translation des 84P2A9-Transkripts bzw. der 84P2A9-Transkripte; und als therapeutische Mittel.

ISOLIERUNG VON 84P2A9 KODIERENDEN NUKLEINSÄUREMOLEKÜLEN

[0070] Die hierin beschriebenen 84P2A9-cDNA-Sequenzen ermöglichen die Isolierung anderer Polynukleotide, welche eines oder mehrere 84P2A9-Genprodukte kodieren, sowie die Isolierung von Polynukleotiden, die Homologe von 84P2A9-Genprodukten, alternativ gesplice Isoformen, Allelvarianten und mutierte Formen des 84P2A9-Genprodukts kodieren. Es sind verschiedene molekulare Klonierungsverfahren wohl bekannt, die zur Isolierung von 84P2A9-Gen kodierenden Vollängen-cDNAs eingesetzt werden können (siehe beispielsweise Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Press, New York: 1989; *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel et al., Hrsg. Wiley and Sons, 1995). Beispielsweise können unter Verwendung von handelsüblichen Klonierungssystemen Lambda-Phage-Klonierungsverfahren geeignet angewandt werden (z. B. Lambda ZAP Express, Stratagene). Phagenklone, die cDNAs des 84P2A9-Gens enthalten, lassen sich mit einer gelabelten, als Sonde eingesetzten 84P2A9-cDNA oder einem Fragment davon identifizieren. Beispielsweise können in einer Ausführungsform die 84P2A9-cDNA (**Fig. 2**) oder ein Teil davon synthetisiert und als Sonde verwendet werden, um überlappende cDNAs und Vollängen cDNAs zu erhalten, welche einem 84P2A9-Gen entsprechen. Das 84P2A9-Gen selbst kann durch Durchsuchen von Bibliotheken genomischer DNA, Bibliotheken bakterieller artifizieller Chromosomen (BACS), Bibliotheken artifizieller Hefechromosomen (YACs) und dergleichen mit 84P2A9-DNA-Sonden oder -Primern isoliert werden.

[0071] Die Erfindung stellt außerdem rekombinante DNA- oder RNA-Moleküle bereit, welche ein 84P2A9-Polynukleotid oder ein Fragment oder Analog oder Homolog davon enthalten, einschließlich unter anderem Phagen, Plasmide, Phagemide, Cosmide, YACs, BACs sowie verschiedene virale und nicht-virale Vektoren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind, und Zellen, die mit solchen rekombinanten DNA- oder RNA-Molekülen transformiert oder transfiziert sind. Verfahren zum Herstellen solcher Moleküle sind wohlbekannt (siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989, oben).

[0072] Die Erfindung stellt des Weiteren ein Wirt-Vektor-System bereit, welches ein rekombinantes DNA-Molekül aufweist, das ein 84P2A9-Polynukleotid oder -Fragment oder -Analog oder -Homolog davon in einer geeigneten prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtszelle enthält. Beispiele geeigneter eukaryotischer Wirtszellen umfassen eine Hefezelle, eine Pflanzenzelle oder eine Tierzelle, wie beispielsweise eine Säugerzelle oder eine Insektenzelle (z. B. eine Bakulovirus-infizierbare Zelle wie beispielsweise eine SF9- oder HighFive-Zelle). Beispiele geeigneter Säugerzellen umfassen verschiedene Prostatakarzinom-Zelllinien wie beispielsweise DU145 und TsuPr1, andere transfizierbare oder transduzierbare Prostatakarzinom-Zelllinien sowie eine Reihe von Säugerzellen, die routinemäßig für die Expression rekombinanter Proteine verwendet werden (z. B. COS, CHO, 293, 293T-Zellen). Spezieller kann ein Polynukleotid, umfassend die Kodierungssequenz von 84P2A9, oder ein Fragment oder Analog oder Homolog davon zur Herstellung von 84P2A9-Proteinen oder Fragmenten davon verwendet werden, wobei eine beliebige Anzahl von Wirt-Vektor-Systemen eingesetzt wird, die im Stand der Technik routinemäßig eingesetzt und auf breiter Basis bekannt sind.

[0073] Es steht ein breites Spektrum an Wirt-Vektor-Systemen zur Verfügung, die für die Expression von 84P2A9-Proteinen oder Fragmenten davon geeignet sind, siehe beispielsweise Sambrook et al., 1989, oben; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, oben). Bevorzugte Vektoren für die Säuger-Expression umfassen unter anderem pcDNA3.1 myc-His-tag (Invitrogen) und der retrovirale Vektor pSRatkneo (Muller et al., 1991, MCB 11: 1785). Wenn diese Expressionsvektoren verwendet werden, kann 84P2A9 in mehreren Prostatakarzinom-Zelllinien und Nicht-Prostata-Zelllinien exprimiert werden, einschließlich beispielsweise 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 und TsuPr1. Die erfindungsgemäßen Wirt-Vektor-Systeme sind für die Produktion eines 84P2A9-Proteins oder dessen Fragment geeignet. Solche Wirt-Vektor-Systeme können verwendet werden, um die funktionellen Eigenschaften von 84P2A9 und 84P2A9-Mutationen oder -Analoge zu untersuchen.

[0074] Rekombinantes humanes 84P2A9-Protein oder ein dessen Analog oder Homolog oder Fragment kann von Säugerzellen produziert werden, die mit einem Konstrukt transfiziert sind, welches 84P2A9 kodiert. Beispielsweise können in einer in den Beispielen beschriebenen veranschaulichenden Ausführungsform 293T-Zellen mit einem Expressionsplasmid transfiziert werden, das 84P2A9 oder ein Fragment, Analog oder Homolog davon kodiert, das 84P2A9- oder ein verwandtes Protein wird in den 293T-Zellen exprimiert, und das rekombinante 84P2A9-Protein wird mit Hilfe von Standardreinigungsverfahren (z. B. Affinitätsreinigung mit Hilfe von Anti-84P2A9-Antikörpern) isoliert. In einer anderen Ausführungsform wird eine 84P2A9-Kodierungssequenz in den retroviralen Vektor pSRaMSVtkneo subkloniert und verwendet, um verschiedene Säuger-Zelllinien zu infizieren, wie beispielsweise NIH 3T3, TsuPr1, 293 und rat-1, um 84P2A9-exprimierende Zelllinien zu erhalten. Es können auch verschiedene andere, aus dem Stand der Technik wohlbekannte Expressionssysteme verwendet werden. Für die Herstellung einer sezernierten Form des rekombinanten 84P2A9-Proteins können Expressionskonstrukte verwendet werden, die ein Leader-Peptid kodieren, welches im Leseraster mit der 84P2A9-Kodierungssequenz verbunden ist.

[0075] Proteine, die von den 84P2A9-Genen oder von Analogenen oder Homologen oder Fragmenten davon kodiert werden, können auf verschiedene Weise eingesetzt werden, einschließlich unter anderem zur Erzeugung von Antikörpern und bei Verfahren zur Identifizierung von Liganden und anderen Substanzen und Zellbestandteilen, die an ein 84P2A9-Genprodukt binden. Gegen ein 84P2A9-Protein oder ein Fragment davon erzeugte Antikörper könnten bei diagnostischen und prognostischen Tests Anwendung finden, wie auch bei Bildgebungsverfahren bei der Behandlung von Krebserkrankungen beim Menschen, die von einer Expression des 84P2A9-Proteins gekennzeichnet sind, einschließlich unter anderem bei Karzinomen der Prostata und der Hoden. Solche Antikörper können intrazellulär exprimiert und bei Verfahren des Behandeln von Patienten mit solchen Karzinomen verwendet werden. Es kommen verschiedene immunologische Tests in Betracht, die für den Nachweis von 84P2A9-Proteinen geeignet sind, einschließlich unter anderem verschiedenen Arten von Radioimmunassays, ELISA (Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay), ELIFA (Enzyme-linked-Immunofluorescent-Assay), immunzytochemische Verfahren und dergleichen. Solche Antikörper können gelabelt und als immunologische Bildgebungsreagenzien eingesetzt werden, mit denen sich Zellen nachweisen lassen, die 84P2A9 exprimieren (z. B. im Rahmen radioszintigraphischer Bildgebungsverfahren). 84P2A9-Proteine können

ten auch insbesondere bei der Herstellung von Krebsimpfstoffen nützlich sein, wie unten weiter ausgeführt ist.

84P2A9-POLYPEPTIDE

[0076] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung stellt mit 84P2A9 verwandte Proteine und Polypeptidfragmente davon bereit. Spezifische Ausführungsformen von 84P2A9-Proteinen umfassen ein Polypeptid, das die ganze oder einen Teil der Aminosäuresequenz von humanem 84P2A9 aufweist, wie gezeigt in **Fig. 2**. Alternativ umfassen Ausführungsformen von 84P2A9-Proteinen Polypeptidvarianten, die Änderungen der Aminosäuresequenz des humanen 84P2A9, gezeigt in **Fig. 2**, aufweisen.

[0077] Im Allgemeinen teilen natürlich vorkommende Allelvarianten des humanen 84P2A9 ein hohes Maß an struktureller Identität und Homologie (z. B. eine Homologie von mindestens 90%). Typischerweise enthalten Allelvarianten der mit 84P2A9 verwandten Proteine konservative Aminosäuresubstitutionen in den hierin beschriebenen 84P2A9-Sequenzen oder eine Substitution einer Aminosäure aus einer korrespondierenden Position in einem Homolog von 84P2A9. Eine Klasse von 84P2A9-Allelvarianten sind Proteine, die einen hohen Grad an Homologie mit mindestens einer kleinen Region einer bestimmten 84P2A9-Aminosäuresequenz teilen, aber darüber hinaus eine radikale Abweichung von der Sequenz enthalten, wie beispielsweise eine nicht-konservative Substitution, Trunkierung, Insertion oder eine Leserasterverschiebung. Bei Vergleichen von Proteinsequenzen haben die Begriffe „Ähnlichkeit“, „Identität“ und „Homologie“ jeweils eine gesonderte Bedeutung. Darüber hinaus können Orthologie und Paralogie wichtige Konzepte sein, welche die Beziehung von Mitgliedern einer bestimmten Proteinfamilie in einem Organismus zu den Mitgliedern derselben Familie in anderen Organismen beschreiben.

[0078] In einem Protein können häufig konservative Aminosäuresubstitutionen vorgenommen werden, ohne die Konformation oder die Funktion des Proteins zu verändern. Solche Änderungen umfassen die Substitution von Isoleucin (I), Valin (V) und Leucin (L) durch eine andere dieser hydrophoben Aminosäuren; Asparaginsäure (D) durch Glutaminsäure (E) und umgekehrt; Glutamin (Q) durch Asparagin (N) und umgekehrt; und Serin (S) durch Threonin (T) und umgekehrt. Andere Substitutionen können auch als konservativ betrachtet werden, je nach der Umgebung der jeweiligen Aminosäure und ihrer Rolle in der dreidimensionalen Struktur des Proteins. Beispielsweise sind Glycin (G) und Alanin (H) häufig untereinander austauschbar, genauso wie Alanin (A) und Valin (V). Methionin (M), das relativ hydrophob ist, kann häufig für Leucin und Isoleucin und bisweilen für Valin ausgetauscht werden. Lysin (K) und Arginin (R) sind häufig an Stellen untereinander austauschbar, an denen das wesentliche Merkmal des Aminosäurerestes seine Ladung ist und die unterschiedlichen pK-Werte dieser beiden Aminosäurereste unerheblich sind. In bestimmten Umgebungen können noch andere Austausche als „konservativ“ betrachtet werden (siehe z. B. die Tabelle 2 hierin; Seite 13–15 „Biochemistry“ 2. Auflage, Lubert Stryer Hrsg. (Stanford University); Henikoff et al., PNAS 1992 Vol. 89, 10915–10919; Lei et al., J Biol Chem 1995, May 19; 270(20): 11882–6).

[0079] Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung umfassen ein breites Spektrum an im Stand der Technik anerkannten 84P2A9-Proteinvarianten, wie beispielsweise Polypeptide, die Aminosäureinsertionen, -deletionen und -substitutionen aufweisen. 84P2A9-Varianten können mit Hilfe von aus dem Stand der Technik bekannten Verfahren wie beispielsweise durch positionsgerichtete Mutagenese, Alaninscanning und PCR-Mutagenese hergestellt werden. Mit der klonierten DNA können positionsgerichtete Mutagenese (Carter et al., Nucl. Acids Res., 13: 4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10: 6487 (1987)), Kassettenmutagenese (Wells et al., Gene, 34: 315 (1985)), Restriktionsselektionsmutagenese (Wells et al., Philos. Trans. R. Soc. London Ser A, 317: 415 (1986)) oder andere bekannte Techniken durchgeführt werden, um die 84P2A9-DNA-Variante herzustellen.

[0080] Um mindestens eine Aminosäure entlang einer kontigen Sequenz zu identifizieren, die an einer bestimmten biologischen Aktivität beteiligt ist, wie beispielsweise an einer Protein-Protein-Interaktion, kann auch eine Scanning-Aminosäureanalyse verwendet werden. Die bevorzugten Scanning-Aminosäuren umfassen relativ kleine, neutrale Aminosäuren. Solche Aminosäuren umfassen Alanin, Glycin, Serin und Cystein. In dieser Gruppe ist Alanin typischerweise eine bevorzugte Scanning-Aminosäure, da es die Seitenkette jenseits des Beta-Kohlenstoffes eliminiert und weniger dazu neigt, die Hauptkettenkonformation der Variante zu verändern. Alanin wird außerdem typischerweise bevorzugt, da es sich hierbei um die häufigste Aminosäure handelt. Darüber hinaus kommt sie häufig sowohl in versteckter (buried) als auch in exponierter Position vor (Creighton, The Proteins, (W. H. Freeman & Co., N. Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150: 1 (1976)). Wenn eine Alaninsubstitution keine adäquaten Mengen einer Variante ergibt, kann eine isosterische Aminosäure verwendet werden.

[0081] Wie hierin definiert, haben 84P2A9-Varianten, -Analoge oder -Homologe das Unterscheidungsmerk-

mal, mindestens ein gemeinsames Epitop mit einem 84P2A9-Protein mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 2 aufzuweisen, so dass ein Antikörper oder eine T-Zelle, die spezifisch an eine 84P2A9-Variante binden, auch spezifisch an das 84P2A9-Protein mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 2 binden. Ein Polypeptid ist keine Variante des in SEQ ID Nr.: 2 gezeigten Proteins mehr, wenn es kein Epitop mehr aufweist, das von einem Antikörper oder eine T-Zelle erkannt werden kann, die spezifisch an das 84P2A9-Protein binden. Ein Fachmann weiß, dass Antikörper, die Proteine erkennen, an Epitope verschiedener Größe binden, und eine Gruppierung in der Größenordnung von etwa vier oder fünf Aminosäuren, ob kontig oder nicht, gilt als typische Anzahl von Aminosäuren in einem Minimalepitop. Siehe z. B. 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. Eine andere Klasse von mit 84P2A9 verwandten Proteinvarianten teilt eine Ähnlichkeit von 90% oder mehr mit der Aminosäuresequenz von SEQ ID Nr.: 2 oder einem Fragment davon. Eine andere spezifische Klasse von 84P2A9-Proteinvariante oder -Analogen umfasst mindestens eines der unten beschriebenen oder aus dem derzeitigen Stand der Technik bekannten biologischen Motive von 84P2A9. Die vorliegende Erfindung umfasst daher auch Analoge von 84P2A9-Fragmenten (Nuklein- oder Aminosäure) mit veränderten funktionellen (z. B. immunogenen) Eigenschaften relativ zum Ausgangsfragment. Es versteht sich, dass auf die Nuklein- oder Aminosäuresequenzen von **Fig. 2** Motive anzuwenden sind, die jetzt oder in Zukunft zum Stand der Technik gehören.

[0082] Wie hierin erläutert, umfassen Ausführungsformen der beanspruchten Erfindung Polypeptide, die eine kürzere Sequenz als die 504 Aminosäuren des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins aufweisen. Beispielsweise können repräsentative Ausführungsformen der Erfindung Peptide/Proteine umfassen, die beliebige 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 oder mehr kontig Aminosäuren des in **Fig. 2** (SEQ ID Nr.: 2) gezeigten 84P2A9-Proteins aufweisen. Darüber hinaus umfassen stellvertretende Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 1 bis etwa Aminosäure 10 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 10 bis etwa Aminosäure 20 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 20 bis etwa Aminosäure 30 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 30 bis etwa Aminosäure 40 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 40 bis etwa Aminosäure 50 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 50 bis etwa Aminosäure 60 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 60 bis etwa Aminosäure 70 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 70 bis etwa Aminosäure 80 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 80 bis etwa Aminosäure 90 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, Polypeptide, die aus etwa Aminosäure 90 bis etwa Aminosäure 100 des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen, etc. über die gesamte 84P2A9-Sequenz hinweg. Nach diesem Schema sind Polypeptide, die aus Teilen der Aminosäuresequenz von Aminosäure 100–504 des 84P2A9-Proteins bestehen, typische Ausführungsformen der Erfindung. Polypeptide, die aus längeren Teilen des 84P2A9-Proteins bestehen, sind ebenfalls berücksichtigt. Beispielsweise lassen sich mit verschiedenen, aus dem Stand der Technik wohl bekannten Techniken Polypeptide herstellen, die aus etwa Aminosäure 1 (oder 20 oder 30 oder 40 etc.) bis etwa Aminosäure 20 (oder 30 oder 40 oder 50 etc.) des in **Fig. 2** gezeigten 84P2A9-Proteins bestehen. Es versteht sich, dass sich die Start- und Stopp-Positionen in diesem Absatz auf die spezifizierten Positionen sowie auf die Position plus oder minus 5 Reste beziehen.

[0083] Weitere veranschaulichende Ausführungsformen der hierin beschriebenen Erfindung umfassen mit 84P2A9 verwandte Proteine, welche die Aminosäurereste mindestens eines der in der in **Fig. 2** gezeigten Sequenz des mit 84P2A9 verwandten Proteins enthaltenen biologischen Motive enthalten. In einer Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der Kernlokalisierungssequenzen von 84P2A9 auf, wie beispielsweise RKRR der Reste 42–45 von SEQ ID Nr.: 2, RKRR der Reste 47–50 von SEQ ID Nr.: 2, KRRP der Reste 101–104 von SEQ ID Nr.: 2, RRRRRK der Reste 135–139 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder KKRK der Reste 186–189 von SEQ ID Nr.: 2. In einer anderen Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der N-Glykosylierungsstellen von 84P2A9 auf, wie beispielsweise NRTL der Reste 131–134 of SEQ ID Nr.: 2, NQTN der Reste 212–215 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder NCSV der Reste 394–397 von SEQ ID Nr.: 2. In einer anderen Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der Regionen von 84P2A9 auf, die zu LUCA15 und/oder KIAA1152 homolog sind. In einer anderen Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der cAMP- und cGMP-abhängigen Proteinkinase-Phosphorylierungsstellen von 84P2A9 auf, wie beispielsweise KRRS der Reste 48–51 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder RRPS der Reste 102–105 von SEQ ID Nr.: 2. In einer anderen Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der Proteinkinase-C-Phosphorylierungsstellen von 84P2A9 auf, wie beispielsweise TLR der Reste 133–135 von SEQ ID Nr.: 2, SNK der Reste 152–154 von SEQ ID Nr.: 2, SDR der Reste 171–173 von SEQ ID Nr.: 2, TNK der Reste 214–216 von SEQ ID Nr.: 2, SRR der Reste 313–315 von SEQ ID

Nr.: 2, SSK der Reste 328–330 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder SVR der Reste 396–398 von SEQ ID Nr.: 2. In einer weiteren Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der Caseinkinase-II-Phosphorylierungsstellen von 84P2A9 auf, wie beispielsweise SALE der Reste 10–13 von SEQ ID Nr.: 2, SSLE der Reste 70–73 von SEQ ID Nr.: 2, SLEE der Reste 71–74 von SEQ ID Nr.: 2, SDSD der Reste 91–94 von SEQ ID Nr.: 2, TNKD der Reste 214–217 von SEQ ID Nr.: 2, SESD der Reste 232–235 von SEQ ID Nr.: 2, SSTD der Reste 240–243 von SEQ ID Nr.: 2, TNDE der Reste 248–251 von SEQ ID Nr.: 2, TELD der Reste 287–290 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder TEHD der Reste 374–377 von SEQ ID Nr.: 2. In einer weiteren Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine der N-Myristoylierungsstellen auf, wie beispielsweise GSDSSL der Reste 67–72 von SEQ ID Nr.: 2, GLFTND der Reste 245–250 von SEQ ID Nr.: 2, GGACGI der Reste 269–274 von SEQ ID Nr.: 2, GGTPTS der Reste 336–341 von SEQ ID Nr.: 2, GTPTSM der Reste 337–342 von SEQ ID Nr.: 2, GSLCTG der Reste 409–414 von SEQ ID Nr.: 2, GSGLGR der Reste 459–464 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder GLGLGF der Reste 481–486 von SEQ ID Nr.: 2. In einer weiteren Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eine Amidierungsstelle auf, wie beispielsweise RGRK der Reste 45–48 von SEQ ID Nr.: 2 und/oder RGKR der Reste 113–116 von SEQ ID Nr.: 2. Eine veranschaulichende Ausführungsform eines solchen Polypeptids umfasst mindestens zwei Aminosäuresequenzen, die aus der Gruppe ausgewählt sind, die aus KKRK, NQTN, NCSV, TNK, SRR, SSK, SVR, GLFTND, GGACGI, GGTPTS, GTPTSM und GSLCTG besteht (wie oben in SEQ ID Nr.: 2 identifiziert). In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Polypeptid drei oder vier oder fünf oder sechs oder mehr Aminosäuresequenzen KKRK, NQTN, NCSV, TNK, SRR, SSK, SVR, GLFTND, GGACGI, GGTPTS, GTPTSM und GSLCTG auf (wie oben in SEQ ID Nr.: 2 identifiziert).

[0084] In einer anderen Ausführungsform weisen erfindungsgemäße Proteine mindestens eines der immunreaktiven Epitope auf, die anhand eines hierin beschriebenen Verfahrens identifiziert wurden, beispielsweise die in Tabelle 1 gezeigten. Verfahren zum Identifizieren von Peptiden und Analogen mit Affinität für HLA-Moleküle, die mit immunogenen Epitopen korrelieren, sind aus dem Stand der Technik wohlbekannt. Beschrieben sind auch Prinzipien für die Herstellung von Analogen solcher Epitope zur Modulierung der Immunogenität. Für die Identifizierung solcher Moleküle eignen sich verschiedene Bezugsverweise. Siehe beispielsweise WO 9733602 an Chestnut et al.; Sette, Immunogenetics 199950(3–4): 201–212; Sette et al., J. Immunol. 2001 166(2): 1389–1397; Alexander et al., Immunol. Res. 18(2): 79–92; Sidney et al., Hum. Immunol. 1997 58(1): 12–20; Kondo et al., Immunogenetics 199745(4): 249–258; Sidney et al., J. Immunol. 1996 157(8): 3480–90; und 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; Borras-Cuesta et al., Hum. Immunol. 2000 61(3): 266–278; Alexander et al., J. Immunol. 2000 164(3): 164(3): 1625–1633; Alexander et al., PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan et al., J. Immunol. 1991 147(8): 26632669; Alexander et al., Immunity 1994 1(9): 751–761 und Alexander et al., Immunol. Res. 1998 18(2): 79–92. Die Offenbarungen dieser Veröffentlichung sind hierin in Gänze durch Bezugnahme enthalten.

[0085] Verwandte Ausführungsformen der Erfindung umfassen Polypeptide, die Kombinationen der hierin erläuterten verschiedenen Motive enthalten, wobei bestimmte Ausführungsformen weder in den Motiven noch in den Zwischensequenzen dieser Polypeptide Insertionen, Deletionen oder Substitutionen enthalten. Darüber hinaus sind ggf. Ausführungsformen erwünscht, die auf jeder Seite dieser Motive eine Reihe von N-terminalen und/oder C-terminalen Aminosäureresten aufweisen (um beispielsweise einen größeren Teil der Polypeptidarchitektur einzuschließen, in welcher sich das Motiv befindet). Die Anzahl der N-terminalen und/oder C-terminalen Aminosäurereste auf jeder Seite eines Motivs beträgt typischerweise etwa 1 bis etwa 100 Aminosäurereste, vorzugsweise 5 bis etwa 50 Aminosäurereste.

[0086] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung weisen erfindungsgemäße Proteine Aminosäuresequenzen auf, die nur in mindestens einer alternativen Splice-Variante von 84P2A9 vorkommen, beispielsweise in der von dem 4,5-KB-Transkript kodierten Splice-Variante, die in Prostatakarzinomen überexprimiert wird und in **Fig. 4** gezeigt ist. Die Überwachung alternativer Splice-Varianten von 84P2A9 ist von Nutzen, weil Veränderungen im alternativen Splicing von Proteinen als einer der Schritte in einer Reihe von Ereignissen gelten, die zum Fortschreiten von Karzinomen führen (siehe z. B. Carstens et al., Oncogene 15(250): 3059–3065 (1997)). Die Überwachung alternativer Splice-Varianten von 84P2A9 stellt daher ein weiteres Mittel dar, um Syndrome zu untersuchen, die mit Perturbationen in Genprodukten von 84P2A9 einhergehen, beispielsweise bei Krebserkrankungen.

[0087] In Anbetracht der Beobachtung, dass die hierin erläuterten 84P2A9-Motive mit Wachstumsregulationsstörungen in Verbindung stehen und weil 84P2A9 in Karzinomen überexprimiert ist (**Fig. 4**), sind Polypeptide, die mindestens eines der hierin erörterten 84P2A9-Motive aufweisen, nützlich, um die spezifischen Kennzeichen eines malignen Phänotyps zu beleuchten. Beispielsweise sind die Caseinkinase II, die cAMP- und die

cCMP-abhängige Proteinkinase und Proteinkinase C Enzyme, die bekanntlich mit der Entwicklung des malignen Phänotyps in Zusammenhang stehen (siehe z. B. Chef 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) und O'Brian, *Oncol. Rep.* 5(2): 305–309 (1998)). Darüber hinaus sind sowohl Glykosylierung als auch Myristoylierung Proteinmodifikationen, die ebenfalls mit Krebs und dem Fortschreiten von Krebs in Zusammenhang stehen (siehe z. B. Dennis et al., *Biochem Biophys. Acta* 1473(1): 21–34 (1999); Raju et al., *Exp. Cell Res.* 235(1): 145–154 (1997). Auch die Amidierung ist eine Proteinmodifikation, die mit Krebs und dem Fortschreiten von Krebs in Zusammenhang steht (siehe z. B. Treston et al., *J. Natl. Cancer Inst Monogr.* (13): 169–175 (1992). Darüber hinaus wird angenommen, dass Kernlokalisierungssequenzen das maligne Potenzial einer Zelle beeinflussen (siehe z. B. Mirski et al., *Cancer Res.* 55(10): 2129–2134 (1995)).

[0088] Die erfindungsgemäßen Proteine finden eine Reihe unterschiedlicher spezifischer Anwendungen. Da 84P2A9 in Prostatakarzinomen stark exprimiert ist (**Fig. 4**), werden diese Peptide/Proteine in Verfahren eingesetzt, die den Status von 84P2A9-Genprodukten in normalem gegenüber kanzerösem Gewebe untersuchen, wodurch der maligne Phänotyp aufgeklärt wird. Typischerweise werden Polypeptide aus spezifischen Regionen des 84P2A9-Proteins verwendet, um das Vorhandensein von Perturbationen (wie beispielsweise Deletionen, Insertionen, Punktmutationen, etc.) in bestimmten Regionen (wie beispielsweise in Regionen, die ein Kernlokalisierungssignal enthalten) des 84P2A9-Genproduktes zu untersuchen. Exemplarische Assays verwenden Antikörper oder T-Zellen gegen mit 84P2A9 verwandte Proteine, welche die Aminosäurereste von mindestens einem der biologischen Motive aufweisen, die in der 84P2A9-Polypeptidsequenz enthalten sind, um die Kennzeichen dieser Region in normalem gegenüber kanzerösem Gewebe zu untersuchen. Alternativ werden 84P2A9-Polypeptide verwendet, welche die Aminosäurereste mindestens eines der biologischen Motive in dem 84P2A9-Protein enthalten, um nach Faktoren zu suchen, welche mit dieser Region von 84P2A9 interagieren.

[0089] Wie hierin erläutert, ermöglicht die Redundanz des genetischen Codes eine Variation der 84P2A9-Gensequenzen. Insbesondere erkennt ein Fachmann bestimmte Codonpräferenzen einer bestimmten Wirtart und kann die beschriebene Sequenz so, wie sie für einen gewünschten Wirt bevorzugt wird, anpassen. Beispielsweise sind in bevorzugten analogen Codonsequenzen seltene Codons (d. h. Codons mit einer Gebrauchshäufigkeit von weniger als etwa 20% in bekannten Sequenzen des gewünschten Wirts) typischerweise durch häufigere Codons ersetzt. Die Codonpräferenzen für eine bestimmte Spezies werden beispielsweise berechnet, indem Codonnutzungstabellen hinzugezogen werden, die im Internet zur Verfügung stehen, beispielsweise unter <http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>. Nukleotidsequenzen, die für eine bestimmte Wirtsspezies optimiert wurden, indem Codons mit einer Nutzungshäufigkeit von weniger als etwa 20% ersetzt wurden, sind hierin als „Codon-optimierte Sequenzen“ bezeichnet.

[0090] Es sind weitere Sequenzmodifikationen bekannt, um die Proteinexpression in einem zellulären Wirt zu erhöhen. Diese umfassen Eliminierung von Sequenzen, die störende Polyadenylierungssignale, Exon/Intron-Splicestellensignale, Transposon-artige Wiederholungen (Repeats) und/oder andere derartige gut charakterisierte Sequenzen kodieren, die für die Genexpression nachteilig sind. Der GC-Gehalt der Sequenz wird auf ein Maß angepasst, wie es für einen bestimmten zellulären Wirt den Durchschnitt darstellt, wie durch Bezugnahme auf bekannte, in der Wirtszelle exprimierte Gene berechnet wird. Wenn möglich, wird die Sequenz modifiziert, um prognostizierte mRNA-Haarnadel-Sekundärstrukturen zu vermeiden. Andere geeignete Modifikationen umfassen das Hinzufügen einer Translationsinitiationskonsensussequenz am Startpunkt des offenen Leserasters, wie beschrieben in Kozak, *Mol. Cell Biol.*, 9: 5073–5080 (1989). Der Fachmann weiß, dass die allgemeine Regel, dass eukaryotische Ribosomen die Translation ausschließlich am proximalen 5'-AUG-Codon beginnen, nur unter seltenen Bedingungen außer Kraft gesetzt ist (siehe z. B. Kozak *PNAS* 92(7): 2662–2666, (1995) und Kozak *NAR* 15(20): 8125–8148 (1987)). Nukleotidsequenzen, die für die Expression in einer bestimmten Wirtsspezies nicht nur durch Codon-Optimierung, sondern auch durch Eliminierung störender Polyadenylierungssequenzen, Eliminierung von Exon/Intron-Splicestellensignalen, Eliminierung von Transposon-artigen Wiederholungen (Repeats) und/oder durch Optimierung des GC-Gehalts optimiert wurden, sind hierin als „expressionsverstärkte Sequenzen“ bezeichnet.

[0091] 84P2A9-Proteine sind in vielen Formen ausgeführt, vorzugsweise in isolierter Form. Ein gereinigtes 84P2A9-Proteinmolekül ist im Wesentlichen frei von anderen Proteinen oder Molekülen, die die Bindung von 84P2A9 an einen Antikörper oder einen sonstigen Liganden behindern. Die Art und der Grad der Isolierung und Reinigung richten sich nach dem beabsichtigten Gebrauch. Ausführungsformen eines 84P2A9-Proteins umfassen ein gereinigtes 84P2A9-Protein und ein funktionelles, lösliches 84P2A9-Protein. In einer Ausführungsform behalten ein funktionelles lösliches 84P2A9-Protein oder ein Fragment davon die Fähigkeit bei, von

einem Antikörper, einer T-Zelle oder einem sonstigen Liganden gebunden zu werden.

[0092] Die Erfindung stellt außerdem 84P2A9-Proteine bereit, die biologisch aktive Fragmente der Aminosäuresequenz von 84P2A9 aufweisen, welche zu einem Teil mit der in **Fig. 2** gezeigten Aminosäuresequenz von 84P2A9 korrespondieren. Solche erfindungsgemäßen Proteine weisen Eigenschaften des 84P2A9-Proteins auf, wie beispielsweise die Fähigkeit, die Bildung von Antikörpern hervorzurufen, die ein mit dem 84P2A9-Protein assoziiertes Epitop spezifisch binden, von solchen Antikörpern gebunden zu werden, die Aktivierung von HTL oder ZTL zu bewirken und/oder von HTL oder ZTL erkannt zu werden

[0093] Mit 84P2A9 verwandte Proteine werden mit Hilfe von aus dem Stand der Technik wohlbekannter Peptidsynthese-Standardtechnologie oder chemischen Spaltungsverfahren hergestellt. Alternativ können Rekombinationsverfahren verwendet werden, um Nukleinsäuremoleküle herzustellen, die ein mit 84P2A9 verwandtes Protein kodieren. In einer Ausführungsform bieten die hierin beschriebenen 84P2A9 kodierenden Nukleinsäuremoleküle ein Mittel zur Herstellung definierter Fragmente des 84P2A9-Proteins. 84P2A9-Proteinfragmente/-Untersequenzen sind besonders zum Erzeugen und Charakterisieren domänenspezifischer Antikörper (z. B. Antikörper, welche ein extrazelluläres oder intrazelluläres Epitop eines 84P2A9-Proteins erkennen) geeignet, um Stoffe oder zelluläre Faktoren zu identifizieren, welche an 84P2A9 oder eine besondere strukturelle Domäne davon binden, und in verschiedenem therapeutischem Kontext, einschließlich unter anderem für Krebsimpfstoffe und Verfahren zum Herstellen solcher Impfstoffe.

[0094] 84P2A9-Polypeptide, die besonders relevante Strukturen enthalten, lassen sich anhand verschiedener, aus dem Stand der Technik wohlbekannter Analysetechniken, einschließlich zum Beispiel der Analyseverfahren nach Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz oder Jameson-Wolf, oder auf Basis der Immunogenität vorhersagen und/oder identifizieren. Fragmente, die solche Strukturen enthalten, sind besonders für die Herstellung von für Untereinheiten spezifischen Anti-84P2A9-Antikörpern oder T-Zellen geeignet oder zur Identifizierung von zellulären Faktoren, die an 84P2A9 binden.

[0095] Zur Veranschaulichung dessen wurde die Bindung von Peptiden von 84P2A9-Proteinen an das HLA-A2-Molekül des MHC Klasse 1 des Menschen vorhergesagt. Insbesondere wurde die vollständige Aminosäuresequenz des 84P2A9-Proteins in den HLA-Peptidmotiv-Suchalgorithmus eingegeben, der in der Rubrik „Bioinformatik und Molekulare Analyse“ (Bioinformatics and Molecular Analysis Section, BIMAS) unter <http://bimas.dcrt.nih.gov/> zu finden ist. Der HLA-Peptidmotiv-Suchalgorithmus wurde von Dr. Ken Parker auf Basis der Bindung spezifischer Peptidsequenzen in der Grube (Groove) von HLA-Klasse-I-Molekülen und insbesondere von HLA-A2 entwickelt (siehe z. B. 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)). Dieser Algorithmus gestattet die Lokalisierung und die Einordnung von 8-mer-, 9-mer- und 10-mer-Peptiden aus einer vollständigen Proteinsequenz hinsichtlich der vorhergesagten Bindung an HLA-A2 sowie an zahlreiche andere HLA-Klasse-I-Moleküle. Viele Peptide, die an HLA-Klasse-I binden, sind 8-Mere, 9-Mere, 10-Mere oder 11-Mere. Beispielsweise enthalten die Epitope für Klasse-I-HLA-A2 vorzugsweise ein Leucin (L) oder Methionin (M) an Position 2 und ein Valin (V) oder Leucin (L) am C-Terminus (siehe z. B. Parker et al., J. Immunol. 149: 3580–7 (1992)). Ausgewählte Ergebnisse von 84P2A9-Peptiden mit vorhergesagter Bindung sind in Tabelle 1 unten gezeigt. Es versteht sich von selbst, dass jedes der von der BIMAS-Site vorhergesagten oder durch die aus dem Stand der Technik verfügbaren HLA-Klasse I oder Klasse-I-Motive spezifizierten Epitope (z. B. visuell, durch rechnergestützte Verfahren oder vom Fachmann auf dem relevanten Gebiet), oder diejenigen, die Teil des Standes der Technik werden, im Rahmen der Erfindung liegt. In Tabelle 1 sind die 10 am höchsten eingeordneten Kandidaten für jedes Familienmitglied sowie deren Position, die Aminosäuresequenz eines jeden spezifizierten Peptids und ein geschätzter Bindungswert angegeben. Der Bindungswert entspricht der geschätzten Halbwertszeit der Dissoziation von Komplexen, die das Peptid enthalten, bei 37°C und pH 6,5. Peptide mit dem höchsten Bindungswert (d. h. 63,04 84P2A9) binden voraussichtlich am stärksten und am längsten an HLA-Klasse-I auf der Zelloberfläche und stellen daher die besten immunogenen Ziele für die Erkennung durch T-Zellen dar. Die tatsächliche Bindung von Peptiden an ein HLA-Allel lässt sich durch Stabilisierung der HLA-Expression auf der Zelllinie T2 mit defekter Antigenprozessierung untersuchen (siehe z. B. Xue et al., Prostate 30: 73–8 (1997) und Peshwa et al., Prostate 36: 129–38 (1998)). Die Immunogenität spezifischer Peptide lässt sich in vitro durch Stimulation zytotoxischer CD8⁺-T-Lymphozyten (ZTL) in Gegenwart von Antigen präsensierenden Zellen wie beispielsweise dendritischen Zellen untersuchen.

[0096] In einer in den folgenden Beispielen beschriebenen Ausführungsform kann 84P2A9 geeignet in Zellen (wie beispielsweise in 293T-Zellen) exprimiert werden, die mit einem handelsüblichen Expressionsvektor transfiziert sind, wie beispielsweise mit einem ZMV-gesteuerten Expressionsvektor, der 84P2A9 mit einem C-terminalen 6XHis- und MYC-Marker kodiert (pcDNA3.1/mycHis, Invitrogen, oder Tag5, Gen-Hunter Corpo-

ration, Nashville, TN, USA). Der Tag5-Vektor liefert ein IgGK-Sekretionssignal, das verwendet werden kann, um die Produktion eines sezernierten 84P2A9-Proteins in transfizierten Zellen zu ermöglichen. Das sezernierte 84P2A9 mit HIS-Marker im Kulturmedium kann gereinigt werden, z. B. mit Hilfe einer Nickelsäule unter Verwendung von Standardtechniken.

[0097] Im Rahmen der Erfindung sind Modifikationen von mit 84P2A9 verwandten Proteinen, wie beispielsweise kovalente Modifikationen, enthalten. Ein Typ einer kovalenten Modifikation umfasst die Reaktion von Aminosäurezielresten eines 84P2A9-Polypeptids mit einem organischen derivatisierenden Agens, das mit ausgewählten Seitenketten der N- oder C-terminalen Reste von 84P2A9 reagieren kann. Ein anderer, im Rahmen dieser Erfindung eingeschlossener Typ einer kovalenten Modifikation des 84P2A9-Polypeptids umfasst das Ändern des nativen Glykosylierungsmusters eines erfindungsgemäßen Proteins. „Ändern des nativen Glykosylierungsmusters“ soll für die hierin beschriebenen Zwecke das Entfernen mindestens einer Kohlenhydrateinheit bedeuten, die in der nativen Sequenz von 84P2A9 vorhanden ist (entweder durch Entfernen der zugrunde liegenden Glykosylierungsstelle oder durch chemisches und/oder enzymatisches Entfernen der Glykosylierung), und/oder das Hinzufügen mindestens einer Glykosylierungsstelle, die in der nativen Sequenz von 84P2A9 nicht vorhanden ist. Darüber hinaus umfasst der Begriff qualitative Veränderungen der Glykosylierung des nativen Proteins, welche eine Änderung der Art und Anteil der verschiedenen vorhandenen Kohlenhydrateinheiten beinhaltet. Ein anderer Typ einer kovalenten Modifikation von 84P2A9 umfasst das Verknüpfen des 84P2A9-Polypeptids mit einem aus verschiedenen nicht-proteinösen Polymeren, z. B. Polyethylenglykol (PEG), Polypropylenglykol oder Polyoxyalkylenen, auf die Art und Weise, wie sie in den US 4 640 835 A, US 4 496 689 A, US 4 301 144 A, US 4 670 417 A, US 4 791 192 A oder US 4 179 337 A ausgeführt ist.

[0098] Das 84P2A9 der vorliegenden Erfindung kann auch modifiziert werden, um ein chimäres Molekül zu bilden, welches 84P2A9, fusioniert mit einem anderen, heterologen Polypeptid oder einer Aminosäuresequenz, umfasst. Ein solches chimäres Molekül kann chemisch oder rekombinant synthetisiert werden. Ein chimäres Molekül kann ein erfindungsgemäßes Protein aufweisen, das mit einem anderen tumorassoziierten Antigen oder Fragment davon fusioniert ist. Alternativ kann ein Protein eine Fusion von Fragmenten der 84P2A9-Sequenz (Amin- oder Nukleinsäure) aufweisen, so dass ein Molekül geschaffen wird, das auf seiner gesamten Länge nicht direkt mit der Amino- bzw. Nukleinsäuresequenz von **Fig. 2** (SEQ ID Nr.: 2) homolog ist. Ein solches chimäres Molekül kann Vielfache derselben Untersequenz von 84P2A9 aufweisen. Ein chimäres Molekül kann eine Fusion eines mit 84P2A9 verwandten Proteins mit einem Polyhistidinepitop-Marker aufweisen, welcher ein Epitop liefert, an das immobilisiertes Nickel selektiv binden kann. Der Epitop-Marker wird im Allgemeinen am Amino- oder Carboxylterminus von 84P2A9 platziert. In einer alternativen Ausführungsform kann das chimäre Molekül eine Fusion eines mit 84P2A9 verwandten Proteins mit einem Immunglobulin oder einer bestimmten Region eines Immunglobulins aufweisen. Für eine bivalente Form des chimären Moleküls (auch als „Immunadhäsin“ bezeichnet) könnte eine solche Fusion an die Fe-Region eines IgG-Moleküls erfolgen. Die Ig-Fusionen umfassen vorzugsweise die Substitution einer löslichen Form (mit deletierter oder inaktiver Transmembrandomäne) eines 84P2A9-Polypeptids anstelle mindestens einer variablen Region in einem Ig-Molekül. In einer bevorzugten Ausführungsform umfasst die Immunglobulinfusion die Scharnier (Hinge)-, CH2- und CH3- oder die Scharnier (Hinge)-, CH1-, CH2- und CH3-Regionen eines IgG1-Moleküls. Hinsichtlich der Produktion von Immunglobulinfusionen wird auf die am 27. Juni 1995 erteilte US 5 428 130 A verwiesen.

84P2A9-ANTIKÖRPER

[0099] Ein weiterer Aspekt der Erfindung stellt Antikörper bereit, welche an mit 84P2A9 verwandte Proteine und Polypeptide binden. Bevorzugte Antikörper binden spezifisch an ein mit 84P2A9 verwandtes Protein und binden nicht (oder schwach) an Proteine, bei denen es sich nicht um 84P2A9 handelt. In einer anderen Ausführungsform binden Antikörper mit 84P2A9 verwandte Proteine sowie deren Homologe.

[0100] Erfindungsgemäße 84P2A9-Antikörper sind besonders nützlich bei der Diagnose eines Prostatakarzinoms und in prognostischen Assays und Bildgebungsverfahren. Entsprechend sind solche Antikörper bei der Behandlung, Diagnose und/oder Prognose anderer Karzinome nützlich, insofern 84P2A9 auch in diesen anderen Karzinomen exprimiert oder überexprimiert ist. Darüber hinaus sind intrazellulär exprimierte Antikörper (z. B. einzelkettige Antikörper) bei der Behandlung von Karzinomen therapeutisch geeignet, die mit der Expression von 84P2A9 einhergehen, wie beispielsweise bei fortgeschrittenem oder metastasiertem Prostatakarzinom.

[0101] Die Erfindung stellt ferner verschiedene immunologische Assays bereit, die für den Nachweis und die Quantifizierung von 84P2A9 und mutierten mit 84P2A9 verwandten Proteinen geeignet sind. Solche Assays

können mindestens einen 84P2A9-Antikörper aufweisen, der gegebenenfalls ein 84P2A9-Protein oder ein mutiertes 84P2A9-Protein erkennen und binden kann. Diese Assays werden in verschiedenen, aus dem Stand der Technik bekannten, immunologischen Assayformaten durchgeführt, einschließlich unter anderem verschiedener Arten von Radioimmunassays, enzymverknüpfter Immunadsorptionsassays (Enzym-Linked Immunosorbent Assays, ELISAs), enzymverknüpfter Immunfluoreszenzassays (ELIFAs) und dergleichen.

[0102] Erfindungsgemäße verwandte immunologische Nicht-Antikörper-Assays umfassen auch T-Zell-Immunogenitätsassays (inhibitorisch oder stimulatorisch) sowie Haupthistokompatibilitätskomplex-Bindungsassays (Major Histocompatibility Complex- oder MHC-Bindungsassays). Darüber hinaus sind von der Erfindung auch immunologische Bildgebungsverfahren bereit gestellt, die ein Prostatakarzinom und andere, 84P2A9 exprimierende Karzinome detektieren können, einschließlich unter anderem radioszintigraphische Bildgebungsverfahren unter Verwendung gelabelter 84P2A9-Antikörper. Solche Assays sind klinisch bei dem Nachweis, der Überwachung und der Prognose von 84P2A9 exprimierenden Karzinomen wie beispielsweise Prostatakarzinom nützlich.

[0103] 84P2A9-Antikörper werden auch in Verfahren zum Reinigen von 84P2A9 und von mutanten 84P2A9-Proteinen und -Polypeptiden und zum Isolieren von 84P2A9-Homologen und verwandten Molekülen verwendet. In einer Ausführungsform umfasst das Verfahren zum Reinigen eines 84P2A9-Proteins beispielsweise das Inkubieren eines 84P2A9-Antikörpers, der an eine feste Matrix gekoppelt ist, mit einem Lysat oder einer anderen Lösung, die 84P2A9 enthält, unter Bedingungen, die es ermöglichen, dass der 84P2A9-Antikörper an 84P2A9 bindet; Waschen der festen Matrix, um Verunreinigungen zu beseitigen, und Eluieren des 84P2A9 von dem gekoppelten Antikörper. Andere Anwendungen der erfindungsgemäßen 84P2A9-Antikörper umfassen das Erzeugen von Anti-Idiotyp-Antikörpern, welche das 84P2A9-Protein nachahmen.

[0104] Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren für die Herstellung von Antikörpern bekannt. Antikörper können beispielsweise hergestellt werden, indem ein geeigneter Säugerwirt mit einem mit 84P2A9 verwandten Protein, Peptid oder Fragment in isolierter oder immunkonjugierter Form immunisiert wird (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Hrsg., Harlow and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Darüber hinaus können auch Fusionsproteine von 84P2A9 verwendet werden, wie beispielsweise ein 84P2A9-GST-Fusionsprotein. In einer bestimmten Ausführungsform wird ein GST-Fusionsprotein hergestellt, das die ganze oder den größten Teil der Aminosäuresequenz des offenen Leserasters von **Fig. 2** umfasst, und anschließend als Immungen verwendet, um entsprechende Antikörper zu erzeugen. In einer anderen Ausführungsform wird ein 84P2A9-Peptid synthetisiert und als Immungen verwendet.

[0105] Darüber hinaus werden aus dem Stand der Technik bekannte Immunisierungstechniken mit nackter DNA verwendet (mit oder ohne gereinigtes 84P2A9-Protein oder 84P2A9 exprimierenden Zellen), um eine Immunreaktion gegen das kodierte Immunogen zu erzeugen (zur Übersicht siehe Donnelly et al., 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617–648).

[0106] Die Aminosäuresequenz von 84P2A9, wie in **Fig. 2** gezeigt, kann verwendet werden, um spezifische Regionen des 84P2A9-Proteins zum Erzeugen von Antikörpern auszuwählen. Es können beispielsweise Hydrophobizitäts- und Hydrophilie-Analysen der 84P2A9-Aminosäuresequenz verwendet werden, um hydrophile Regionen in der 84P2A9-Struktur zu identifizieren. Regionen des 84P2A9-Proteins, die eine immunogene Struktur zeigen, sowie andere Regionen und Domänen, können leicht anhand verschiedener anderer aus dem Stand der Technik bekannter Verfahren identifiziert werden, wie beispielsweise durch eine Analyse nach Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz oder Jameson-Wolf. Deshalb ist jede von einem dieser Programme oder Verfahren identifizierte Region im Rahmen der vorliegenden Erfindung enthalten. Verfahren für das Erzeugen von 84P2A9-Antikörpern sind weiter durch die hierin bereit gestellten Beispiele veranschaulicht. Verfahren zum Herstellen eines Proteins oder Polypeptids zur Verwendung als Immungen und zum Herstellen immunogener Konjugate eines Proteins mit einem Träger, wie beispielsweise BSA, KLH oder einem anderen Trägerprotein, sind aus dem Stand der Technik wohl bekannt. In manchen Fällen wird eine direkte Konjugation unter Verwendung von beispielsweise Carbodiimid-Reagenzien durchgeführt; in anderen Fällen sind Verknüpfungsreagenzien wie beispielsweise die von Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA erhältlichen, wirksam. Die Verabreichung eines 84P2A9-Immungens wird häufig durch Injektion über einen geeigneten Zeitraum und unter Zuhilfenahme eines geeigneten Adjuvans durchgeführt, wie aus dem Stand der Technik bekannt ist. Während des Immunisierungsplans können die Titer von Antikörpern ermittelt werden, um die Adäquanz der Antikörperbildung zu bestimmen.

[0107] Durch verschiedene, aus dem Stand der Technik bekannte Mittel können monoklonale 84P2A9-Antikörper hergestellt werden. Beispielsweise werden mit Hilfe der Hybridomstandardtechnologie nach Köhler und

Milstein oder durch Modifikationen, die Antikörper produzierende B-Zellen immortalisieren, wie generell bekannt ist, immortalisierte Zelllinien hergestellt, die einen gewünschten monoklonalen Antikörper sezernieren. Die immortalisierten Zelllinien, die die gewünschten Antikörper sezernieren, werden mittels Immunassays gescreent, in denen das Antigen ein mit 84P2A9 verwandtes Protein ist. Wenn die geeignete, den gewünschten Antikörper sezernierende, immortalisierte Zellkultur identifiziert ist, können die Zellen expandiert, und entweder aus Invitro-Kulturen oder aus Aszitesflüssigkeit können Antikörper gewonnen werden.

[0108] Die Antikörper oder Fragmente können auch rekombinant unter Anwendung aktueller Technologie hergestellt werden. Regionen, die spezifisch an die gewünschten Regionen des 84P2A9-Proteins binden, können auch im Kontext chimärer oder CDR-grafted (mit einer Komplementarität bestimmenden Region (CDR) versehenen) Antikörper hergestellt werden, die von mehreren Spezies stammen. Es können auch humanisierte oder humane 84P2A9-Antikörper hergestellt werden und sind für die Verwendung in therapeutischem Kontext bevorzugt. Verfahren zum Humanisieren von murinen und anderen nicht-humanen Antikörpern durch Substituieren mindestens einer der CDR der nicht-humanen Antikörper durch korrespondierende humane Antikörpersequenzen sind wohlbekannt (siehe z. B. Jones et al., 1986, *Nature* 321: 522–525; Riechmann et al., 1988, *Nature* 332: 323–327; Verhoeyen et al., 1988, *Science* 239: 1534–1536). Siehe auch Carter et al., 1993, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 89: 4285 und Sims et al., 1993, *J. Immunol.* 151: 2296. Verfahren zum Herstellen vollständig humaner monoklonaler Antikörper umfassen Phagendisplayverfahren und transgene Verfahren (zur Übersicht siehe Vaughan et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16: 535–539).

[0109] Vollständig humane monoklonale 84P2A9-Antikörper können mit Hilfe von Klonierungstechniken erzeugt werden, bei denen große kombinatorische Bibliotheken humaner Ig-Gene (d. h. Phagen-Display) verwendet werden (Griffiths and Hoogenboom, *Building an in vitro immune system; human antibodies from phage display libraries*. In: *Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications* in Man, Clark, M. (Hrsg.), Nottingham Academic, S. 45–64 (1993); Burton and Barbas, *Human Antibodies from combinatorial libraries*. Id, S. 65–82). Vollständig humane monoklonale 84P2A9-Antikörper können auch mit Hilfe transgener Mäuse produziert werden, die gentechnisch so verändert wurden, dass sie humane Immunoglobulinloci enthalten, wie in der WO 98/24893 A1 beschrieben, Kucherlapati and Jakobovits et al., veröffentlicht am 3. Dezember 1997 (siehe auch Jakobovits, 1998, *Exp. Opin. Invest Drugs* 7(4): 607–614). Diese Verfahren umgehen die In-vitro-Manipulation, die bei der Phagen-Display-Technologie erforderlich ist, und produzieren effizient hoch affine authentische humane Antikörper.

[0110] Die Reaktivität von 84P2A9-Antikörpern mit einem mit 84P2A9 verwandten Protein lässt sich durch eine Anzahl wohlbekannter Mittel feststellen, einschließlich Western Blot, Immunpräzipitation, ELISA und FACS-Analysen mit entsprechend geeigneten mit 84P2A9 verwandten Proteinen, Peptiden, 84P2A9 exprimierenden Zellen oder Extrakten davon. Ein erfindungsgemäßer 84P2A9-Antikörper oder ein Fragment davon werden mit einem detektierbaren Marker gelabelt oder an ein zweites Molekül konjugiert. Geeignete nachweisbare Marker umfassen unter anderem ein Radioisotop, eine Fluoreszenzverbindung, eine Biolumineszenzverbindung, eine Chemilumineszenzverbindung, einen Metallchelatlignier oder ein Enzym. Darüber hinaus werden bispezifische Antikörper, die für mindestens zwei 84P2A9-Epitope spezifisch sind, mit Hilfe von Verfahren erzeugt, die aus dem Stand der Technik allgemein bekannt sind. Homodimere Antikörper können auch durch aus dem Stand der Technik bekannte Vernetzungstechniken hergestellt werden (z. B. Wolff et al., *Cancer Res.* 53: 2560–2565).

84P2A9-TRANSGENE TIERE

[0111] Nukleinsäuren, die 84P2A9 oder seine modifizierten Formen kodieren, können auch verwendet werden, um entweder transgene Tiere oder „Knock-out“-Tiere zu erzeugen, die wiederum bei der Entwicklung und dem Screening von therapeutisch nützlichen Reagenzien geeignet sind. 84P2A9 kodierende cDNA kann nach etablierten Techniken verwendet werden, um genomische DNA zu klonieren, die 84P2A9 kodiert. Die genomischen Sequenzen können dann verwendet werden, um transgene Tiere zu erzeugen, die Zellen enthalten, welche DNA exprimieren, die 84P2A9 kodiert. Verfahren zum Erzeugen transgener Tiere, insbesondere Tiere wie Mäuse oder Ratten, sind im Stand der Technik mittlerweile gebräuchlich und beispielsweise in den US 4 736 866 A und US 4 870 009 A beschrieben. Typischerweise würde das 84P2A9-Transgen mit gewebespezifischen Enhancern in bestimmte Zellen eingebaut.

[0112] Transgen Tiere, die eine Kopie eines 84P2A9 kodierenden Transgens aufweisen, können verwendet werden, um den Effekt einer verstärkten Expression von DNA zu untersuchen, die 84P2A9 kodiert. Solche Tiere können als Testtiere für Reagenzien verwendet werden, von denen angenommen wird, dass sie Schutz beispielsweise vor pathologischen Zuständen in Verbindung mit dessen Überexpression verleihen. Nach diesem

Aspekt der Erfindung wird ein Tier mit einem Reagens behandelt, und eine reduzierte Inzidenz eines pathologischen Zustandes im Vergleich zu unbehandelten Tieren, die das Transgen tragen, würde auf eine mögliche therapeutische Intervention bei dem pathologischen Zustand deuten.

[0113] Alternativ können nicht-humane Homologe von 84P2A9 verwendet werden, um ein 84P2A9-„Knock out“-Tier herzustellen, bei dem das Gen für 84P2A9 als Ergebnis einer homologen Rekombination zwischen dem endogenen, 84P2A9 kodierenden Gen und veränderter 84P2A9 kodierender, genomischer DNA, die in eine embryonale Zelle des Tieres eingeführt wurde, defekt oder verändert ist. Beispielsweise kann 84F2A9 kodierende cDNA verwendet werden, um 84P2A9 kodierende, genomische DNA nach etablierten Techniken zu klonieren. Ein Teil der 84P2A9 kodierenden, genomischen DNA kann deletiert oder durch ein anderes Gen ersetzt werden, wie beispielsweise durch ein Gen, das einen selektierbaren Marker kodiert, welcher zur Überwachung der Integration verwendet werden kann. Typischerweise weist der Vektor mehrere Kilobasen an unveränderter flankierender DNA auf (sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende) (siehe z. B. Thomas and Capecchi, Cell, 51: 503 (1987) für eine Beschreibung von Vektoren für die homologe Rekombination). Der Vektor wird in eine embryonale Stammzelllinie (z. B. durch Elektroporation) eingeführt, und Zellen, in denen die eingeführte DNA eine homologe Rekombination mit der endogenen DNA durchgeführt hat, werden selektiert (siehe z. B. Li et al., Cell, 69: 915 (1992)). Die ausgewählten Zellen werden dann in eine Blastozyste eines Tieres (z. B. einer Maus oder Ratte) injiziert, um Aggregationschimären zu bilden (siehe z. B. Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, Hrsg. (IRL, Oxford, 1987), S. 113–152). Anschließend kann ein chimärer Embryo in ein geeignetes scheinsschwangeres weibliches Fostertier implantiert werden, das den Embryo austrägt, um ein „Knock out“-Tier zu erhalten. Nachkommen, welche die homolog rekombinierte DNA in ihrem Keimzellen enthalten, lassen sich durch Standardtechniken identifizieren und verwenden, um Tiere zu züchten, bei denen alle Zellen des Tieres die homolog rekombinierte DNA enthalten. Knock-out-Tiere können beispielsweise hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Abwehr bestimmter pathologischer Zustände oder hinsichtlich ihrer Entwicklung pathologischer Zustände infolge des Nichtvorhandenseins des 84P2A9-Polypeptids charakterisiert werden.

VERFAHREN ZUR DETEKTION VON 84P2A9

[0114] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft Verfahren zur Detektion von 84P2A9-Polynukleotiden und mit 84P2A9 verwandten Proteinen und deren Varianten sowie Verfahren zum Identifizieren einer Zelle, die 84P2A9 exprimiert. 84P2A9 scheint in den LAPC-Xenografts exprimiert zu werden, die aus Lymphknoten und Knochenmetastasen eines Prostatakarzinoms stammen. Aufgrund seines Expressionsprofils ist 84P2A9 ein potenzieller diagnostischer Marker für eine metastasierte Krankheit. In diesem Kontext liefert der Status der Genprodukte von 84P2A9 nützliche Informationen, um eine Prognose über verschiedene Faktoren, einschließlich der Anfälligkeit für eine Krankheit im fortgeschrittenen Stadium, der Progressionsrate und/oder der Aggressivität des Tumors, zu treffen. Wie nachfolgend ausführlich erläutert ist, lässt sich der Status der 84P2A9-Genprodukte in Patientenproben anhand verschiedener, aus dem Stand der Technik wohl bekannter Protokolle analysieren, einschließlich durch immunhistochemische Analyse, die verschiedenen Northern-Blotting-Techniken, einschließlich In-situ-Hybridisierung, RT-PCR-Analyse (beispielsweise von Lasermikrodissektionsproben), Western-Blot-Analyse und Gewebe-Array-Analyse.

[0115] Insbesondere sind Assays für die Detektion von 84P2A9-Polynukleotiden in einer biologischen Probe bereitgestellt, beispielsweise in Serum, Knochen, Prostata und anderen Geweben, Harn, Samen, Zellpräparationen und dergleichen. Detektierbare 84P2A9-Polynukleotide umfassen beispielsweise ein 84P2A9-Gen oder ein Fragment davon, 84P2A9-mRNA, alternative 84P2A9-mRNA-Splicevarianten und rekombinante DNA- oder RNA-Moleküle, die ein 84P2A9-Polynukleotid enthalten. Aus dem Stand der Technik sind eine Reihe von Verfahren zum Amplifizieren und/oder Detektieren des Vorhandenseins von 84P2A9-Polynukleotiden bekannt, die sich in der Praxis dieses Aspekts der Erfindung anwenden lassen.

[0116] In einer Ausführungsform umfasst ein Verfahren zum Nachweisen einer 84P2A9-mRNA in einer biologischen Probe das Herstellen von cDNA aus der Probe durch reverse Transkription mit Hilfe mindestens eines Primers, Amplifizieren der so hergestellten cDNA mit Hilfe von 84P2A9-Polynukleotiden als Sense- und Antisenseprimer, um 84P2A9-cDNA darin zu amplifizieren, und Nachweisen des Vorhandenseins der amplifizierten 84P2A9-cDNA. Gegebenenfalls kann die Sequenz der amplifizierten 84P2A9-cDNA bestimmt werden.

[0117] In einer anderen Ausführungsform umfasst ein Verfahren zum Nachweisen eines 84P2A9-Gens in einer biologischen Probe zunächst das Isolieren genomischer DNA aus der Probe, Amplifizieren der isolierten genomischen DNA mit Hilfe von 84P2A9-Polynukleotiden als Sense- und Antisenseprimer, um das 84P2A9-Gen darin zu amplifizieren, und Detektieren des Vorhandenseins des amplifizierten 84P2A9-Gens.

Aus den für 84P2A9 bereit gestellten Nukleotidsequenzen (**Fig. 2**) kann eine beliebige Anzahl geeigneter Kombinationen von Sense- und Antisense-Sonden entworfen und für diesen Zweck verwendet werden.

[0118] Die Erfindung stellt außerdem Assays zum Nachweisen des Vorhandenseins eines 84P2A9-Proteins in einem Gewebe oder einer anderen biologischen Probe wie beispielsweise Serum, Knochen, Prostata oder andere Gewebe, Harn, Zellpräparationen und dergleichen bereit. Verfahren zum Detektieren eines 84P2A9-Proteins sind ebenfalls wohlbekannt und umfassen beispielsweise Immunpräzipitation, immunhistochemische Analyse, Western-Blot-Analyse, molekulare Bindungsassays, ELISA, ELIFA und dergleichen. Beispielsweise umfasst ein Verfahren zum Detektieren des Vorhandenseins eines 84P2A9-Proteins in einer biologischen Probe in einer Ausführungsform zunächst das Kontaktieren der Probe mit einem 84P2A9-Antikörper, einem mit 84P2A9 reagierenden Fragment davon oder einem rekombinanten Protein, das eine Antigenbindungsregion eines 84P2A9-Antikörpers enthält, und anschließend das Detektieren der Bindung des 84P2A9-Proteins in der Probe.

[0119] Es sind außerdem Verfahren zum Identifizieren einer Zelle, die 84P2A9 exprimiert, bereit gestellt. In einer Ausführungsform umfasst ein Assay zum Identifizieren einer Zelle, die ein 84P2A9-Gen exprimiert, das Detektieren des Vorhandenseins von 84P2A9-mRNA in der Zelle. Verfahren für das Detektieren bestimmter mRNAs in Zellen sind wohlbekannt und umfassen beispielsweise Hybridisierungsassays unter Verwendung komplementärer DNA-Sonden (wie beispielsweise In-situ-Hybridisierung unter Verwendung markierter 84P2A9-Ribosonden(-Riboprobes), Northern Blot und verwandter Techniken) und verschiedene Nuldeinsäureamplifizierungsassays (wie beispielsweise RT-PCR unter Verwendung komplementärer Primer, die für 84P2A9 spezifisch sind, und andere Detektionsverfahren vom Amplifizierungstyp, wie beispielsweise verzweigte (branched) DNA, SISBA, TMA und dergleichen). Alternativ umfasst ein Assay zum Identifizieren einer Zelle, die ein 84P2A9-Gen exprimiert, das Detektieren des Vorhandenseins eines 84P2A9-Proteins in der Zelle oder eines von der Zelle sezernierten 84P2A9-Proteins. Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Verfahren zum Detektieren von Proteinen wohlbekannt und werden für die Detektion von 84P2A9-Proteinen und von Zellen, die 84P2A9 exprimieren, angewendet.

[0120] Die 84P2A9-Expressionsanalyse ist auch als Hilfsmittel zum Identifizieren und Untersuchen von Stoffen geeignet, welche die Expression des 84P2A9-Gens modulieren. Beispielsweise ist die 84P2A9-Expression bei Prostatakrebs signifikant hochreguliert, und 84P2A9 ist in anderen Karzinomen, einschließlich in Karzinomen der Prostata, Hoden, Niere, des Gehirns, der Knochen, der Haut, der Eierstöcke, der Brust, des Pankreas, des Kolon sowie in lymphozytären Karzinomen und Lungenkarzinomen, exprimiert. Die Identifizierung eines Moleküls oder biologischen Agens, das bzw. der die 84P2A9-Expression oder -Überexpression in Krebszellen hemmt, ist von therapeutischem Wert. Beispielsweise lässt sich ein solches Agens durch Verwendung eines Tests identifizieren, der die 84P2A9-Expression mittels RT-PCR, Nuldeinsäurehybridisierung oder Antikörperbindung quantifiziert.

ÜBERWACHEN DES STATUS VON 84P2A9 UND SEINEN PRODUKTEN

[0121] Tests, die den Status des 84P2A9-Gens und der 84P2A9-Genprodukte in einem Individuum untersuchen, können Informationen über das Wachstum oder das onkogene Potenzial einer biologischen Probe von diesem Individuum liefern. Da 84P2A9-mRNA in Prostatakarzinomen (und in den beispielsweise in **Fig. 4–Fig. 8** gezeigten Krebsgeweben) im Vergleich zu normalem Prostatagewebe so stark exprimiert ist, können Tests, die die relativen Mengen von 84P2A9-mRNA-Transkripten oder -Proteinen in einer biologischen Probe untersuchen, angewendet werden, um eine Krankheit zu diagnostizieren, die mit einer Fehlregulierung von 84P2A9 in Zusammenhang steht, wie beispielsweise Krebs, und kann prognostische Informationen liefern, die bei der Definition geeigneter therapeutischer Optionen von Nutzen sind.

[0122] Weil 84P2A9 beispielsweise in verschiedenen Prostatakarzinom-Xenograftgeweben und Krebszelllinien und in Proben von Patientenkarzinomen exprimiert ist, kann der Expressionsstatus von 84P2A9 Aussagen für die Bestimmung von Informationen wie beispielsweise das Vorhandensein, das Stadium und die Position dysplastischer, vorkanzeröser und kanzeröser Zellen, für die Vorhersage der Anfälligkeit für verschiedene Stadien der Krankheit und/oder für die Abschätzung der Aggressivität des Tumors liefern. Darüber hinaus ist es durch sein Expressionsprofil ein nützliches Bildgebungsreagens bei Metastasierung der Krankheit. Ein wichtiger Aspekt der Erfindung betrifft daher die verschiedenen molekularen Prognose- und Diagnoseverfahren zum Untersuchen des Status von 84P2A9 in biologischen Proben, wie beispielsweise bei Individuen, die an einer Pathologie leiden oder vermutlich leiden, die von einem fehlregulierten Zellwachstum gekennzeichnet ist, wie beispielsweise Krebs.

[0123] Die Onkogenese ist bekanntlich ein mehrstufiger Prozess, bei dem das zelluläre Wachstum einer fortschreitenden Fehlregulation unterworfen ist und Zellen von einem normalen physiologischen Zustand zu vor-kreuzerösen und anschließend kreuzerösen Stadien fortschreiten (siehe z. B. Alers et al., Lab Invest. 77(5): 437–438 (1997) und Isaacs et al., Cancer Surv. 23: 19–32 (1995)). In diesem Kontext ermöglicht die Untersuchung einer biologischen Probe auf Hinweise fehlregulierten Zellwachstums (wie beispielsweise eine aberrante 84P2A9-Expression bei Karzinomen) die Früherkennung einer solchen aberranten Physiologie, bevor ein pathologischer Zustand wie beispielsweise Krebs zu einem Stadium fortschreitet, in dem therapeutische Optionen eingeschränkter sind oder die Prognose ungünstiger ist. Bei solchen Untersuchungen kann der Status von 84P2A9 in einer biologischen Probe (beispielsweise eine, bei der ein fehlreguliertes Zellwachstum vermutet wird) beispielsweise mit dem Status von 84P2A9 in einer entsprechenden normalen Probe (z. B. einer Probe aus dem Individuum (oder alternativ einem anderen Individuum), das nicht von einer Pathologie betroffen ist, beispielsweise einer, bei der kein fehlreguliertes Zellwachstum vermutet wird) verglichen werden. Veränderungen des Status von 84P2A9 in der relevanten biologischen Probe (im Vergleich zu der Normalprobe) liefert eine Evidenz für fehlreguliertes zelluläres Wachstum. Außer einer biologischen Probe, die nicht von einer Pathologie betroffen ist, kann auch ein im Voraus bestimmter normativer Wert wie beispielsweise ein im Voraus bestimmter normaler Grad an mRNA-Expression als Normalprobe verwendet werden (siehe z. B. Grever et al., J. Corp. Neurol. 1996 Dec 9; 376(2): 306–14 und US 5 837 501 A), um den 84P2A9-Status in einer normalen Probe und in einer Verdachtsprobe zu vergleichen.

[0124] Der Begriff „Status“ in diesem Kontext wird nach seiner im Stand der Technik akzeptierten Bedeutung verwendet und betrifft den Zustand oder Status eines Gens und seines Produktes. Der Fachmann verwendet typischerweise eine Reihe von Parametern, um den Zustand bzw. Status eines Gens und seiner Produkte zu untersuchen. Dazu gehören unter anderem die Lokalisierung exprimierter Genprodukte (einschließlich der Lokalisierung von 84P2A9-exprimierenden Zellen) sowie die Menge und die biologische Aktivität exprimierter Genprodukte (wie beispielsweise 84P2A9-mRNA-Polynukleotide und -Polypeptide). Veränderungen des Status von 84P2A9 umfassen typischerweise eine Veränderung der Lokalisierung von 84P2A9 und/oder von 84P2A9-exprimierenden Zellen und/oder einen Anstieg der 84P2A9-mRNA- und/oder -Proteinexpression.

[0125] Wie hierin ausführlich erläutert, wird der 84P2A9-Status in einer biologischen Probe durch eine Reihe von aus dem Stand der Technik wohlbekannten Verfahren analysiert werden, um einen Zustand bzw. ein Phänomen zu identifizieren, die mit fehlreguliertem Zellwachstum einhergehen, einschließlich unter anderem durch genomische Southern-Analyse (um beispielsweise Perturbationen des 84P2A9-Gens zu untersuchen), Northern-Analyse und/oder PCR-Analyse von 84P2A9-mRNA (um beispielsweise Veränderungen der Polynukleotidsequenzen oder des Expressionsgrads von 84P2A9-mRNAs zu untersuchen) und Western-Analyse und/oder immunhistochemische Analyse (um beispielsweise Veränderungen von Polypeptidsequenzen, Veränderungen der Polypeptidlokalisierung in einer Probe, Veränderungen des Expressionsgrads von 84P2A9-Proteinen und/oder Assoziationen von 84P2A9-Proteinen mit Polypeptidbindungspartnern zu untersuchen). Nachweisbare 84P2A9-Polynukleotide umfassen beispielsweise ein 84P2A9-Gen oder Fragmente davon, 84P2A9-mRNA, alternative Splice-Varianten von 84P2A9-mRNAs und rekombinante DNA- oder RNA-Moleküle, die ein 84P2A9-Polynukleotid enthalten.

[0126] 84P2A9 ist aufgrund seines Expressionsprofils ein diagnostischer Marker für eine lokale und/oder metastasierte Krankheit. Insbesondere liefert der Status von 84P2A9 Informationen, die nützlich sind, um die Anfälligkeit für bestimmte Krankheitsstadien, Progression und/oder Tumoraggressivität vorherzusagen. Die Erfindung stellt Verfahren und Assays für die Bestimmung des 84P2A9-Status und zum Diagnostizieren von Karzinomen bereit, die 84P2A9 exprimieren, wie beispielsweise Karzinome der Prostata, der Blase, der Hoden, der Eierstöcke, der Brust, des Pankreas, des Kolon und der Lunge. Der 84P2A9-Status in Patientenproben kann durch eine Reihe von aus dem Stand der Technik wohlbekannten Mitteln analysiert werden, einschließlich ohne Einschränkung immunhistochemische Analyse, In-situ-Hybridisierung, RT-PCR-Analyse von Lasermikrodissektionsproben, Western-Blot-Analyse klinischer Proben und Zelllinien und Gewebe-Array-Analyse. Typische Protokolle zum Untersuchen des Status des 84P2A9-Gens und der 84P2A9-Genprodukte sind beispielsweise zu finden in Ausubel et al., Hrsg., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Unit 2 (Northern Blotting), 4 (Southern Blotting), 15 (Immunoblotting) und 18 (PCR-Analyse).

[0127] Wie oben beschrieben, kann der Status von 84P2A9 in einer biologischen Probe anhand einer aus dem Stand der Technik wohlbekannten Verfahren untersucht werden. Beispielsweise lässt sich der Status von 84P2A9 in einer aus einer bestimmten Stelle im Körper entnommenen biologischen Probe untersuchen, indem die Probe hinsichtlich des Vorhandenseins oder des Nichtvorhandenseins von 84P2A9 exprimierenden Zellen untersucht wird (z. B. solche, die 84P2A9-mRNAs oder -Proteine exprimieren). Diese Untersuchung kann Hinweise auf fehlreguliertes zelluläres Wachstum liefern, beispielsweise wenn 84P2A9 exprimierende Zellen in ei-

ner biologischen Probe gefunden werden, die solche Zellen normalerweise nicht enthält (beispielsweise in einem Lymphknoten). Solche Veränderungen des Status von 84P2A9 in einer biologischen Probe sind häufig mit fehlreguliertem zellulärem Wachstum assoziiert. Insbesondere ist die Metastasierung von Krebszellen von einem Ursprungsorgan (wie den Hoden oder der Prostata) zu einem anderen Körperbereich (wie beispielsweise zu einem Lymphknoten) ein Hinweis auf fehlreguliertes zelluläres Wachstum. In diesem Kontext ist die Evidenz für fehlreguliertes zelluläres Wachstum wichtig, beispielsweise, da bei einem wesentlichen Anteil von Patienten mit Prostatakarzinom okkulte Lymphknotenmetastasen festgestellt werden können, und solche Metastasen mit bekannten Prädiktoren der Krankheitsprogression assoziiert sind (siehe z. B. Murphy et al., *Prostate* 42(4): 315–317 (2000); Su et al., *Semin. Surg. Oncol.* 18(1): 17–28 (2000) und Freeman et al., *J Urol* 1995 Aug; 154(2 Pt 1): 474–8). In einem Aspekt stellt die Erfindung Verfahren zum Überwachen von 84P2A9-Genprodukten bereit, indem der Status von 84P2A9-Genprodukten bestimmt wird, die von Zellen in einer Gewebetestprobe eines Individuums exprimiert werden, das vermutlich eine Krankheit hat, die mit fehlreguliertem zellulärem Wachstum assoziiert ist (beispielsweise Hyperplasie oder Krebs), und der so bestimmte Status anschließend mit dem Status von 84P2A9-Genprodukten in einer entsprechenden normalen Probe verglichen wird, wobei das Vorhandensein aberranter 84P2A9-Genprodukte in der Testprobe relativ zu der Normalprobe einen Hinweis auf das Vorhandensein von fehlreguliertem zellulärem Wachstum in den Zellen des Individuums liefert.

[0128] In einem anderen Aspekt stellt die Erfindung Assays bereit, die für die Bestimmung des Vorhandenseins von Krebs in einem Individuum von Nutzen sind, welche den Nachweis eines wesentlichen Anstiegs der Expression von 84P2A9-mRNA- oder -Protein in einer Testzelle oder Gewebeprobe relativ zu dem Grad der Expression in den entsprechenden normalen Zellen oder dem normalen Gewebe umfassen. Das Vorhandensein von 84P2A9-mRNA kann beispielsweise in Gewebeproben untersucht werden, einschließlich unter anderem in Prostata-, Hoden-, Nieren-, Gehirn-, Knochen-, Haut-, Eierstock-, Brust-, Pankreas- und Kolongewebe, lymphozytären Geweben und in Lungengewebe (siehe z. B. **Fig. 4–Fig. 8**). Das Vorhandensein einer wesentlichen 84P2A9-Expression in einem dieser Gewebe ist geeignet, um das Auftreten, das Vorhandensein und/oder den Schweregrad einer Krebserkrankung anzuzeigen, da die entsprechenden Normalgewebe keine oder weniger 84P2A9-mRNA exprimieren.

[0129] In einer verwandten Ausführungsform wird der 84P2A9-Status auf Proteinebene anstatt auf Nukleinsäureebene bestimmt. Beispielsweise umfasst ein solches Verfahren das Bestimmen der von Zellen in einer Testgewebeprobe exprimierten Menge an 84P2A9-Protein und Vergleichen der so bestimmten Menge mit der Menge an 84P2A9, die in einer entsprechenden normalen Probe exprimiert wird. In einer Ausführungsform wird das Vorhandensein von 84P2A9-Protein beispielsweise mit Hilfe von immunhistochemischen Verfahren untersucht. 84P2A9-Antikörper oder -Bindungspartner, die eine Expression von 84P2A9-Protein feststellen können, werden in verschiedenen aus dem Stand der Technik für diesen Zweck wohl bekannten Assayformaten verwendet.

[0130] In anderen verwandten Ausführungsformen kann der Status von 84P2A9-Nukleotid- und -Aminosäuresequenzen in einer biologischen Probe untersucht werden, um Perturbationen in der Struktur dieser Moleküle zu identifizieren. Diese Perturbationen können Insertionen, Deletionen, Substitutionen und dergleichen umfassen. Solche Ausführungsformen sind von Nutzen, da Perturbationen in den Nukleotid- und Aminosäuresequenzen bei einer großen Anzahl von Proteinen beobachtet wird, die mit einem Phänotyp fehlregulierten Wachstums assoziiert sind (siehe z. B. Marrogi et al., 1999, *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369–378). Eine Mutation in der Sequenz von 84P2A9 kann beispielsweise das Vorhandensein oder die Begünstigung eines Tumors anzeigen. Solche Assays haben daher diagnostischen und prädiktiven Wert, wenn eine Mutation in 84P2A9 einen möglichen Funktionsverlust oder eine Beschleunigung des Tumorwachstums anzeigt.

[0131] Aus dem Stand der Technik ist ein breites Spektrum an Assays zum Beobachten von Perturbationen in Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wohl bekannt. Beispielsweise werden Größe und Struktur von Nukleinsäure- oder Aminosäuresequenzen von 84P2A9-Genprodukten durch die hierin erläuterten Northern-, Southern-, Western-, PCR- und DNA-Sequenzierungsprotokolle beobachtet. Darüber hinaus sind weitere Verfahren zum Beobachten von Perturbationen in Nukleotid- oder Aminosäuresequenzen wie beispielsweise die Analyse von Einzelstrangkonnektionspolymorphismen aus dem Stand der Technik wohl bekannt (siehe z. B. US 5 382 510 A und US 5 952 170 A).

[0132] In einer anderen Ausführungsform kann der Methylierungsstatus des 84P2A9-Gens in einer biologischen Probe untersucht werden. Bei immortalisierten und transformierten Zellen tritt häufig eine aberrante Demethylierung und/oder Hypermethylierung von CpG-Inseln in regulatorischen 5'-Regionen auf und kann zu einer veränderten Expression verschiedener Gene führen. Beispielsweise scheint die Hypermethylierung des

Promotors der Glutathion-S-Transferase der pi-Klasse (einem Protein, das in der normalen Prostata exprimiert wird, aber bei > 90% der Prostatakarzinome nicht) die Transkription dieses Gens permanent stumm zu schalten, und ist die am häufigsten festgestellte genomische Veränderung bei Prostatakarzinomen (De Marzo et al., *Am. J. Pathol.* 155(6): 1985–1992 (1999)). Diese Veränderung ist darüber hinaus in mindestens 70% der Fälle einer hochgradigen intraepithelialen Prostataneoplasie (PIN) vorhanden (Brooks et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998, 7: 531–536). In einem anderen Beispiel wird die Expression des tumorspezifischen Gens LAGE-I (das in normalem Gewebe nicht exprimiert ist, aber bei 25–50% der Prostatakarzinome) in lymphoblastoiden Zellen durch Desoxyazacytidin induziert, was nahe legt, dass die Expression im Tumor die Folge einer Demethylierung ist (Lethe et al., *Int. J. Cancer* 76(6): 903–908 (1998)). Aus dem Stand der Technik sind verschiedene Assays zum Untersuchen des Methylierungsstatus eines Gens bekannt. Beispielsweise können bei Hybridisierungsansätzen vom Southern-Typ methylierungsempfindliche Restriktionsenzyme verwendet werden, die nicht in der Lage sind, Sequenzen mit methylierten CpG-Stellen zu spalten, um den Methylierungsstatus von CpG-Inseln zu untersuchen. Darüber hinaus kann eine MSP (methylierungsspezifische PCR) schnell ein Profil des Methylierungsstatus aller in einer CpG-Insel eines bestimmten Gens vorhandenen CpG-Stellen erstellen. Dieser Vorgang umfasst zunächst die Modifizierung von DNA durch Natriumbisulfit (bei der alle nicht methylierten Cytosine zu Uracil umgewandelt werden), gefolgt von einer Amplifizierung unter Verwendung von Primern, die für methylierte und nicht für nicht-methylierte DNA spezifisch sind. Es liegen auch Protokolle vor, die eine Methylation Interference (Methylierungsinterferenz) beinhalten, beispielsweise in *Current Protocols In Molecular Biology*, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al. Hrsg., 1995.

[0133] Genamplifizierung ist ein weiteres Verfahren zur Feststellung des Status von 84P2A9, eines Lokus auf 1q32.3, d. h. in einer Region, die nachweislich bei verschiedenen Karzinomen Perturbationen aufweist. Genamplifizierung wird direkt in einer Probe gemessen, beispielsweise durch konventionelles Southern Blotting oder Northern Blotting, um die Transkription von mRNA zu quantifizieren (Thomas, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 5201–5205), durch Dot Blotting (DNA-Analyse), oder durch In situ-Hybridisierung unter Verwendung einer in geeigneter Weise gelabelten Sonde auf Basis der hierin bereitgestellten Sequenzen. Alternativ werden Antikörper verwendet, die spezifische Duplexe (Doppelstränge) erkennen, einschließlich DNA-Duplexe, RNA-Duplexe und DNA-RNA-Hybrid-Duplexe oder DNA-Protein-Duplexe. Die Antikörper selbst sind gelabelt, wobei der Assay durchgeführt wird, indem der Duplex an eine Fläche gebunden ist, so dass nach Ausbildung des Duplex auf der Fläche das Vorhandensein von an den Duplex gebundenem Antikörper festgestellt werden kann.

[0134] Zusätzlich zu den hierin erläuterten Geweben können Gewebebiopsien oder peripheres Blut geeignet auf Vorhandensein von Krebszellen untersucht werden, einschließlich unter anderem Prostata-, Hoden-, Nieren-, Gehirn-, Knochen-, Haut-, Eierstock-, Brust-, Pankreas- und Kolonkarzinome, lymphozytäre Karzinome und Lungenkarzinom, indem beispielsweise Northern Blot, Dot Blot oder RT-PCR-Analyse verwendet werden, um die Expression von 84P2A9 festzustellen (siehe z. B. **Fig. 4-Fig. 8**). Das Vorhandensein von 84P2A9-mRNA, die sich durch RT-PCR amplifizieren lässt, liefert einen Hinweis auf das Vorhandensein von Krebs. Derzeit werden RT-PCR-Nachweistests für Tumorzellen im peripheren Blut für die Anwendung bei der Diagnose und bei der Behandlung einer Reihe von soliden Tumoren des Menschen untersucht. Auf dem Gebiet der Prostata-Onkologie gehören dazu RT-PCR-Assays für die Detektion von Zellen, die PSA und PSM exprimieren (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). RT-PCR-Assays sind aus dem Stand der Technik wohl bekannt.

[0135] Ein verwandter Aspekt der Erfindung betrifft die Prognose der Anfälligkeit eines Individuums für die Entwicklung von Krebs. In einer Ausführungsform umfasst ein Verfahren zum Vorhersagen der Anfälligkeit für Krebs das Nachweisen von 84P2A9-mRNA oder 84P2A9-Protein in einer Gewebeprobe, wobei das Vorhandensein eine Anfälligkeit für Krebs anzeigt, wobei der Grad der Expression von 84P2A9-mRNA mit dem Grad der Anfälligkeit korreliert. In einer spezifischen Ausführungsform wird das Vorhandensein von 84P2A9 in Prostatagewebe oder anderem Gewebe untersucht, wobei das Vorhandensein von 84P2A9 in der Probe einen Hinweis auf Anfälligkeit für Prostatakrebs liefert (oder auf die Ausbildung oder das Vorhandensein eines Prostatatumors). In einer eng verwandten Ausführungsform kann die Integrität von 84P2A9-Nukleotid- und -Aminosäuresequenzen in einer biologischen Probe untersucht werden, um Perturbationen in der Struktur dieser Moleküle, wie beispielsweise Insertionen, Deletionen, Substitutionen und dergleichen, zu identifizieren. Das Vorhandensein von mindestens einer Perturbation in 84P2A9-Genprodukten in der Probe ist ein Hinweis auf eine Anfälligkeit für Krebs (oder auf die Ausbildung oder das Vorhandensein eines Tumors).

[0136] Ein weiterer verwandter Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zur Messung der Tumoraggressivität. In einer Ausführungsform umfasst ein Verfahren zur Messung der Tumoraggressivität das Bestimmen der

Menge an von Zellen in einer Probe des Tumors exprimierter 84P2A9-mRNA oder exprimiertem 84P2A9-Protein, das Vergleichen der so bestimmten Menge mit der Menge an 84P2A9-mRNA oder 84P2A9-Protein, die in einem demselben Individuum entnommenen, entsprechenden normalen Gewebe oder in einer Referenzprobe aus normalem Gewebe exprimiert wird, wobei das Maß der Expression von 84P2A9-mRNA oder 84P2A9-Protein in der Tumorseite relativ zu der normalen Probe den Grad der Aggressivität angibt. In einer spezifischen Ausführungsform wird die Aggressivität eines Tumors bestimmt, indem festgestellt wird, in welchem Maß 84P2A9 in den Tumorzellen exprimiert wird, wobei ein höheres Maß an Expression einen aggressiveren Tumor anzeigt. In einer eng verwandten Ausführungsform kann die Integrität von 84P2A9-Nukleotid- und -Aminosäuresequenzen in einer biologischen Probe evaluiert werden, um Perturbationen in der Struktur dieser Moleküle wie beispielsweise Insertionen, Deletionen, Substitutionen und dergleichen zu identifizieren. Das Vorhandensein von mindestens einer Perturbation deutet auf einen aggressiveren Tumor hin.

[0137] Noch ein weiterer verwandter Aspekt der Erfindung betrifft Verfahren zum Beobachten des Fortschreitens eines Malignoms in einem Individuum über die Zeit. In einer Ausführungsform umfassen Verfahren zum Beobachten des Fortschreitens eines Malignoms in einem Individuum über die Zeit das Bestimmen der Menge an von Zellen in einer Probe des Tumors exprimierter 84P2A9-mRNA oder exprimiertem 84P2A9-Protein, das Vergleichen der so bestimmten Menge mit der Menge an 84P2A9-mRNA oder 84P2A9-Protein, die in einer demselben Individuum zu einem anderen Zeitpunkt entnommenen, äquivalenten Gewebeprobe exprimiert wird, wobei der Grad der Expression von 84P2A9-mRNA oder 84P2A9-Protein in der Tumorseite über die Zeit Informationen über das Fortschreiten der Krebserkrankung liefert. In einer spezifischen Ausführungsform wird das Fortschreiten einer Krebserkrankung bestimmt, indem der Grad der Veränderung der 84P2A9-Expression in den Tumorzellen über die Zeit bestimmt wird, wobei eine verstärkte Expression das Fortschreiten der Krebserkrankung anzeigt.

[0138] Es kann auch die Integrität von 84P2A9-Nukleotid- und -Aminosäuresequenzen in einer biologischen Probe untersucht werden, um Perturbationen in der Struktur dieser Moleküle wie beispielsweise Insertionen, Deletionen, Substitutionen und dergleichen zu identifizieren, wobei das Vorhandensein von mindestens einer Perturbation auf das Fortschreiten der Krebserkrankung hinweist.

[0139] Die obigen diagnostischen Ansätze können mit einem beliebigen aus einem breiten Spektrum an aus dem Stand der Technik bekannten prognostischen und diagnostischen Protokollen kombiniert werden. Beispielsweise betrifft eine weitere Ausführungsform der hierin beschriebenen Erfindung Verfahren zum Beobachten einer Koinzidenz zwischen der Expression des 84P2A9-Gens und von 84P2A9-Genprodukten (bzw. Perturbationen im 84P2A9-Gen und in 84P2A9-Genprodukten) und einem Faktor, der mit einem Malignom assoziiert ist, um den Status einer Gewebeprobe zu diagnostizieren und zu prognostizieren. Es können in diesem Kontext viele verschiedene, mit einem Malignom assoziierte Faktoren verwendet werden, beispielsweise die Expression von Genen, die mit einem Malignom assoziiert sind (z. B. bei Prostatakrebs die Expression von PSA, PSCA und PSM, etc.) sowie grobe zytologische Beobachtungen (siehe z. B. 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). Beispielsweise können Verfahren zum Beobachten einer Koinzidenz zwischen der Expression des 84P2A9-Gens und von 84P2A9-Genprodukten (bzw. Perturbationen im 84P2A9-Gen und in 84P2A9-Genprodukten) und einem anderen, mit einem Malignom assoziierten Faktor nützlich sein, da das Vorhandensein einer Reihe spezifischer Faktoren, deren Auftreten zeitlich mit dem Auftreten einer Krankheit zusammenfällt, Informationen liefert, die für das Diagnostizieren und Prognostizieren des Status einer Gewebeprobe ausschlaggebend sind.

[0140] In einer typischen Ausführungsform umfassen Verfahren zum Beobachten einer Koinzidenz zwischen der Expression des 84P2A9-Gens und von 84P2A9-Genprodukten (bzw. Perturbationen im 84P2A9-Gen und in 84P2A9-Genprodukten) und einem anderen, mit einem Malignom assoziierten Faktor das Feststellen der Überexpression von 84P2A9-mRNA oder -Protein in einer Gewebeprobe, Feststellen der Überexpression von PSA-mRNA oder -Protein in einer Gewebeprobe und das Beobachten einer Koinzidenz der Überexpression von 84P2A9-mRNA oder -Protein und PSA-mRNA oder -Protein. In einer spezifischen Ausführungsform wird die Expression von 84P2A9- und PSA-mRNA in Prostatagewebe untersucht. In einer bevorzugten Ausführungsform liefert die Koinzidenz der Überexpression von 84P2A9- und PSA-mRNA in der Probe einen Hinweis auf das Vorhandensein von Prostatakrebs, auf eine Anfälligkeit für Prostatakrebs oder auf die Ausbildung oder den Status eines Prostatatumors.

[0141] Verfahren zum Nachweisen und Quantifizieren der Expression von 84P2A9-mRNA oder -Protein sind hierin beschrieben, und Standardtechnologien zum Nachweis und zur Quantifizierung von Nukleinsäure und Protein sind aus dem Stand der Technik wohlbekannt. Standardverfahren für den Nachweis und die Quantifi-

zierung von 84P2A9-mRNA umfassen In-situ-Hybridisierung unter Verwendung markierter 84P2A9-Riboprobe, Northern Blot und verwandte Techniken unter Verwendung von 84P2A9-Polynukleotidsonden, RT-PCR-Analyse unter Verwendung von für 84P2A9 spezifischen Primern und andere Nachweisverfahren vom Amplifikationstyp, wie beispielsweise verzweigte (branched) DNA, SISBA, TMA und dergleichen. In einer spezifischen Ausführungsform wird halbquantitative RT-PCR verwendet, um die Expression von 84P2A9-mRNA festzustellen und zu quantifizieren, wie in den folgenden Beispielen beschrieben ist. Für diesen Zweck kann eine beliebige Anzahl von Primern verwendet werden, die 84P2A9 amplifizieren können, einschließlich unter anderem der verschiedenen Primersätze, die hierin spezifisch beschrieben sind. Für diesen Zweck können Standardverfahren für den Nachweis und die Quantifizierung von Proteinen verwendet werden. In einer spezifischen Ausführungsform können in einem immunhistochemischen Assay mit Gewebebiopsien polyklonale oder monoklonale Antikörper verwendet werden, die spezifisch mit dem 84P2A9-Wildtypprotein reagieren.

IDENTIFIZIERUNG VON MOLEKÜLEN, DIE MIT 84P2A9 INTERAGIEREN

[0142] Die hierin beschriebenen 84P2A9-Proteinsequenzen ermöglichen einem Fachmann die Identifizierung von Proteinen, kleinen Molekülen und anderen Stoffen, die mit 84P2A9 interagieren, sowie Signalwege, die von 84P2A9 aktiviert werden, mit einem beliebigen aus einer Vielzahl von im Stand der Technik anerkannten Protokollen. Beispielsweise kann eines der so genannten „Interaction Trap“-Systeme (auch als „Two Hybrid“-Assay bezeichnet) verwendet werden. Bei solchen Systemen findet durch Interaktion von Molekülen die Rekonstitution eines Transkriptionsfaktors statt, der die Expression eines Reportergens steuert, woraufhin die Expression des Reportergens untersucht wird. Typische Systeme identifizieren Protein-Protein-Interaktionen in vivo durch Rekonstitution eines eukaryotischen Transkriptionsaktivators und sind beispielsweise in den US 5 955 280 A, US 5 925 523 A, US 5 846 722 A und US 6 004 746 A beschrieben.

[0143] Alternativ können Peptidbibliotheken durchsucht werden, um Moleküle zu identifizieren, die mit 84P2A9-Proteinsequenzen interagieren. Bei solchen Verfahren werden Peptide, die an ein Molekül wie 84P2A9 binden, identifiziert, indem Bibliotheken durchsucht werden, welche eine zufällige oder kontrollierte Sammlung von Aminosäuren kodieren. Von den Bibliotheken exprimierte Peptide werden als Fusionsproteine von Bakteriophagen-Hüllproteinen exprimiert, und die Bakteriophagenpartikel werden anschließend gegen die relevanten Rezeptoren getestet.

[0144] Entsprechend werden so Peptide mit einem breiten Anwendungsspektrum, beispielsweise therapeutische oder diagnostische Reagenzien, ohne jegliche vorherige Information über die Struktur des erwarteten Liganden oder Rezeptormoleküls identifiziert. Typische Peptidbibliotheken und Durchsuchungsverfahren, die zur Identifizierung von Molekülen, die mit 84P2A9-Proteinsequenzen interagieren, verwendet werden können, sind beispielsweise in den US 5 723 286 A und US 5 733 731 A beschrieben.

[0145] Alternativ werden Zelllinien verwendet, die 84P2A9 exprimieren, um von 84P2A9 vermittelte Protein-Protein-Interaktionen zu identifizieren. Solche Interaktionen lassen sich anhand von Immunpräzipitationstechniken, wie von anderen gezeigt (Hamilton B. J., et al. Biochem Biophys. Res. Commun. 1999, 261: 646–51), untersuchen. Das 84P2A9-Protein kann typischerweise aus 84P2A9 exprimierenden Prostatakarzinom-Zelllinien mit Hilfe von Anti-84P2A9-Antikörpern immunpräzipitiert werden. Alternativ können Antikörper gegen einen His-Marker (His-Tag) in einer Zelllinie verwendet werden, die gentechnisch verändert wurde, um 84P2A9 zu exprimieren (oben erwähnte Vektoren). Der immunpräzipitierte Komplex kann mittels Verfahren wie Western Blotting, ³⁵S-Methionin-Markierung von Proteinen, Proteinmikrosequenzierung, Silberfärbung und zweidimensionaler Gelelektrophorese hinsichtlich einer Assoziation mit Protein untersucht werden.

[0146] Kleine Moleküle, die mit 84P2A9 interagieren, können mittels verwandter Ausführungsformen solcher Screening-Assays identifiziert werden. Beispielsweise können kleine Moleküle identifiziert werden, welche die Proteinfunktion stören, einschließlich Moleküle, die die Fähigkeit von 84P2A9 zur Vermittlung von Phosphorylierung und Dephosphorylierung, Second-Messenger-Signalübertragung oder Tumorgenese stören. Typische Verfahren sind beispielsweise in der US 5 928 868 A erläutert, und umfassen Verfahren zum Ausbilden von Hybridliganden, bei denen mindestens ein Ligand ein kleines Molekül ist. In einer veranschaulichenden Ausführungsform wird der Hybridligand in Zellen eingeführt, die wiederum einen ersten und einen zweiten Expressionsvektor enthalten. Jeder Expressionsvektor enthält DNA zum Exprimieren eines Hybridproteins, das ein mit einer Kodierungssequenz eines transkriptionellen Moduls verknüpftes Zielprotein kodiert. Die Zellen enthalten darüber hinaus ein Reportergen, dessen Expression auf die Nähe des ersten und zweiten Hybridproteins zueinander konditioniert ist, d. h. auf ein Ereignis, das nur dann stattfindet, wenn der Hybridligand an Zielstellen auf beiden Hybridproteinen bindet. Zellen, die das Reportergen exprimieren, werden selektiert, und das

unbekannte kleine Molekül bzw. das unbekannte Hybridprotein werden identifiziert.

[0147] Eine typische Ausführungsform dieser Erfindung umfasst ein Verfahren des Screenings auf ein Molekül, das mit einer in [Fig. 1](#) gezeigten 84P2A9-Aminosäuresequenz (SEQ ID Nr. 2) interagiert, welches die folgenden Schritte umfasst: Kontaktieren einer Population von Molekülen mit der 84P2A9-Aminosäuresequenz, Interagierenlassen der Population von Molekülen und der 84P2A9-Aminosäuresequenz unter Bedingungen, die eine Interaktion ermöglichen, Bestimmen des Vorhandenseins eines Moleküls, das mit der 84P2A9-Aminosäuresequenz interagiert, und anschließendes Trennen von Molekülen, die nicht mit der 84P2A9-Aminosäuresequenz interagieren, von Molekülen, bei denen dies der Fall ist. In einer spezifischen Ausführungsform umfasst das Verfahren des Weiteren das Reinigen eines Moleküls, das mit der 84P2A9-Aminosäuresequenz interagiert. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die 84P2A9-Aminosäuresequenz mit einer Bibliothek von Peptiden kontaktiert.

THERAPEUTISCHE VERFAHREN UND ZUSAMMENSETZUNGEN

[0148] Die Identifikation von 84P2A9 als Protein, das normalerweise in Zusammenhang mit der Prostata und den Hoden steht und auch in einem Prostatakarzinom (und in anderen Karzinomen) exprimiert wird, eröffnet eine Anzahl therapeutischer Strategien für die Behandlung solcher Krebserkrankungen. Wie hierin erläutert, ist es möglich, dass 84P2A9 als Transkriptionsfaktor fungiert, der an der Aktivierung von Tumorfördernden Genen oder an der Unterdrückung von Genen beteiligt ist, die eine Tumorgenese blockieren.

[0149] Das Expressionsprofil von 84P2A9 erinnert an die Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene bzw. Krebs-Hoden-Antigene) oder MAGE-Antigene, bei denen es sich um hodenbezogene Gene handelt, die in Melanomen und anderen Krebserkrankungen hoch reguliert sind (Van den Eynde and Boon, Int J Clin Lab Res. 27: 81–86, 1997). Aufgrund ihrer gewebespezifischen Expression und dem hohen Grad ihrer Expression bei Krebs werden die MAGE-Antigene derzeit als Ziele für Krebsimpfstoffe untersucht (Durrant, Anticancer Drugs 8: 727–733, 1997; Reynolds et al., Int J Cancer 72: 972–976, 1997). Aufgrund seiner Expressionsmuster könnte auch 84P2A9 ein ideales Ziel für einen Krebsimpfstoffansatz gegen Prostatakrebs sein. Seinen strukturellen Merkmalen zufolge könnte 84P2A9 ein Transkriptionsfaktor und ein kleinmolekulares Ziel (Small-Molecule-Target) sein.

[0150] Auf eine Hemmung der Aktivität des 84P2A9-Proteins abzielende therapeutische Ansätze dürften daher für Patienten von Nutzen sein, die an Prostatakrebs, Hodenkrebs und anderen, 84P2A9 exprimierenden Karzinomen leiden. Diese Therapieansätze fallen allgemein in zwei Klassen. Eine Klasse umfasst verschiedene Verfahren zum Hemmen der Bindung bzw. Assoziation des 84P2A9-Proteins mit seinem Bindungspartner bzw. mit anderen Proteinen. Die andere Klasse umfasst verschiedene Verfahren zum Hemmen der Transkription des 84P2A9-Gens oder der Translation der mRNA von 84P2A9.

84P2A9 als Ziel einer auf Antikörper gestützten Therapie

[0151] Aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften könnte 84P2A9 ein attraktives molekulares Ziel für therapeutische Strategien auf Antikörperbasis sein. Aus dem Stand der Technik ist eine Reihe von Antikörperstrategien bekannt, um extra- und intrazelluläre Moleküle anzugreifen (siehe z. B. Komplement- und ADCC-vermitteltes Killing sowie die Verwendung von intrazellulären Antikörpern (Intrabodies), wie sie hierin erläutert ist). Da 84P2A9 von Krebszellen verschiedener Abstammung exprimiert und von den entsprechenden normalen Zellen nicht exprimiert wird, dürfte die systemische Verabreichung von mit 84P2A9 immunreaktiven Zusammensetzungen hervorragende Empfindlichkeit ohne durch Bindung des immuntherapeutischen Moleküls an Nicht-Zielorgane und -Gewebe verursachte toxische, unspezifische und/oder nicht-zielgerichtete Effekte aufweisen. Antikörper, die spezifisch mit Domänen von 84P2A9 reagieren, sind geeignet, um 84P2A9 exprimierende Karzinome systemisch zu behandeln, entweder als Konjugate mit einem Toxin oder therapeutischen Agens oder als nackte Antikörper mit der Fähigkeit zur Hemmung der Zellproliferation oder -funktion.

[0152] Antikörper gegen 84P2A9 können derart in einen Patienten eingeführt werden, dass der Antikörper an 84P2A9 bindet und eine Funktion moduliert oder stört, beispielsweise eine Interaktion mit einem Bindungspartner, und somit eine Hemmung des Wachstums und/oder die Vernichtung der Tumorzellen vermittelt und/oder das Wachstum der Tumorzellen hemmt. Mechanismen, durch welche solche Antikörper einen therapeutischen Effekt ausüben, können komplementvermittelte Zytolyse, antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität, Modulation der physiologischen Funktion von 84P2A9, Hemmung der Ligandenbindung oder von Signalübertragungswegen, Modulation der Tumorzelldifferenzierung, Veränderung von Tumorangiogenesefaktorprofilen und/oder Induktion von Apoptose umfassen.

[0153] Ein Fachmann weiß, dass Antikörper verwendet werden können, um immunogene Moleküle, wie beispielsweise eine immunogene Region der in [Fig. 1](#) gezeigten 84P2A9-Sequenz, spezifisch anzugreifen und zu binden. Darüber hinaus ist einem Fachmann bekannt, dass die Konjugation von Antikörpern an zytotoxische Stoffe Routine ist. In diesem Zusammenhang weiß ein Fachmann, dass, wenn zytotoxische und/oder therapeutische Stoffe direkt zu Zellen transportiert werden, indem sie an Antikörper konjugiert werden, die für ein von dieser Zelle exprimiertes Molekül (z. B. 84P2A9) spezifisch sind, berechtigterweise davon ausgegangen werden kann, dass das zytotoxische Agens seinen bekannten biologischen Effekt (d. h. Zytotoxizität) auf diese Zellen ausübt.

[0154] Aus dem Stand der Technik ist ein breites Spektrum an Zusammensetzungen und Verfahren zur Verwendung von Konjugaten aus Antikörper und zytotoxischem Agens bekannt, um Zellen zu töten. Im Kontext mit Krebserkrankungen umfassen typische Verfahren das Verabreichen einer biologisch wirksamen Menge eines Konjugates, das ein mit einem gezielt wirkenden Agens (z. B. einem Anti-84P2A9-Antikörper) verknüpft, ausgewähltes, zytotoxisches und/oder therapeutisches Agens umfasst, welches an einen Marker (z. B. 84P2A9) bindet, der exprimiert, zugänglich für Bindung oder auf den Zelloberflächen lokalisiert ist, an ein Tier mit einem Tumor. Eine typische Ausführungsform ist ein Verfahren des Abgebens eines zytotoxischen und/oder therapeutischen Agens an eine Zelle, die 84P2A9 exprimiert, umfassend das Konjugieren des zytotoxischen Agens mit einem Antikörper, der immunspezifisch an ein 84P2A9-Epitop bindet, und das Exponieren der Zelle gegenüber dem Antikörper-Agens-Konjugat. Eine andere spezifische veranschaulichende Ausführungsform ist ein Verfahren des Behandeln eines Individuums, das vermutlich an einer metastasierten Krebserkrankung leidet, umfassend den Schritt des parenteralen Verabreichens einer pharmazeutischen Zusammensetzung an das Individuum, welche eine therapeutisch wirksame Menge eines Antikörpers aufweist, der mit einem zytotoxischen und/oder therapeutischen Agens konjugiert ist.

[0155] Eine Krebsimmuntherapie unter Verwendung von Anti-84P2A9-Antikörper kann nach verschiedenen Ansätzen erfolgen, die bei der Behandlung anderer Arten von Krebs erfolgreich angewandt worden sind, einschließlich unter anderem Kolonkrebs (Arien et al., 1998, Crit Rev. Immunol. 18: 133–138), multiples Myelom (Ozaki et al., 1997, Blood 90: 3179–3186, Tsunenari et al., 1997, Blood 90: 2437–2444), Magenkrebs (Kasprzyk et al., 1992, Cancer Res. 52: 2771–2776), B-Zelllymphom (Funakoshi et al., 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19: 93–101), Leukämie (Zhong et al., 1996, Leuk. Res. 20: 581–589), Kolorektalkrebs (Moun et al., 1994, Cancer Res. 54: 6160–6166; Velders et al., 1995, Cancer Res. 55: 4398–4403) und Brustkrebs (Shepard et al., 1991, J. Clin. Immunol. 11: 117–127). Einige therapeutische Ansätze umfassen das Konjugieren eines nackten Antikörpers mit einem Toxin, beispielsweise das Konjugieren von ¹³¹I mit Anti-CD20-Antikörpern (z. B. RituxanTM, IDEC Pharmaceuticals Corp.), während andere die gemeinsame Verabreichung von Antikörpern und anderen therapeutischen Stoffen umfassen, wie beispielsweise HerceptinTM (Trastuzumab) mit Paclitaxel (Genentech, Inc.). Zur Behandlung von Prostatakrebs können beispielsweise 84P2A9-Antikörper in Verbindung mit Bestrahlung, Chemotherapie oder Hormonablation verabreicht werden.

[0156] Obgleich eine Therapie mit 84P2A9-Antikörpern in allen Stadien einer Krebserkrankung anwendbar ist, kann eine Antikörpertherapie insbesondere bei fortgeschrittenen oder metastasierten Krebserkrankungen geeignet sein. Die Behandlung mit der erfindungsgemäßen Antikörpertherapie ist für Patienten angezeigt, die mindestens einen Zyklus einer Chemotherapie erhalten haben, während eine Antikörpertherapie bei Patienten, die keine chemotherapeutische Behandlung erhalten haben, mit einer chemotherapeutischen oder strahlentherapeutischen Behandlung kombiniert. Darüber hinaus kann eine Antikörpertherapie die Anwendung reduzierter Dosierungen einer begleitenden Chemotherapie ermöglichen, insbesondere bei Patienten, die die Toxizität des Chemotherapeutikums nicht besonders gut vertragen.

[0157] Bei manchen Krebspatienten ist es erwünscht, eine Untersuchung hinsichtlich des Vorhandenseins und des Grades der Expression von 84P2A9 vorzunehmen, vorzugsweise unter Zuhilfenahme immunhistochemischer Untersuchungen von Tumorgewebe, quantitativer 84P2A9-Bildgebung oder anderer Techniken, welche das Vorhandensein und den Grad der 84P2A9-Expression zuverlässig anzeigen. Für diesen Zweck wird die immunhistochemische Analyse von Tumorbiospien oder chirurgischen Proben bevorzugt. Verfahren zur immunhistochemischen Analyse von Tumorgeweben sind aus dem Stand der Technik wohlbekannt.

[0158] Monoklonale Anti-84P2A9-Antikörper, die für die Behandlung von Prostatakrebs und anderer Krebserkrankungen geeignet sind, umfassen solche, die eine potente Immunantwort gegen den Tumor auslösen, oder solche, die direkt zytotoxisch sind. Diesbezüglich können monoklonale Anti-84P2A9-Antikörper (mAbs) die Tumorzelllyse entweder durch Mechanismen der komplementvermittelten oder der antikörperabhängigen Zytotoxizität (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity, ADCC) hervorrufen, die beide für die Interaktion mit Fc-Rezeptorstellen der Effektorzelle auf Komplementproteinen einen intakten Fc-Anteil des Immunglobulinmoleküls

benötigen. Darüber hinaus sind Anti-84P2A9-mAbs, die eine direkte biologische Wirkung auf das Tumorstadium ausüben, in der Anwendung dieser Erfindung von Nutzen. Mögliche Mechanismen, über die solche zytotoxischen mAbs direkt wirken, können Folgende umfassen: Hemmung des Zellwachstums, Modulierung der Zelldifferenzierung, Modulierung der Tumorangiogenesefaktorprofile und die Induktion von Apoptose. Der Mechanismus, über den ein bestimmter Anti-84P2A9-mAb eine gegen einen Tumor gerichtete Wirkung ausübt, wird anhand einer beliebigen Anzahl von In-vitro-Tests zur Untersuchung von Zelltod bestimmt, wie beispielsweise ADCC, ADMMC, komplementvermittelte Zellyse und so weiter, wie im Stand der Technik allgemein bekannt ist.

[0159] Bei manchen Patienten kann die Anwendung muriner oder sonstiger nicht-humaner monoklonaler Antikörper oder von chimären Mensch/Maus-mAbs mittelstarke bis starke Immunreaktionen auslösen. Dies kann in manchen Fällen dazu führen, dass der Antikörper aus dem Blutkreislauf entfernt und die Wirksamkeit reduziert wird. In den meisten schweren Fällen kann eine solche Immunreaktion zur extensiven Ausbildung von Immunkomplexen führen, die potenziell zu Nierenversagen führen können. Entsprechend sind in der Anwendung der erfindungsgemäßen therapeutischen Verfahren solche monoklonalen Antikörper bevorzugt, die entweder gänzlich human oder humanisiert sind und die an das 84P2A9-Zielantigen spezifisch und mit hoher Affinität binden, aber in dem Patienten geringe oder keine Antigenität aufweisen.

[0160] Therapeutische Verfahren der Erfindung erwägen die Verabreichung eines einzelnen Anti-84P2A9-Antikörpers sowie von Kombinationen bzw. Cocktails verschiedener mAbs. Solche mAb-Cocktails können gewisse Vorteile aufweisen, insofern sie mAbs enthalten, die verschiedene Zielepitope haben, verschiedene Effektormechanismen nutzen oder direkt zytotoxische mAbs mit mAbs kombinieren, die auf Immuneffektorfunktionalität beruhen. In Kombination können solche mAbs synergistische therapeutische Wirkungen aufweisen. Darüber hinaus können Anti-84P2A9-mAbs mit anderen therapeutischen Modalitäten kombiniert werden, einschließlich unter anderem mit verschiedenen Chemotherapeutika, Androgenblockern und Immunmodulatoren (z. B. IL-2, GM-CSF). Die Anti-84P2A9-mAbs werden in ihrer „nackten“ bzw. unkonjugierten Form verabreicht oder sind mit therapeutischen Stoffen konjugiert.

[0161] Die Anti-84P2A9-Antikörperformulierungen werden auf jedem Weg verabreicht, der die Antikörper an eine Tumorstelle abgeben kann. Potenziell wirksame Verabreichungswege umfassen unter anderem intravenös, intraperitoneal, intramuskulär, in den Tumor, intradermal und dergleichen. Die Behandlung umfasst generell eine wiederholte Verabreichung der Anti-84P2A9-Antikörperzubereitung über einen akzeptablen Verabreichungsweg, wie beispielsweise durch intravenöse Injektion (i. v.), typischerweise in einer Dosis im Bereich von etwa 0,1 bis etwa 10 mg/kg Körpergewicht. Im Allgemeinen sind Dosen im Bereich von 10–500 mg mAb pro Woche wirksam und gut verträglich.

[0162] Ausgehend von der klinischen Erfahrung mit dem mAb Herceptin bei der Behandlung von metastasiertem Brustkrebs stellt eine anfängliche Aufsättigungsdosis von etwa 4 mg/kg Patientenkörpergewicht i. v., gefolgt von wöchentlichen Dosen von etwa 2 mg/kg i. v., der Anti-84P2A9-mAb-Zubereitung ein akzeptables Dosierungsregime dar. Vorzugsweise wird die anfängliche Aufsättigungsdosis als Infusion über mindestens 90 Minuten verabreicht. Die periodische Erhaltungsdosis wird als Infusion über mindestens 30 Minuten verabreicht, vorausgesetzt, die erste Dosis wurde gut vertragen. Wie einem Fachmann bekannt ist, kann das ideale Dosierungsregime im jeweiligen Fall von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden. Dazu gehören beispielsweise die Bindungsaffinität und die Halbwertszeit des verwendeten Ab bzw. der verwendeten mAbs, der Grad der 84P2A9-Expression in dem Patienten, wie viel abgeschiedenes 84P2A9-Antigen im Blutkreislauf vorhanden ist, die gewünschte Antikörperkonzentrationsstufe im Gleichgewichtszustand, die Behandlungshäufigkeit und der Einfluss von Chemotherapeutika oder anderen Stoffen, die in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Behandlungsverfahren angewandt werden, sowie der Gesundheitszustand des jeweiligen Patienten.

[0163] Gegebenenfalls sollten die Patienten hinsichtlich der Menge an 84P2A9 in einer bestimmten Probe untersucht werden (z. B. hinsichtlich der Menge an zirkulierendem 84P2A9-Antigen und/oder an Zellen, die 84P2A9 exprimieren), um die Bestimmung des wirksamsten Dosierungsregimes und verwandter Faktoren zu unterstützen. Solche Untersuchungen werden auch zu Überwachungszwecken während der Behandlung angewandt und sind geeignet, um den Therapieerfolg in Kombination mit der Untersuchung anderer Parameter (wie beispielsweise den PSA-Serumspiegel bei der Therapie von Prostatakrebs) zu messen.

Hemmung der Funktion des 84P2A9-Proteins

[0164] Innerhalb der ersten Klasse von Therapieansätzen umfasst die Erfindung verschiedene Verfahren und Zusammensetzungen für die Hemmung der Bindung von 84P2A9 an seinen Bindungspartner oder seine As-

soziation mit einem oder mehreren anderen Proteinen sowie Verfahren zum Hemmen der Funktion von 84P2A9.

Hemmung von 84P2A9 mit intrazellulären Antikörpern

[0165] In einem Ansatz werden rekombinante Vektoren, die einzelkettige Antikörper kodieren, welche an 84P2A9 spezifisch binden, über Gentransfertechnologien in 84P2A9 exprimierende Zellen eingeführt, wobei der kodierte einzelkettige Anti-84P2A9-Antikörper intrazellulär exprimiert wird, an das 84P2A9-Protein bindet und dadurch seine Funktion hemmt. Verfahren zum gentechnischen Herstellung solcher intrazellulärer Einzelkettenantikörper sind wohlbekannt. Solche intrazellulären Antikörper, auch als „Intrabodies“ bekannt, sind spezifisch auf ein bestimmtes Kompartiment in der Zelle gerichtet, was eine Kontrolle über den Schwerpunkt der inhibitorischen Aktivität der Behandlung bietet. Diese Technologie wurde im Stand der Technik erfolgreich angewandt (zur Übersicht siehe Richardson and Marasco, 1995, TIBTECH Vol. 13). Intrabodies bewirken nachweislich praktisch eine Eliminierung der Expression von ansonsten zahlreich vorhandenen Zelloberflächenrezeptoren (siehe z. B. 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).

[0166] Einzelkettenantikörper umfassen die variablen Domänen der schweren und der leichten Kette, die mit einem flexiblen Linkerpolypeptid verknüpft sind, und werden als einzelnes Polypeptid exprimiert. Gegebenenfalls werden Einzelkettenantikörper als einzelkettiges Fragment der variablen Region exprimiert, das mit der konstanten Region der leichten Kette verknüpft ist. In rekombinante Polynukleotidvektoren, die solche Einzelkettenantikörper kodieren, werden wohlbekannte intrazelluläre Trafficking-Signale gentechnisch eingefügt, um den Intrabody präzise und gezielt in das gewünschte intrazelluläre Kompartiment zu steuern. Beispielsweise werden in Intrabodies für das endoplasmatische Retikulum (ER) gentechnisch ein Leader-Peptid und gegebenenfalls ein C-terminales ER-Retentionssignal eingebaut, wie beispielsweise das KDEL-Aminosäuremotiv. Intrabodies, die im Kern aktiv sein sollen, erhalten gentechnisch ein Kernlokalisierungssignal. Um den Intrabody an die zytosolische Seite der Plasmamembran zu binden, werden Lipideinheiten mit Intrabodies verknüpft. Intrabodies können auch auf eine Funktion im Zytosol ausgerichtet sein. Beispielsweise werden zytosolische Intrabodies verwendet, um Faktoren im Zytosol abzusondern und sie so daran zu hindern, an ihren natürlichen Bestimmungsort in der Zelle transportiert zu werden.

[0167] In einer Ausführungsform werden Intrabodies verwendet, um 84P2A9 im Kern zu fangen, wodurch seine Aktivität im Kern verhindert wird. In solche 84P2A9-Intrabodies werden Signale gentechnisch eingebaut, die auf den Kern ausgerichtet sind, um das gewünschte Targeting zu erreichen. Solche 84P2A9-Intrabodies sind ausgelegt, um spezifisch an eine bestimmte 84P2A9-Domäne zu binden. In einer anderen Ausführungsform werden zytosolische Intrabodies verwendet, die spezifisch an das 84P2A9-Protein binden, um zu verhindern, dass 84P2A9 in den Kern gelangt, wodurch verhindert wird, dass es im Kern biologisch aktiv ist (z. B. wird verhindert, dass 84P2A9 Transkriptionskomplexe mit anderen Faktoren bildet).

[0168] Um die Expression solcher Intrabodies spezifisch auf spezifisch bestimmte Zellen zu richten, wird die Transkription des Intrabodies unter die regulatorische Kontrolle eines geeigneten tumorspezifischen Promotors und/oder Enhancers gestellt. Um eine spezifische Intrabody-Expression in der Prostata zu erreichen, können beispielsweise der PSA-Promotor und/oder -Promotor/Enhancer verwendet werden (siehe z. B. US 5 919 652 A).

Hemmung von 84P2A9 mit rekombinanten Proteinen

[0169] Bei einem anderen Ansatz werden rekombinante Moleküle verwendet, um die Funktion von 84P2A9 zu hemmen. Diese rekombinanten Moleküle verhindern oder hemmen, dass 84P2A9 Zugang zu seine(m)(n) Bindungspartner(n) erhält/an seine(n) Bindungspartner bindet oder mit anderen Proteinen assoziiert. Solche rekombinanten Moleküle können beispielsweise den bzw. die reaktiven Teil(e) eines spezifischen 84P2A9-Antikörpermoleküls enthalten. In einer bestimmten Ausführungsform wird die 84P2A9-Bindungsdomäne eines 84P2A9-Bindungspartners gentechnisch in ein dimeres Fusionsprotein eingefügt, wodurch das Fusionsprotein zwei 84P2A9-Ligandenbindungsdomänen aufweist, die mit dem Fc-Anteil eines humanen IgG wie beispielsweise humanem IgG1 verknüpft sind. Ein solcher IgG-Anteil kann beispielsweise die CH2- und CH3-Domänen und die Scharnierregion enthalten, aber nicht die C_H1-Domäne. Solche dimeren Fusionsproteine werden in löslicher Form an Patienten verabreicht, die an einer Krebserkrankung leiden, welche mit der Expression von 84P2A9 assoziiert ist, einschließlich unter anderem Prostata- und Hodenkarzinomen, wobei das dimere Fusionsprotein spezifisch an 84P2A9 bindet und die Interaktion von 84P2A9 mit einem Bindungspartner blockiert. Solche dimeren Fusionsproteine werden weiter zu multimeren Proteinen kombiniert, wobei bekannte Antikör-

pervernetzungstechnologien zur Anwendung kommen.

Hemmung der Transkription oder Translation von 84P2A9

[0170] Innerhalb der zweiten Klasse von Therapieansätzen stellt die Erfindung verschiedene Verfahren und Zusammensetzungen für die Hemmung der Transkription des 84P2A9-Gens bereit. Entsprechend stellt die Erfindung überdies Verfahren und Zusammensetzungen für die Hemmung der Translation von 84P2A9-mRNA zu einem Protein bereit.

[0171] Bei einem Ansatz umfasst ein Verfahren für das Hemmen der Transkription des 84P2A9-Gens das Inkontaktbringen des 84P2A9-Gens mit einem 84P2A9-Antisense-Polynukleotid. Bei einem anderen Ansatz umfasst ein Verfahren für das Hemmen der Translation von 84P2A9-mRNA das Inkontaktbringen der 84P2A9-mRNA mit einem Antisense-Polynukleotid. Bei einem weiteren Ansatz wird ein für 84P2A9 spezifisches Ribozym verwendet, um die 84P2A9-mRNA zu spalten und somit deren Translation zu hemmen. Solche Antisense- und Ribozym-basierten Verfahren können auch auf die regulatorischen Regionen des 84P2A9-Gens ausgerichtet sein, wie beispielsweise auf die Promotor- und/oder Enhancerelemente von 84P2A9. Entsprechend werden Proteine, die einen 84P2A9-Gentranskriptionsfaktor hemmen können, verwendet, um die Transkription von 84P2A9-mRNA zu hemmen. Die verschiedenen Polynukleotide und Zusammensetzungen, die bei den oben erwähnten Verfahren nützlich sind, sind oben beschrieben. Die Verwendung von Antisense- und Ribozymmolekülen zur Hemmung von Transkription und Translation ist aus dem Stand der Technik wohlbekannt.

[0172] Es sind auch andere Faktoren, welche die Transkription von 84P2A9 hemmen, indem sie in die transkriptionelle Aktivierung von 84P2A9 eingreifen, geeignet, um Karzinome zu behandeln, die 84P2A9 exprimieren. Entsprechend sind Faktoren, die in die Prozessierung von 84P2A9 eingreifen, geeignet, um Karzinome zu behandeln, die 84P2A9 exprimieren. Krebsbehandlungsverfahren, bei denen solche Faktoren verwendet werden, sind im Rahmen der Erfindung ebenfalls enthalten.

Allgemeine Überlegungen zu therapeutischen Strategien

[0173] Gentransfer und Gentherapietechnologien können verwendet werden, um therapeutische Polynukleotidmoleküle an Tumorzellen abzugeben, die 84P2A9 synthetisieren (d. h. Antisense, Ribozym, Intrabodies kodierende Polynukleotide und andere 84P2A9 hemmende Moleküle). Aus dem Stand der Technik ist eine Anzahl von Gentherapieansätzen bekannt. Mithilfe solcher Gentherapieansätze können rekombinante Vektoren, die 84P2A9-Antisense-Polynukleotide kodieren, Ribozyme, zum Eingreifen in die Transkription von 84P2A9 geeignete Faktoren und so weiter an Tumorzellen abgegeben werden.

[0174] Die obigen therapeutischen Ansätze können mit einem beliebigen aus einem breiten Spektrum an chirurgischen, chemotherapeutischen oder strahlentherapeutischen Therapieregimes kombiniert werden. Diese therapeutischen Ansätze können die Anwendung reduzierter Dosierungen einer Chemotherapie und/oder eine weniger häufige Verabreichung ermöglichen, was ein Vorteil für alle Patienten und insbesondere für solche ist, welche die Toxizität des Chemotherapeutikums nicht gut vertragen.

[0175] Die gegen den Tumor gerichtete Aktivität einer bestimmten Zusammensetzung (z. B. Antisense, Ribozym, Intrabody) oder einer Kombination solcher Zusammensetzungen lässt sich mit Hilfe verschiedener In-vitro- und In-vivo-Assaysysteme untersuchen. In-vitro-Assays, die therapeutische Aktivität untersuchen, umfassen Zellwachstumsassays, Weichagarassays und andere Assays, die eine tumorbegünstigende Aktivität anzeigen, Bindungsassays, die bestimmen können, in welchem Maß eine therapeutische Zusammensetzung die Bindung von 84P2A9 an einen Bindungspartner hemmt, etc.

[0176] In vivo kann der Effekt einer therapeutischen Zusammensetzung für 84P2A9 in einem geeigneten Tiermodell untersucht werden. Beispielsweise eignen sich in Bezug auf Prostatakrebs xenogene Prostatakrebsmodelle, bei denen humane Prostatakarzinomexplantate oder passagierte Xenograftgewebe in immunkompromitierte Tiere wie beispielsweise Nackt- oder SCID-Mäuse eingeführt werden; solche Modelle sind beschrieben worden (Klein et al., 1997, Nature Medicine 3: 402–408). Beispielsweise beschreibt die am 23. April 1998 veröffentlichte WO 98/16628 A1 (Sawyers et al.) verschiedene Xenograft-Modelle des Prostatakrebses des Menschen, welche die Entwicklung von Primärtumoren, Mikrometastasen und die Bildung von osteoblastischen Metastasen, die für eine Krankheit im Spätstadium kennzeichnend sind, wiedergeben können. Die Wirksamkeit kann anhand von Assays vorhergesagt werden, welche die Hemmung der Tumorbildung, der Tumoregression oder -metastasierung und dergleichen messen. Siehe auch die Beispiele unten. In-vivo-Assays,

welche die Begünstigung von Apoptose untersuchen, sind bei der Beurteilung therapeutischer Zusammensetzungen nützlich. In einer Ausführungsform können Xenografts von tumortragenden Mäusen, die mit der therapeutischen Zusammensetzung behandelt worden sind, hinsichtlich des Vorhandenseins apoptotischer Foci untersucht und mit unbehandelten Xenograft-tragenden Kontrollmäusen verglichen werden. Der Umfang, in dem apoptotische Foci in den Tumoren der behandelten Mäuse gefunden werden, liefert einen Hinweis auf die therapeutische Wirksamkeit der Zusammensetzung.

[0177] Die in der Anwendung der obigen Verfahren verwendeten therapeutischen Zusammensetzungen können zu pharmazeutischen Zusammensetzungen formuliert werden, welche einen für das gewünschte Verabreichungsverfahren geeigneten Träger aufweisen. Geeignete Träger umfassen jedes Material, das bei Kombination mit der therapeutischen Zusammensetzung die gegen den Tumor gerichtete Funktion der therapeutischen Zusammensetzung erhält und generell nicht mit dem Immunsystem des Patienten reagiert. Beispiele umfassen unter anderem einen beliebigen aus einer Anzahl von pharmazeutischen Standardträgerstoffen, wie beispielsweise sterile phosphatgepufferte Salzlösungen, bakteriostatisches Wasser und dergleichen (siehe generell Remington's Pharmaceutical Sciences 16. Auflage, A. Osal., Hrsg., 1980).

[0178] Therapeutische Formulierungen können gelöst und auf jede Art verabreicht werden, welche die therapeutische Zusammensetzung an die Stelle des Tumors abgibt. Potenziell effektive Verabreichungsarten umfassen unter anderem intravenös, parenteral, intraperitoneal, intramuskulär, in den Tumor, intradermal, in das Organ, orthotopisch und dergleichen. Eine bevorzugte Formulierung zur intravenösen Injektion umfasst die therapeutische Zusammensetzung einer Lösung aus konserviertem, bakteriostatischem Wasser, sterilem, nicht konserviertem Wasser und/oder verdünnt in Polyvinylchlorid- oder Polyethylenbeuteln, die eine Injektionslösung aus 0,9%igem sterilem Natriumchlorid, USP, enthalten. Therapeutische Proteinzubereitungen können lyophilisiert und als sterile Pulver aufbewahrt werden, vorzugsweise unter Vakuum, und anschließend vor der Injektion in bakteriostatischem Wasser (das beispielsweise Benzylalkohol als Konservierungsmittel enthält) oder in sterilem Wasser rekonstituiert werden.

[0179] Dosierungen und Verabreichungsprotokolle für die Behandlung von Krebserkrankungen mit den obigen Verfahren variieren je nach Verfahren und der zu behandelnden Krebserkrankung und richten sich generell nach einer Reihe weiterer Faktoren, die aus dem Stand der Technik bekannt sind.

KREBSIMPFSTOFFE

[0180] Wie oben angegeben, zeigt das Expressionsprofil von 84P2A9, dass es bei fortgeschrittenem und metastasiertem Prostatakarzinom in hohem Maß exprimiert wird. Dieses Expressionsprofil erinnert an die Cancer-Testis-Antigene (CT-Antigene, Krebs-Hoden-Antigene) oder MAGE-Antigene, bei denen es sich um hodenspezifische Gene handelt, die in Melanomen und anderen Krebserkrankungen hochreguliert sind (Van den Eynde and Boon, Int J Clin Lab Res. 27: 81–86, 1997). Wegen ihrer gewebespezifischen Expression und dem hohen Grad der Expression bei Krebs werden die MAGE-Antigene derzeit als Ziele für Krebsimpfstoffe untersucht (Durrant, Anticancer Drugs 8: 727–733, 1997; Reynolds et al., Int J Cancer 72: 972–976, 1997).

[0181] Die Erfindung stellt des Weiteren Krebsimpfstoffe bereit, welche ein mit 84P2A9 verwandtes Protein oder Fragmente umfassen, sowie DNA-basierte Impfstoffe. In Anbetracht der Expression von 84P2A9 betrifft die Wirkung von Krebsimpfstoffen spezifisch die Prävention und/oder das Behandeln von 84P2A9 exprimierenden Karzinomen, ohne unspezifische Wirkung auf Nicht-Zielgewebe zu erzeugen. Die Verwendung eines Tumorantigens in einem Impfstoff zum Erzeugen einer humoralen und zellvermittelten Immunität zur Anwendung bei der Antikrebstherapie ist aus dem Stand der Technik wohlbekannt und wurde bei Prostatakrebs eingesetzt, indem PSMA-Immunogene des Menschen und PAP-Immungene von Nagern verwendet wurden (Hodge et al., 1995, Int. J. Cancer 63: 231–237; Fang et al., 1997, J. Immunol. 159: 3113–3117).

[0182] Solche Verfahren können einfach angewendet werden, indem ein 84P2A9-Protein oder ein Fragment davon oder ein 84P2A9 kodierendes Nukleinsäuremolekül und rekombinante Vektoren eingesetzt werden, die das 84P2A9-Immungen (das typischerweise eine Reihe von gegen humorale Epitope oder T-Zell-Epitope immunreaktive Epitope aufweist) exprimieren und geeignet präsentieren können. In diesem Kontext weiß ein Fachmann, dass viele verschiedene Impfstoffsysteme zur Verabreichung immunreaktiver Epitope aus dem Stand der Technik bekannt sind (siehe z. B. Heryln et al., Ann Med 1999 Feb; 31(1): 66–78; Maruyama et al., Cancer Immunol Immunother 2000 Jun; 49(3): 123–32). Kurz beschrieben, besteht eine solche Technik aus Verfahren des Erzeugens einer Immunreaktion (z. B. einer humoralen und/oder zellvermittelten Reaktion) in einem Säuger, welches die Schritte des Aussetzen des Immunsystems des Säugers gegenüber einem immunreaktiven Epitop (z. B. einem Epitop des in SEQ ID Nr.: 2 gezeigten 84P2A9-Proteins) umfasst, so dass der

Säuger eine Immunreaktion erzeugt, die für dieses Epitop spezifisch ist (z. B. Antikörper erzeugt, die dieses Epitop spezifisch erkennen). In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das 84P2A9-Immungen ein biologisches Motiv. In einer äußerst bevorzugten Ausführungsform enthält das 84P2A9-Immungen mindestens eine Aminosäuresequenz, die unter Anwendung einer der entsprechenden aus dem Stand der Technik bekannten Analysetechniken identifiziert wurde, wie beispielsweise die in Tabelle 1 gezeigten Sequenzen.

[0183] Aus dem Stand der Technik ist ein breites Spektrum an Verfahren zum Erzeugen einer Immunreaktion in einem Säuger bekannt (beispielsweise als erster Schritt bei der Erzeugung von Hybridomen). Verfahren des Erzeugens einer Immunreaktion in einem Säuger umfassen das Aussetzen des Immunsystems des Säugers gegenüber einem exogenen immunogenen Epitop auf einem Protein (z. B. dem 84P2A9-Protein von SEQ ID Nr.: 2), so dass eine Immunreaktion hervorgerufen wird. Eine typische Ausführungsform besteht aus einem Verfahren zum Erzeugen einer Immunreaktion gegen 84P2A9 in einem Wirt, indem der Wirt mit einer ausreichenden Menge von 84P2A9 oder Epitop, das eine Reaktion seitens von B-Zellen oder zytotoxischer T-Zellen induziert, oder einem Analog davon in Kontakt gebracht wird und der Wirt anschließend nach mindestens einem periodischen Intervall mit weiterem 84P2A9 oder einem Epitop, das eine Reaktion seitens von B-Zellen oder zytotoxischer T-Zellen induziert, oder einem Analog davon in Kontakt gebracht wird. Eine spezifische Ausführungsform besteht aus einem Verfahren des Erzeugens einer Immunreaktion gegen ein 84P2A9-Protein oder ein multiepitopes Peptid, welches das Verabreichen eines 84P2A9-Immungen (z. B. des 84P2A9-Proteins oder eines Peptidfragments davon, eines 84P2A9-Fusionsproteins, etc.) in einer Impfstoffzubereitung an Menschen oder Tiere umfasst. Solche Impfstoffzubereitungen enthalten darüber hinaus typischerweise ein geeignetes Adjuvans (siehe z. B. US 6 146 635 A). Eine stellvertretende Variante dieser Verfahren besteht aus einem Verfahren des Erzeugens einer Immunreaktion in einem Individuum gegen ein 84P2A9-Immungen, welches das Verabreichen einer einen genetischen Impfstoff unterstützenden Substanz, wie beispielsweise eine, die aus der Gruppe ausgewählt ist, welche aus anionischen Lipiden, Saponinen, Lektinen, estrogenen Verbindungen, hydroxylierte niedere Alkyle, Dimethylsulfoxid und Harnstoff besteht, und eines DNA-Moleküls, das von einem infektiösen Agens dissoziiert ist und eine DNA-Sequenz aufweist, die das 84P2A9-Immungen kodiert, in vivo in Muskeln oder die Haut des Körpers des Individuums umfasst, wobei die DNA-Sequenz operativ mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, welche die Expression der DNA-Sequenz kontrollieren, wobei das DNA-Molekül von Zellen aufgenommen wird, die DNA-Sequenz in den Zellen exprimiert und gegen das Immungen eine Immunreaktion erzeugt wird (siehe z. B. US 5 962 428 A).

[0184] In einem veranschaulichenden Beispiel eines spezifischen Verfahrens zum Erzeugen einer Immunreaktion werden virale Genabgabesysteme verwendet, um ein 84P2A9 kodierendes Nukleinsäuremolekül zu verabreichen. Verschiedene virale Genabgabesysteme, die in der Ausübung der Erfindung verwendet werden können, umfassen unter anderem Kuhpocken (Vakzinia), Hühnerpocken (Fowlpox), Kanarienvpocken (Canarypox), Adenovirus, Influenza, Poliovirus, Adeno-assoziiertes Virus, Lentivirus und Sindbusvirus (Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658–663). Es können auch nicht-virale Abgabesysteme verwendet werden, indem nackte DNA, die ein 84P2A9-Protein oder ein Fragment davon kodiert, in den Patienten eingeführt wird (z. B. intramuskulär oder intradermal), um eine Reaktion gegen den Tumor zu induzieren. In einer Ausführungsform wird die humane 84P2A9-cDNA in voller Länge verwendet. In einer anderen Ausführungsform können 84P2A9-Nukleinsäuremoleküle verwendet werden, die spezifische Epitope für zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) kodieren. ZTL-Epitope können mit spezifischen Algorithmen (z. B. Epimer, Brown University) bestimmt werden, um Peptide in einem 84P2A9-Protein zu identifizieren, die optimal an bestimmte HLA-Allele binden können.

[0185] Es können auch verschiedene Ex-vivo-Strategien angewandt werden. Ein Ansatz beinhaltet die Verwendung von dendritischen Zellen, um ein 84P2A9-Antigen dem Immunsystem eines Patienten zu präsentieren. Dendritische Zellen exprimieren MHC-Klasse-I- und -II-Moleküle, B7-Costimulator und IL-12 und sind damit hoch spezialisierte Antigen präsentierende Zellen. Bei Prostatakrebs werden in einer klinischen Phase-I-Prüfung mit Peptiden des prostataspezifischen Membranantigens (PSMA) gepulste, autologe dendritische Zellen verwendet, um das Immunsystem der Prostatakrebspatienten zu stimulieren (Tjoa et al., 1996, Prostate 28: 65–69; Murphy et al., 1996, Prostate 29: 371–380). Dendritische Zellen können somit verwendet werden, um 84P2A9-Peptide im Kontext von MHC-Klasse-I- oder -II-Molekülen T-Zellen zu präsentieren. In einer Ausführungsform werden autologe dendritische Zellen mit 84P2A9-Peptiden gepulst, die an MHC-Klasse-I- und/oder -Klasse-II-Moleküle binden können. In einer anderen Ausführungsform werden dendritische Zellen mit dem kompletten 84P2A9-Protein gepulst. Eine weitere Ausführungsform umfasst die gentechnisch erzeugte Überexpression des 84P2A9-Gens in dendritischen Zellen mit Hilfe verschiedener Implementierungsvektoren aus dem Stand der Technik, wie beispielsweise Adenovirus (Arthur et al., 1997, Cancer Gene Ther. 4: 17–25), Retrovirus (Henderson et al., 1996, Cancer Res. 56: 3763–3770), Lentivirus, Adeno-assoziiertes Virus, DNA-Transfektion (Ribas et al., 1997, Cancer Res. 57: 2865–2869) oder Transfektion von aus dem Tumor

stammender RNA (Ashley et al., 1997, J. Exil. Med. 186: 1177–1182). Zellen, die 84P2A9 exprimieren, können außerdem gentechnisch verändert werden, um Immunmodulatoren wie beispielsweise GM-CSF zu exprimieren, und als Immunisierungsmittel eingesetzt werden.

[0186] In der Antikrebstherapie können auch Anti-84P2A9-Antikörper vom Antiidiotyp als Impfstoff zur Induktion einer Immunantwort gegen ein 84P2A9-Protein exprimierende Zellen verwendet werden. Insbesondere die Erzeugung von Antiidiotyp-Antikörpern ist aus dem Stand der Technik wohlbekannt; diese Verfahrensweise lässt sich einfach anpassen, um Anti-84P2A9-Antikörper vom Antiidiotyp herzustellen, die ein Epitop auf einem 84P2A9-Protein nachahmen (siehe beispielsweise Wagner et al., 1997, Hybridoma 16: 33–40; Foon et al., 1995, J. Clin. Invest 96: 334–342; Herlyn et al., 1996, Cancer Immunol. Immunother. 43: 65–76). Ein solcher Antiidiotyp-Antikörper kann bei Krebsimpfstoffstrategien verwendet werden.

[0187] Zur Erzeugung prophylaktischer oder therapeutischer humoraler und zellulärer Immunreaktionen gegen Krebszellen, die 84P2A9 exprimieren, können genetische Immunisierungsverfahren angewendet werden. Konstrukte, die DNA aufweisen, welche ein mit 84P2A9 verwandtes Protein/Immunogen kodiert, und geeignete regulatorische Sequenzen können direkt in die Muskulatur oder die Haut eines Individuums injiziert werden, so dass die Zellen des Muskels bzw. der Haut das Konstrukt aufnehmen und das kodierte 84P2A9-Protein/Immunogen exprimieren. Alternativ weist ein Impfstoff ein mit 84P2A9 verwandtes Protein auf. Die Expression des 84P2A9-Proteinimmunogens bewirkt die Erzeugung einer prophylaktischen oder therapeutischen humoralen und zellulären Immunität gegen Knochen-, Kolon-, Pankreas-, Hoden-, Zervix- und Eierstockkarzinome. Es können verschiedene, aus dem Stand der Technik bekannte prophylaktische und therapeutische genetische Immunisierungstechniken angewendet werden (für einen Überblick siehe die Informationen und Bezugsverweise, die unter der Internetadresse www.genweb.com veröffentlicht sind).

KITS

[0188] Die Erfindung stellt außerdem Kits für den Gebrauch in den hierin beschriebenen diagnostischen und therapeutischen Anwendungen bereit. Solche Kits können einen Träger aufweisen, der mit Kompartimenten versehen sind, um mindestens einen Behälter wie beispielsweise Fläschchen, Röhrchen und dergleichen aufzunehmen, wobei jeder Behälter eines der in dem Verfahren zu verwendenden separaten Elemente aufweist. Beispielsweise können der oder die Behälter eine Sonde aufweisen, die detektierbar gelabelt ist oder gelabelt werden kann. Bei einer solchen Sonde kann es sich um einen Antikörper bzw. um ein Polynukleotid handeln, das für ein mit 84P2A9 verwandtes Protein bzw. ein 84P2A9-Gen oder eine 84P2A9-mRNA spezifisch ist. Wenn das Verfahren Nukleinsäurehybridisierung anwendet, um die Zielnukleinsäure zu detektieren, kann das Kit auch Behälter aufweisen, die mindestens ein Nukleotid für die Amplifizierung der Zielnukleinsäure enthalten, und/oder einen Behälter, der ein Reportermittel wie beispielsweise ein Biotinbindungsprotein wie beispielsweise Avidin oder Streptavidin, gebunden an ein Reportermolekül wie beispielsweise ein Enzym-, Fluoreszenz- oder Radioisotop-Label, umfasst.

[0189] Das erfindungsgemäße Kit umfasst typischerweise den oben beschriebenen Behälter und mindestens einen weiteren Behälter, der Material aufweist, welches vom kommerziellen Standpunkt und vom Standpunkt des Anwenders aus wünschenswert ist, einschließlich Puffer, Verdünnungsmittel, Filter, Kanülen, Spritzen und Packungsbeilagen mit Gebrauchsanleitungen. Auf dem Behälter kann ein Etikett vorhanden sein, um darauf hinzuweisen, dass die Zusammensetzung für eine spezifische Therapie oder für eine nicht-therapeutische Anwendung verwendet wird, und es kann auch Anleitungen für den Gebrauch in vivo oder in vitro angeben, wie beispielsweise die oben beschriebenen.

[0190] p84P2A9-1 wurde nach den Anforderungen des Budapestervertrags am 6. Januar 2000 bei der American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA, hinterlegt und erhielt als Kennung die ATCC-Zugangsnummer PTA-1151.

BEISPIELE

[0191] Nachfolgend sind verschiedene Aspekte der Erfindung anhand von verschiedenen Beispielen näher erläutert und veranschaulicht, von welchen keines eine einschränkende Wirkung auf den Schutzbereich der Erfindung beiztzt.

Beispiel 1: Isolierung eines cDNA-Fragmentes des 84P2A9-Gens mittels SSH

Material und Verfahren

LAPC-Xenografts und Humangewebe:

[0192] LAPC-Xenografts wurden erhalten von Dr. Charles Sawyers (UCLA) und wie beschrieben generiert (Klein et al., 1997, Nature Med. 3; 402–408). Androgenabhängige und -unabhängige LAPC-4-Xenografts (LAPC-4 AD bzw. AI) und LAPC-9-Xenografts (LAPC-9 AD bzw. AI) wuchsen in männlichen SCID-Mäusen und wurden als kleine Gewebestücke in die männlichen Empfängertiere übertragen. LAPC-4 AI-Xenografts entstanden aus LAPC-4 AD-Tumoren und LAPC-9 AI-Xenografts aus LAPC-9 AD-Tumoren. Männliche Mäuse mit AD-Tumoren wurden kastriert und 2–3 Monate gehalten. Nachdem die Tumoren ihr Wachstum wiederaufgenommen hatten, wurden die Tumoren entnommen und in kastrierte männliche oder weibliche SCID-Mäuse übertragen. Humangewebe für RNA- und Proteinanalysen stammten aus dem Human Tissue Resource Center (HTRC) an der UCLA (Los Angeles, CA, USA) und von QualTek, Inc. (Santa Barbara, CA). Eine Gewebeprobe einer benignen Prostatahyperplasie stammte aus einem Patienten.

Zelllinien:

[0193] Humane Zelllinien (z. B. HeLa) stammten aus der ATCC und wurden in DMEM mit 5% fetalem Kälberserum gehalten.

RNA-Isolierung:

[0194] Tumorgewebe und Zelllinien wurden in Trizol-Reagens homogenisiert (Life Technologies, Gibco BRL), wobei zur Isolierung von Gesamt-RNA 10 ml/g Gewebe oder 10 ml/10⁸ Zellen verwendet wurde. Aus Gesamt-RNA wurde mit Hilfe der Oligotex mRNA Mini- und Midi-Kits von Qiagen Poly A-RNA gereinigt. Gesamt-RNA und mRNA wurden spektrophotometrisch quantifiziert (O. D. 260/280 nm) und gelelektrophoretisch analysiert.

Oligonukleotide:

[0195] Es wurden die folgenden HPLC-gereinigten Oligonukleotide verwendet.

DPNCDN (cDNA-Synthesis-Primer):

5'TTTTGATCAAGCTT₃₀3' (SEQ ID Nr.: 7)

Adapter 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCCGGGCAG3'

(SEQ ID Nr.: 8)

3'GGCCCGTCCTAG3' (SEQ ID Nr.: 9)

Adapter 2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3'

(SEQ ID Nr.: 10)

3'CGGCTCTAG5' (SEQ ID Nr.: 11)

PCR-Primer 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (SEQ ID Nr.: 12)

Nested Primer (NP) 1:

5'TCGAGCGGCCGCCCCGGGCAGGA3' (SEQ ID Nr.: 13)

Nested Primer (NP) 2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (SEQ ID Nr.: 14)

Suppression Subtractive Hybridization:

[0196] Das Verfahren der Suppression Subtractive Hybridization (SSH) wurde verwendet, um cDNAs zu identifizieren, die Genen entsprechen, welche bei Prostatakrebs möglicherweise differenziell exprimiert werden. Die SSH-Reaktion verwendete cDNA aus zwei LAPC-4 AD-Xenografts. Insbesondere wurde die 84P2A9-SSH-Sequenz bei einer Subtraktion identifiziert, bei der cDNA aus einem LAPC-4 AD-Tumor 3 Tage nach der Kastration von cDNA subtrahiert wurde, die aus einem LAPC-4 AD-Tumor eines intakten männlichen Tiers stammte. Der LAPC-4 AD-Xenografttumor, der in einem intakten männlichen Tier wuchs, wurde als Quelle der „Tester“-cDNA verwendet, während die cDNA aus dem LAPC-4 AD-Tumor 3 Tage nach der Kastration als Quelle der „Driver“-cDNA verwendet wurde.

[0197] Doppelsträngige cDNAs, die der Tester- bzw. der Driver-cDNA entsprachen, wurden aus 2 µg poly(A)⁺-RNA synthetisiert, die aus relevantem Xenograft-Gewebe wie oben beschrieben isoliert wurde, wobei das PCR-Select cDNA-Selektionskit von CLONTECH und 1 ng des Oligonukleotids DPNCDN als Primer verwendet wurden. Die Synthese des ersten und des zweiten Stranges erfolgte nach der Beschreibung in der Gebrauchsanleitung des Kits (CLONTECH Protokoll Nr. PT1117-1, Artikel-Nr. K1804-1). Die resultierende cDNA wurde für 3 Std. bei 37°C mit Dpn II verdaut. Die verdaut cDNA wurde mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert und mit Ethanol ausgefällt.

[0198] Driver-cDNA wurde gewonnen, indem mit Dpn II verdaut cDNA aus dem relevanten Xenograft (siehe oben) mit einem Gemisch aus verdauten cDNAs, die aus einer humanen benignen Prostatahyperplasie (BPH), den menschlichen Zelllinien HeLa, 293, A431, Colo205 und Mausleber stammten, im Verhältnis 1:1 kombiniert wurde.

[0199] Tester-cDNA wurde gewonnen, indem 1 µl der mit Dpn II verdauten cDNA aus dem relevanten Xenograft (siehe oben) (400 ng) in 5 µl Wasser verdünnt wurde. Die verdünnte cDNA (2 µl, 160 ng) wurde anschließend mit 2 µl Adapter 1 und Adapter 2 (10 µM) in separaten Ligierungsreaktionen in einem Gesamtvolumen von 10 µl bei 16°C über Nacht und unter Verwendung von 400 Einheiten T4-DNA-Ligase (CLONTECH) ligiert. Die Ligation wurde mit 1 µl 0,2 M EDTA und 5-minütigem Erhitzen bei 72°C gestoppt.

[0200] Die erste Hybridisierung erfolgte durch Zugabe von je 1,5 µl (600 ng) Driver-cDNA zu zwei Röhrchen, die 1,5 µl (20 ng) Adapter-1- und Adapter-2-ligierte Tester-cDNA enthielten. Die Proben wurden in einem Endvolumen von 4 µl mit Mineralöl überschichtet, in einem Thermal Cycler von MJ Research bei 98°C für 1,5 Minuten denaturiert und konnten dann 8 Std. bei 68°C hybridisieren. Die beiden Hybridisierungen wurden dann zusammen gemischt, und es wurde ein weiterer Mikroliter frisch denaturierte Driver-cDNA zugegeben, woraufhin der Ansatz über Nacht bei 68°C hybridisieren konnte. Die zweite Hybridisierung wurde anschließend in 200 µl 20 mM HEPES, pH 8,3, 50 mM NaCl, 0,2 mM EDTA verdünnt, bei 70°C für 7 min erhitzt und bei -20°C aufbewahrt.

PCR Amplifizierung, Klonierung und Sequenzierung von Genfragmenten, die mit Hilfe von SSH gewonnen wurden:

[0201] Zur Amplifizierung von Genfragmenten aus SSH-Reaktionen wurden zwei PCR-Amplifikationen durchgeführt. Bei der primären PCR-Reaktion wurde 1 µl des verdünnten fertigen Hybridisierungsgemisches zu 1 µl

PCR-Primer (10 µM), 0,5 µl dNTP-Gemisch (10 µM), 2,5 µl 10 × Reaktionspuffer (CLONTECH) und 0,5 µl 50 × Advantage cDNA Polymerase Mix (CLONTECH) in einem Endvolumen von 25 µl gegeben. Die PCR 1 wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 75°C für 5 min, 94°C für 25 Sek., anschließend 27 Zyklen bei 94°C für 10 Sek., 66°C für 30 Sek., 72°C für 1,5 min. Je Experiment wurden fünf separate primäre PCR-Reaktionen durchgeführt. Die Produkte wurden gepoolt und 1:10 mit Wasser verdünnt. Für die sekundäre PCR-Reaktion wurde 1 µl der gepoolten und verdünnten primären PCR-Reaktion dem gleichen Reaktionsgemisch zugegeben, wie es auch für die PCR 1 verwendet wurde, außer, dass anstelle von PCR-Primer 1 die Primer NP1 und NP2 (10 µM) verwendet wurden. Die PCR 2 umfasste 10–12 Zyklen aus 94°C für 10 Sek., 68°C für 30 Sek. und 72°C für 1,5 Minuten. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im 2%igen Agarosegel analysiert.

[0202] Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe des T/A-Vektorklonierungskits (Invitrogen) in pCR2.1 eingesetzt. Transformierte E. coli wurden einer Blau/Weiß- und Ampicillin-Selektion unterzogen. Weiße Kolonien wurden gepickt und in Platten mit 96 Vertiefungen angeordnet und über Nacht in Flüssigkultur wachsen gelassen. Zur Identifizierung von Inserts wurde mit 1 ml Bakterienkultur eine PCR-Amplifizierung unter den Bedingungen der PCR 1 und unter Verwendung von NP1 und NP 2 als Primer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch im 2%igen Agarosegel analysiert.

[0203] Bakterienklone wurden in 20% Glycerol in einem Format mit 96 Vertiefungen aufbewahrt. Plasmid-DNA wurde präpariert, sequenziert und einer Nukleinsäurehomologiesuche in den Datenbanken GenBank, dBest und NCI-CGAP unterzogen.

RT-PCR-Expressionsanalyse:

[0204] Aus 1 µg RNA lassen sich durch Priming mit Oligo (dT)12–18 und unter Verwendung des Superscript Preamplification-System von Gibco-BRL First-Strand-cDNAs herstellen. Es kann das Protokoll des Herstellers befolgt werden, welches eine Inkubation für 50 min bei 42°C mit reverser Transkriptase, gefolgt von einer Behandlung mit RNase H bei 37°C für 20 min enthält. Nach Abschluss der Reaktion kann das Volumen vor der Normalisierung mit Wasser auf 200 µl erhöht werden. Von Clontech sind First-Strand-cDNAs aus 16 verschiedenen humanen Normalgeweben erhältlich.

[0205] Die Normalisierung der First-Strand-cDNAs aus mehreren Geweben erfolgte unter Verwendung der Primer 5'atatcgccgcgctcgtcgacaa3' (SEQ ID Nr.: 15) und 5'agccacacgcagctcattgtagaagg3' (SEQ ID Nr.: 16) zur Amplifizierung von β-Aktin. First-Strand-cDNA (5 µl) kann in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert werden, das 0,4 µM Primer, 0,2 µM jedes dNTP, 1 X PCR-Puffer (Clontech, 10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl, 50 mM KCl, pH 8,3) und 1 X Klentaq-DNA-Polymerase (Clontech) enthielt. In Zyklus 18, 20 und 22 können jeweils 5 µl der PCR-Reaktion entnommen und für die Agarosegelelektrophorese verwendet werden. Die PCR kann mit einem Thermal Cycler von MJ Research und unter folgenden Bedingungen durchgeführt werden: Anfängliche Denaturierung gegebenenfalls bei 94°C für 15 Sek., gefolgt von 18, 20 und 22 Zyklen bei jeweils 94°C für 15 Sek., 65°C für 2 min, 72°C für 5 Sek. Eine abschließende Extension kann für 2 min bei 72°C erfolgen. Nach der Agarosegelelektrophorese wurde die Intensität der β-Aktinbanden mit 283 bp aus mehreren Geweben durch Sichtprüfung verglichen. Es wurden die Verdünnungsfaktoren für die First-Strand-cDNAs berechnet, um nach 22 PCR-Zyklen die gleiche Intensität der β-Aktinbande in allen Geweben zu erhalten. Es können drei Normalisierungsrunden erforderlich sein, um nach 22 PCR-Zyklen gleiche Bandenintensitäten in allen Geweben zu erhalten.

[0206] Zur Bestimmung des Expressionsgrades des 84P2A9-Gens können 5 µl von normalisierter First-Strand-cDNA mittels PCR in 25, 30 und 35 Amplifikationszyklen analysiert werden, wobei Primerpaare zur Anwendung kommen, die mit der Unterstützung von (MIT; für Einzelheiten siehe unter www.genome.wi.mit.edu) entworfen werden können. Das Vergleichen der PCR-Produkte nach einer Zykuszahl, die leichte Bandenintensitäten ergibt, ermöglicht eine halbquantitative Analyse der Expression.

Ergebnisse

[0207] Zwei unter „Material und Verfahren“ oben beschriebene SSH-Experimente führten zur Isolierung zahlreicher Kandidatengenfragmentklone (SSH-Klone). Alle Kandidatenklone wurden sequenziert und einer Homologieanalyse gegen alle in den großen öffentlichen Gen- und EST-Datenbanken unterzogen, um Informationen über die Identität des entsprechenden Gens zu erhalten und die Entscheidung zur Analyse eines bestimmten Gens für die differenzielle Expression zu vereinfachen. Allgemein wurden Genfragmente, die keine Homologie mit einer bekannten Sequenz in keiner der durchsuchten Datenbanken aufwiesen und daher als neuartige Gene wiedergebend betrachtet wurden, sowie Genfragmente, die Homologie mit zuvor sequenzier-

ten exprimierten Sequenztags (ESTs) zeigen, einer Differenzialexpressionsanalyse durch RT-PCR und/oder einer Northern Analyse unterzogen.

[0208] Einer der SHH-Klone, der etwa 425 bp umfasste, zeigte signifikante Homologie zu mehreren Hoden-ESTs, aber keine Homologie zu einem bekannten Gen und wurde als 84P2A9 bezeichnet. Die Northern-Expressionsanalyse von First-Strand-cDNAs aus 16 Normalgeweben zeigte ein Expressionsmuster mit hoher Spezifität für Prostata und Hoden in Gewebe von Erwachsenen (**Fig. 4**).

Beispiel 2: Klonierung von 84P2A9 in Volllänge

[0209] Aus einer LAPC-4 AD-cDNA-Bibliothek (Lambda ZAP Express, Stratagene) wurde ein partieller 84P2A9-cDNA-Klon (Klon 2) mit 1687 Basenpaaren (bp) kloniert. Aus einer Bibliothek aus humanem fetalem Hirn (Pangene Inc.) wurde ein 84P2A9-cDNA-Klon in Volllänge (**Fig. 2**) (Klon B) mit 4728 Basenpaaren (bp) kloniert. Die cDNA kodiert ein putatives offenes Leseraster (ORF) aus 563 Aminosäuren. Sein berechnetes Molekulargewicht (MW) beträgt 63,4 kDa, und sein pI-Wert ist 8,15. Auf Proteinebene zeigt 84P2A9 eine Identität von 24,9% und eine Homologie von 32,8%, wobei etwaige Lücken berücksichtigt sind, zu einem Hüllprotein (Q9UNM3), das aus einem humanen endogenen retroviralen Protein, NERV-H, isoliert wurde (Virology 1999, 258: 441). Die 84P2A9-Nukleinsäuresequenz überlappt mit einigen ESTs aus Niere, Fetus, Hirn und Placenta.

[0210] Aus einer LAPC-4 AD-cDNA-Bibliothek (Lambda ZAP Express, Stratagene) wurde ein cDNA-Klon von 84P2A9 in Volllänge (Klon 1) mit 2347 Basenpaaren (bp) kloniert (**Fig. 2**). Die cDNA kodiert ein offenes Leseraster (ORF) von 504 Aminosäuren. Die Sequenzanalyse ergab das Vorhandensein sechs möglicher Kernlokalisierungssignale, und das PSORT-Programm (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/form.html>) prognostizierte Lokalisierung im Kern. Die Proteinsequenz ist zu einem Protein aus dem menschlichen Gehirn, KIAA1152 homolog (39,5%ige Identität über einen Bereich von 337 Aminosäuren) und weist eine Domäne auf, die zu dem Tumorsuppressorprotein LUCA15 homolog ist (64,3%ige Identität über einen Bereich von 42 Aminosäuren) (GenBank Zugangsnummer P52756) (**Fig. 3**). Die 84P2A9-cDNA wurde am 5. Januar 2000 bei der American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA) als Plasmid p84P2A9-1 hinterlegt und erhielt die Zugangsnummer PTA-1151.

[0211] Die 84P2A9-Proteine haben keine Homologie zu einem bekannten Protein, die Sequenz weist aber Überlappungen mit mehreren EST aus Hoden auf.

Beispiel 3: Analyse der Expression des 84P2A9-Gens

[0212] Die Expression der 84P2A9-mRNA in normalem Humangewebe wurde durch Northern-Blotting von zwei Blots mit mehreren Geweben (Clontech; Palo Alto, Kalifornien, USA) analysiert, die insgesamt 16 verschiedene normale Humangewebe aufwiesen, wobei ein gelabeltes SSH-Fragment von 84P2A9 (Beispiel 1) als Sonde verwendet wurde. Die RNA-Proben wurden mit einer β -Aktin-Sonde quantitativ normalisiert. Die Ergebnisse zeigen Expression eines Transkripts von 2,4 und 4,5 kb in normalem Hoden und normaler Prostata (**Fig. 4**).

[0213] Zur Analyse der Expression von 84P2A9 in Prostatakarzinomgewebelinien wurde mit aus den LAPC-Xenografts gewonnener RNA ein Northern-Blotting durchgeführt. Die Ergebnisse zeigen einen hohen Grad an 84P2A9-Expression in allen Xenografts, wobei die Expression in LAPC-9 AD, LAPC-9 AI (**Fig. 4** und **Fig. 5**) am höchsten war. Diese Ergebnisse liefern einen Beleg dafür, dass 84P2A9 in Prostatakarzinomen hochreguliert ist.

[0214] Darüber hinaus wurde ein hoher Expressionsgrad in Krebszelllinien aus Gehirn (pF5K-1, T98G), Knochen (HOS, U2-05), Lunge (CALU-1, NCI-H82, NCI-H146) und Niere (769-P, A498, CAKI-1, SW839) festgestellt (**Fig. 5**). In mehreren Zelllinien von Pankreaskarzinomen (pANC-1, BxPC-3, HPAC, CAPAN-1), Kolonkarzinomen (5K-CO-1, CACO-2, LOVO, COLO-205), Knochenkarzinomen (SK-ES-1, RD-ES), Mammakarzinomen (MCF-7, MDA-MB-435s) und Hodenkarzinomen (NCCIT) wurde ein mittlerer Expressionsgrad festgestellt (**Fig. 5**).

[0215] Darüber hinaus zeigten Proben von Patienten mit Prostatakarzinom Expression von 84P2A9 im normalen Teil und in dem von dem Tumor befallenen Teil der Prostatagewebe (**Fig. 6**). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es sich bei 84P2A9 um ein sehr hodenspezifisches Gen handelt, das bei Prostatakrebs und möglicherweise auch bei anderen Karzinomen hochreguliert ist. 84P2A9 könnte sich daher, ähnlich wie

die MAGE-Antigene, als Hodenkrebsantigen qualifizieren (Van den Eynde and Boon, Int J Clin Lab Res. 27: 81–86, 1997).

[0216] Die Expression von 84P2A9 in Normalgewebe kann weiter mit einem Multigewebe-RNA-Dot-Blot analysiert werden, der verschiedene Proben enthält (die überwiegend normale Gewebe und einige Krebszelllinien repräsentieren).

Beispiel 4: Herstellung polyklonaler 84P2A9-Antikörper

[0217] Polyklonale Antikörper können in einem Säuger beispielsweise durch mindestens eine Injektion eines Immunisierungsmittels und, falls gewünscht, eines Adjuvans erzeugt werden. Typischerweise werden das Immunisierungsmittel und/oder das Adjuvans durch mehrere subkutane oder intraperitoneale Injektionen in den Säuger injiziert.

[0218] Typischerweise kann ein Peptid aus einer Kodierungsregion von 84P2A9 entworfen werden. Alternativ kann das Immunisierungsmittel das gesamte 84P2A9-Protein oder Anteile des 84P2A9-Proteins oder Fusionsproteine davon aufweisen. Beispielsweise kann die 84P2A9-Aminosäuresequenz mit einem beliebigen von verschiedenen Fusionsproteinpartnern fusioniert werden, die aus dem Stand der Technik wohlbekannt sind, beispielsweise das Maltosebindungsprotein, LacZ, Thioredoxin oder die konstante Region eines Immunglobulins (siehe z. B. Current Protocols In Molecular Biology, Band 2, Unit 16, Frederick M. Ausubul et al., Hrsg., 1995; Linsley, P. S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N. und Ledbetter, L. (1991) J. Exp. Med. 174, 561–566). Sonstige rekombinante bakterielle Proteine umfassen Glutathion-S-Transferase (GST) und HIS-markierte Fusionsproteine von 84P2A9 (die unter Verwendung der geeigneten Affinitätsmatrix aus induzierten Bakterien gereinigt werden können).

[0219] Gegebenenfalls ist es nützlich, das Immunisierungsmittel mit einem Protein mit bekannter Immunogenität in dem immunisierten Säuger zu konjugieren. Beispiele solcher immunogener Proteine umfassen unter anderem Keyhole-Limpet-Hämocyanin, Serumalbumin, bovines Thyreoglobulin und Sojabohnen-Trypsininhibitor. Beispiele geeigneter Adjuvanzen umfassen komplettes Freund-Adjuvans und MPL-TDM-Adjuvans (Monophosphoryl-Lipid A, synthetisches Trehalosedicorynomycolat).

[0220] Bei einem typischen Protokoll werden Kaninchen zunächst subkutan etwa 200 µg Fusionsprotein oder mit KLH konjugiertes Peptid, gemischt in komplettem Freund-Adjuvans, injiziert. Anschließend wird den Kaninchen alle zwei Wochen etwa 200 µg Immungen in inkomplettem Freund-Adjuvans subkutan injiziert. Etwa 7–10 Tage nach jeder Immunisierung wird Blut entnommen und verwendet, um den Titer des Antiserums durch ELISA zu überwachen.

[0221] Die Spezifität des Antiserums wird durch Western Blot und Immunpräzipitation mit Lysaten von gentechnisch veränderten Zellen oder von Zellen, die endogenes 84P2A9 exprimieren, getestet. Um Zellen gentechnisch so zu verändern, dass sie 84P2A9 exprimieren, kann die 84P2A9-cDNA in Volllänge in einen Expressionsvektor kloniert werden, der am Carboxylende einen Marker aus 6 Histidinresten bereitstellt (pCDNA 3.1 myc-his, Invitrogen). Nach Transfektion der Konstrukte in 293T-Zellen lassen sich die Zellysate immunpräzipitieren und einem Western-Blot unterziehen, für den Anti-His- oder Anti-v5-Epitop-Antikörper (Invitrogen) und das Anti-84P2A9-Serum verwendet werden (siehe z. B. [Fig. 11](#)). Seren von mit His-markierten Protein und Peptid immunisierten Kaninchen sowie GST- und MBP-depletierte Seren werden durch Passage über eine Affinitätssäule gereinigt, die aus dem entsprechenden Immungen, gekoppelt an eine Affigel-Matrix (BioRad), zusammengesetzt ist.

Beispiel 5: Produktion von rekombinantem 84P2A9 in Bakterien- und Säugersystemen

BAKTERIELLE KONSTRUKTE

Produktion von rekombinantem 84P2A9 mit Hilfe von pGEX-Konstrukten

[0222] Zur Expression von 84P2A9 in Bakterienzellen wurde ein Anteil von 84P2A9 durch Klonierung in pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) mit dem Gen der Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert. Alle Konstrukte wurden hergestellt, um rekombinante 84P2A9-Proteinsequenzen mit am N-Terminus fusionierter GST und einem Epitop aus sechs Histidinen am C-Terminus zu erhalten. Der Epitopmarker aus sechs Histidinen wird hergestellt, indem die Histidincodons dem Klonierungsprimer am 3'-Ende des offenen Leserasters (ORF) hinzugefügt werden. Eine PreScission™-Erkennungsstelle erlaubt die Spaltung des

GST-Markers von 84P2A9. Das Ampicillinresistenzgen und der pBR322-Origin gestatten die Selektion und Erhaltung des Plasmids in *E. coli*. In diesem Konstrukt wurde ein Fragment, das Aminosäure 1 bis 151 von 84P2A9 enthielt, in pGEX-6P-1 kloniert. Es können weitere Konstrukte in pGEX-6P-1 hergestellt werden, die Regionen des 84P2A9-Proteins umspannen, beispielsweise Aminosäure 1 bis 504 und Aminosäure 151 bis 504.

SÄUGERKONSTRUKTE

[0223] Zur Expression von rekombinantem 84P2A9 in Säugersystemen kann die 84P2A9-cDNA in voller Länge beispielsweise in einen Expressionsvektor kloniert werden, der ein 6-His-Tag am Carboxylende bereit stellt (pCDNA 3.1 myc-his, Invitrogen). Die Konstrukte können in 293T-Zellen transfiziert werden. Lysate von transfizierten 283T-Zellen können mit dem polyklonalen Anti-84P2A9-Serum, beschrieben in Beispiel 4 oben, als Sonde in einem Western Blot untersucht werden.

[0224] Die 84P2A9-Gene können auch in den retroviralen Expressionsvektor pSRαMSVtkneo subkloniert und folgenderweise verwendet werden, um 84P2A9 exprimierende Zelllinien zu etablieren: Die 84P2A9-Kodierungssequenz (vom Translationsinitiationscodon ATG bis zu den Terminationscodons) wird aus 84P2A9-cDNA mittels PCR unter Verwendung einer ds cDNA-Vorlage amplifiziert. Das PCR-Produkt wird über die Restriktionsschnittstellen EcoRI (stumpfe Enden) und XbaI auf dem Vektor in pSRαMSVtkneo subkloniert und in kompetente DH5α-Zellen transformiert. Es werden Kolonien gepickt, um nach Klonen mit einmalig vorhandenen internen Restriktionsschnittstellen auf der cDNA zu suchen. Der positive Klon wird durch Sequenzierung des cDNA-Inserts bestätigt. Anschließend können Retroviren für die Infektion und Erzeugung verschiedener Zelllinien verwendet werden, wobei beispielsweise NIH 3T3, TsuPr1, 293 oder rat-1-Zellen verwendet werden.

[0225] Spezifische Säugersysteme sind hierin beschrieben.

Produktion von rekombinantem 84P2A9 mit Hilfe von pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Konstrukten

[0226] Zum Expressieren von 84P2A9 in Säugerzellen wird der 84P2A9-ORF mit 1512 bp (504 Aminosäuren) zusammen mit der perfekten Kozak-Translationsinitiationskonsensussequenz in pcDNA3.1/V5-His-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kloniert. Die Proteinexpression wird vom Zytomegalievirus (ZMV)-Promoter gesteuert. Das rekombinante Protein verfügt über das V5-Epitop und sechs Histidinepitope in Fusion mit dem C-Terminus. Der pcDNA3.1/V5-His-TOPO-Vektor enthält außerdem das Polyadenylierungssignal und die Transkriptionsterminationssequenz des bovinen Wachstumshormons (BGH) zur Erhöhung der mRNA-Stabilität sowie den SV40-Origin für die episomale Replikation und einfaches Vektor-Rescue in Zelllinien, die das Large-T-Antigen exprimieren. Das Neomycin-Resistenzgen gestattet die Selektion von Säugerzellen, die das Protein exprimieren, und das Ampicillin-Resistenzgen und der ColE1-Origin gestatten die Selektion und Erhaltung des Plasmids in *E. coli*.

pSRα-Konstrukte

[0227] Zur Erzeugung von Säugerzelllinien, die 84P2A9 konstitutiv exprimieren, wurde der ORF mit 1551 bp (517 Aminosäuren) in pSRα-Konstrukte kloniert. Durch Transfektion von pSRα-Konstrukten in die Verpackungszelllinie 293T-10A1 bzw. Cotransfektion von pSRα und einem Helfer-Plasmid (φ□) in 293-Zellen wurden amphotrope bzw. ecotrope Retroviren erzeugt. Das Retrovirus kann verwendet werden, um verschiedene Säugerzelllinien zu infizieren, was zur Integration des klonierten Gens, 84P2A9, in die Wirtszelllinien führt. Die Proteinexpression wird von einer langen endständigen Wiederholungssequenz (Long Terminal Repeat, LTR) gesteuert. Das Neomycin-Resistenzgen gestattet die Selektion von Säugerzellen, die das Protein exprimieren, und das Ampicillin-Resistenzgen und der ColE1-Origin gestatten die Selektion und Erhaltung des Plasmids in *E. coli*. Es können weitere pSRα-Konstrukte hergestellt werden, um N-terminale und C-terminale GFP- und myc/6HIS-Fusionsproteine des 84P2A9-Proteins in Volllänge herzustellen.

Beispiel 6: Produktion von rekombinantem 84P2A9 in einem Bakulovirussystem

[0228] Zur Erzeugung eines rekombinanten 84P2A9-Proteins in einem Bakulovirus-Expressionssystem wurde die 84P2A9-cDNA in den Bakulovirus-Transfervektor pBlueBac 4.5 (Invitrogen) kloniert, welcher ein His-Tag am N-Terminus liefert. pBlue-Bac--103P2D6 wurde insbesondere mit dem Helferplasmid pBac-N-Blue (Invitrogen) in SF9 (*Spodoptera frugiperda*)-Insektenzellen kotransfiziert, um rekombinantes Bakulovirus zu erzeugen (Einzelheiten sind der Gebrauchsanleitung von Invitrogen zu entnehmen). Anschließend wird Bakulovirus aus dem Zellüberstand gewonnen und durch Plaque-Assay gereinigt.

[0229] Durch Infektion von HighFive-Insektenzellen (Invitrogen) mit dem gereinigten Bakulovirus wird dann rekombinantes 84P2A9-Protein erzeugt. Das rekombinante 84P2A9-Protein lässt sich mit Hilfe eines Anti-84P2A9-Antikörpers detektieren. Das 84P2A9-Protein kann gereinigt und in verschiedenen zellbasierten Assays oder als Immunogen verwendet werden, um für 84P2A9 spezifische, polyklonale und monoklonale Antikörper herzustellen.

Beispiel 7: Chromosomale Kartierung (Mapping) des 84P2A9-Gens

[0230] Die chromosomale Lokalisierung von 84P2A9 wurde mit Hilfe des Radiation-Hybrid-Panels GeneBridge4 (Walter et al., 1994, Nat. Genetics 7: 22) (Research Genetics, Huntsville, AL, USA) bestimmt. Es wurden folgende PCR-Primer verwendet, um 84P2A9 zu lokalisieren:

84P2A9.1 gacttcactgatgcatgtaggt (SEQ ID Nr.: 17)

84P2A9.2 gtcaatactttccgatgcttgc (SEQ ID Nr.: 18)

[0231] Der resultierende Kartierungsvektor für die 93 Radiation Hybrid Panel-DNAs war:

0000100011001011001000001100010010010000100010100110001000000010

01001001010000000100000010000.

[0232] Dieser Vektor und das Kartierungsprogramm unter <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rh-mapper.pl> platzierten 84P2A9 auf Chromosom 1 q32.3 (D1S1602–D1S217).

Beispiel 8: Identifizierung möglicher Signalübertragungswege

[0233] Zur Bestimmung, ob 84P2A9 bekannte Signalübertragungswege in Zellen direkt oder indirekt aktiviert, werden Assays mit Luziferase(luc)-basierten transkriptionellen Reporter mit Zellen durchgeführt, die 84P2A9 exprimieren. Diese transkriptionellen Reporter enthalten Konsensus-Bindungsstellen für bekannte Transkriptionsfaktoren, die stromabwärts (downstream) von gut charakterisierten Signalübertragungswegen liegen. Die Reporter und Beispiele der mit ihnen assoziierten Transkriptionsfaktoren, Signalübertragungswege und Aktivierungsstimuli sind nachfolgend aufgeführt:

1. NFκB-luc, NFκB/Rel; Ik-Kinase/SAPK: Wachstum/Apoptose/Stress;
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK: Wachstum/Differenzierung;
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC: Wachstum/Apoptose/Stress;
4. ARE-luc, Androgenrezeptor; Steroide/MAPK: Wachstum/Differenzierung/Apoptose;
5. p53-luc, p53; SAPK: Wachstum/Differenzierung/Apoptose;
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38; Wachstum/Apoptose/Stress.

[0234] Von 84P2A9 vermittelte Effekte werden in Zellen untersucht, die 84P2A9-mRNA exprimieren. Beispielsweise können Luziferase-Reportergen-Plasmide durch lipidvermittelte Transfektion (TFX-50, Promega) eingeführt werden. Luziferaseaktivität, ein Indikator relativer Transkriptionsaktivität, wird gemessen, indem Zellextrakte mit Luziferin-Substrat inkubiert werden und die Lumineszenz der Reaktion in einem Luminometer beobachtet wird.

Beispiel 9: Erzeugung von monoklonalen 84P2A9-Antikörpern (mAbs)

[0235] Zur Erzeugung von mAbs gegen 84P2A9 werden typischerweise Balb/c-Mäuse intraperitoneal mit etwa 10–50 µg Proteinimmunogen, mit komplettem Freund-Adjuvans gemischt, immunisiert. Proteinimmunogene umfassen in Bakterien und Bakulovirus hergestellte, rekombinante 84P2A9-Proteine und in Säugern exprimierte humane IgG-Fc-Fusionsproteine. Die Mäuse werden anschließend alle 2–4 Wochen mit 10–50 µg Antigen, mit inkomplettem Freund-Adjuvans gemischt, immunisiert. Alternativ wird für die ersten Immunisierungen Ribi-Adjuvans verwendet. Darüber hinaus wird ein DNA-basiertes Immunisierungsprotokoll verwendet, bei dem ein Säugerexpressionsvektor zur Immunisierung von Mäusen durch direkte Injektion der Plasmid-DNA verwendet wird. Beispielsweise wird ein pCDNA3.1 verwendet, der 84P2A9-cDNA alleine oder als IgG-Fc-Fusion kodiert. Dieses Protokoll wird alleine oder in Kombination mit Proteinimmunogenen verwendet. Sieben bis zehn Tage nach der Immunisierung werden Testblutungen durchgeführt, um den Titer und die Spezifität der Immunreaktion zu beobachten. Sobald eine angemessene Reaktivität und Spezifität erhalten ist, was durch ELISA, Western Blotting und Immunpräzipitation bestimmt wird, erfolgen die Fusion und die Erzeugung von Hybridomas nach aus dem Stand der Technik bekannten etablierten Verfahren (Harlow and Lane, 1988).

[0236] Bei einem typischen spezifischen Protokoll wird ein Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein synthetisiert, das ein 84P2A9-Protein aufweist, und als Immungen verwendet. Balb/c-Mäuse werden zunächst mit 10–50 µg des GST-84P2A9-Fusionsproteins, gemischt in komplettem Freund-Adjuvans intraperitoneal immunisiert. Anschließend werden die Mäuse alle zwei Wochen mit 10–50 µg GST-84P2A9-Protein, gemischt in inkomplettem Freund-Adjuvans, insgesamt dreimal immunisiert. Die Reaktivität des Serums von immunisierten Mäusen auf das 84P2A9-Protein in Volllänge wird mittels ELISA unter Verwendung einer partiell gereinigten Zubereitung von HISmarkiertem 84P2A9-Protein, exprimiert von 293T-Zellen (Beispiel 5), beobachtet. Die Mäuse, die die stärkste Reaktivität zeigen, können drei Wochen ruhen, bevor sie eine letzte Injektion von Fusionsprotein in PBS erhalten und dann vier Tage später getötet werden. Die Milzen der getöteten Mäuse werden entnommen und nach Standardverfahren (Harlow and Lane, 1988) mit SPO/2-Myelomzellen fusioniert. Überstände von Wachstum aufweisenden Kavitäten nach HAT-Selektion werden mittels ELISA und Western Blot untersucht, um Klone zu identifizieren, die für 84P2A9 spezifische Antikörper produzieren.

[0237] Die Bindungsaffinität eines monoklonalen 84P2A9-Antikörpers kann mit Hilfe von Standardtechnologien bestimmt werden. Affinitätsmessungen quantifizieren die Stärke des Antikörpers hinsichtlich der Epitopbindung und können verwendet werden, um dabei behilflich zu sein zu definieren, welche monoklonalen 84P2A9-Antikörper für den diagnostischen oder therapeutischen Gebrauch bevorzugt sind. Das BIAcore-System (Uppsala, Schweden) ist ein bevorzugtes Verfahren zur Bestimmung der Bindungsaffinität. Das BIAcore-System verwendet Oberflächenplasmonresonanz (Surface Plasmon Resonance bzw. SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23: 1; Morton and Myska, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) zur Beobachtung biomolekularer Interaktionen in Echtzeit. Die BIAcore-Analyse generiert auf geeignete Weise Konstanten der Assoziationsrate, Konstanten der Dissoziationsrate, Konstanten der Dissoziation im Äquilibrium und Affinitätskonstanten.

Beispiel 10: In-Vitro-Assays der Funktion von 84P2A9

[0238] Die Expression von 84P2A9 in Prostatakarzinomen liefert Hinweise darauf, dass dieses Gen eine funktionelle Rolle bei der Tumorentstehung spielt. Möglicherweise wirkt 84P2A9 als Transkriptionsfaktor, der daran beteiligt ist, Gene zu aktivieren, die an der Tumorentstehung mitwirken, oder Gene zu unterdrücken, die die Tumorentstehung blockieren. Die Funktion von 84P2A9 lässt sich mit Hilfe von In-vitro-Ansätzen in Säugerzellen untersuchen. Zur Expression in Säugerzellen kann 84P2A9 in eine Reihe geeigneter Vektoren kloniert werden, einschließlich pcDNA 3.1 myc-His-tag (Beispiel 5) und in den retroviralen Vektor pSRatKneo (Muller et al., 1991, MCB 11: 1785). Mithilfe solcher Expressionsvektoren kann 84P2A9 in mehreren Zelllinien exprimiert werden, darunter in NIH 3T3, rat-1, TsuPr1 und 293T. Die Expression von 84P2A9 lässt sich mit Hilfe von Anti-84P2A9-Antikörpern überwachen (siehe Beispiel 4 und 9).

[0239] 84P2A9 exprimierende Säugerzelllinien können mit mehreren In-vitro- und In-vivo-Assays getestet werden, beispielsweise durch Zellproliferation in Gewebekultur, Aktivierung apoptotischer Signale, Tumorbildung bei SCID-Mäusen und In-vitro-Invasion unter Verwendung eines Membraninvasionssystems (MICS) (Welch et al., Int. J. Cancer 43: 449–457). Der Phänotyp der 84P2A9 exprimierenden Zellen wird mit dem Phänotyp der Zellen verglichen, die 84P2A9 nicht exprimieren. Der transkriptionelle Effekt von 84P2A9 kann getestet werden, indem der Effekt von 84P2A9 auf die Genexpression mit Hilfe von Genarrays (Clontech) und Transkriptions-Reporter-Assays (Stratagene) untersucht wird.

[0240] Zelllinien, die 84P2A9 exprimieren, können außerdem durch Messung Passage von Zellen durch eine mit Matrigel beschichtete poröse Membrankammer (Becton Dickinson) auf Änderungen der invasiven und migratorischen Eigenschaften getestet werden. Die Passage der Zellen durch die Membran auf der gegenüberliegenden Seite wird anhand eines Fluoreszenzassays kontrolliert (Becton Dickinson Technical Bulletin Nr. 428), wobei mit Calcein-Am (Molecular Probes) beladene Indikatorzellen zur Anwendung kommen. Zu den analysierten Zelllinien gehören parenterale und 84P2A9 überexprimierende PC3-, NIH 3T3- und LNCaP-Zellen. Zur Bestimmung, ob 84P2A9 exprimierende Zellen chemokine Eigenschaften (als „Chemoattractant“) aufweisen, werden Indikatorzellen hinsichtlich der Passage durch eine poröse Membran zu einem Gradienten von mit 84P2A9 konditioniertem Medium im Vergleich zu Kontrollmedium beobachtet. Dieser Assay kann auch verwendet werden, um eine spezifische Neutralisierung von Wirkungen von 84P2A9 durch therapeutische Kandidatenzusammensetzungen gegen Krebs zu beschreiben und zu quantifizieren.

[0241] Die Funktion von 84P2A9 lässt sich mit Hilfe von RNA-Antisense-Technologie, gekoppelt mit den verschiedenen hierin beschriebenen funktionellen Tests, z. B. von Wachstum, Invasion und Migration, untersuchen. RNA-Antisenseoligonukleotide können in 84P2A9 exprimierende Zellen eingeführt werden, wodurch die Expression von 84P2A9 verhindert wird. Kontrollzellen und Antisense enthaltende Zellen können hinsichtlich

Proliferation, Invasion, Migration, des apoptotischen und dem transkriptionellen Potenzials analysiert werden. Untersucht werden können die lokale sowie die systemische Wirkung des Verlustes der Expression von 84P2A9.

Beispiel 11: In-vivo-Assay auf Förderung des Tumorwachstums durch 84P2A9

[0242] Die Wirkung des 84P2A9-Proteins auf das Wachstum von Tumorzellen lässt sich in vivo durch Genüberexpression in tumortragenden Mäusen untersuchen. Beispielsweise können 1×10^6 PC3-, TSUPRI- oder DU145-Zellen, die den leeren tkNeo-Vektor oder 84P2A9 enthalten, SCID-Mäusen an jeder Flanke subkutan injiziert werden. Es können mindestens zwei Strategien angewandt werden: (1) Konstitutive Expression von 84P2A9 unter der Regulierung eines Promotors, wie beispielsweise eines konstitutiven Promotors aus dem Genom von Viren wie dem Polyoma-Virus, dem Hühnerpocken-Virus (UK 2,211,504, veröffentlicht am 5. Juli 1989), Adenovirus (z. B. Adenovirus 2), dem bovinen Papillom-Virus, dem Vogelsarkomvirus, dem Zytomegalievirus, einem Retrovirus, dem Hepatitis-B-Virus und dem Simian Virus 40 (SV40), oder durch heterologe Säugerpromotoren, z. B. dem Aktinpromotor oder einem Immunglobulinpromotor, vorausgesetzt, solche Promotoren sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel, und (2) Regulierte Expression unter der Kontrolle eines induzierbaren Vektorsystems wie beispielsweise Ecdyson, Tet, etc., vorausgesetzt, solche Promotoren sind mit den Wirtszellsystemen kompatibel. Beim Auftreten tastbarer Tumoren wird das Tumolvolumen überwacht und über die Zeit nachverfolgt, um zu bestimmen, ob 84P2A9 exprimierende Zellen schneller wachsen und ob Tumoren, die von 84P2A9 exprimierenden Zellen hervorgebracht werden, Kennzeichen veränderter Aggressivität (z. B. verstärkte Metastasierung, Vaskularisierung, reduzierte Responsivität gegenüber Chemotherapeutika) aufweisen. Darüber hinaus können 1×10^5 der gleichen Zellen orthotopisch in Mäuse implantiert werden, um zu bestimmen, ob 84P2A9 einen Effekt auf das lokale Wachstum in der Prostata oder auf die Fähigkeit der Zellen zur Metastasierung, insbesondere zur Lunge, den Lymphknoten und in das Knochenmark, hat.

[0243] Der Assay ist auch geeignet, um die Hemmwirkung von 84P2A9 auf therapeutische Kandidatenzusammensetzungen wie beispielsweise 84P2A9-Intrabodies, 84P2A9-Antisensemoleküle und -Ribozyme zu bestimmen.

Beispiel 12: Western-Analyse der Expression von 84P2A9 in subzellulären Fraktionen

[0244] Die Sequenzanalyse von 84P2A9 ergab das Vorhandensein eines Kernlokalisierungssignals. Die zelluläre Lokalisierung von 84P2A9 lässt sich mit Hilfe von Techniken der subzellulären Fraktionierung untersuchen, die in der Zellbiologie häufig verwendet werden (Storrie B, et al., Methods Enzymol. 1990; 182: 203–25). Prostatazelllinien oder andere Zelllinien lassen sich in Kern-, Zytosol- und Membranfraktionen trennen. Die Expression von 84P2A9 in den verschiedenen Fraktionen kann mittels Western-Blotting-Techniken getestet werden.

[0245] Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisierung von 84P2A9 können alternativ 293T-Zellen mit einem Expressionsvektor transfiziert werden, der HIS-markiertes 84P2A9 kodiert (PCDNA 3.1 MYC/HIS, Invitrogen). Die transfizierten Zellen können geerntet und einem Protokoll der differentiellen subzellulären Fraktionierung, wie zuvor beschrieben (Pemberton, P. A. et al., 1997, J of Histochemistry and Cytochemistry, 45: 1697–1706), unterzogen werden. Dieses Protokoll trennt die Zelle in Fraktionen auf, in denen Kerne, schwere Membranen (Lysosomen, Peroxisomen und Mitochondrien), leichte Membranen (Plasmamembran und endoplasmatisches Retikulum) und lösliche Proteine angereichert sind.

TABELLEN

TABELLE 1: Prognostizierte Bindung von Peptiden aus 84P2A9-Proteinen an das menschliche MHC-Klasse-I-Molekül HLA-A2.

Rang-nummer	Start-position	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziations-halbwertszeit)
1	300	SILTGSFPL (SEQ ID Nr.: 19)	63,04
2	449	RMLQNMGWT (SEQ ID Nr.: 20)	33,75
3	4	LVHDLVSAL (SEQ ID Nr.: 21)	29,97
4	238	SLSSTDAGL (SEQ ID Nr.: 22)	21,36
5	198	KIQDEGVVL (SEQ ID Nr.: 23)	17,28
6	433	FVGENAQPI (SEQ ID Nr.: 24)	17,22
7	301	ILTGSFPLM (SEQ ID Nr.: 25)	16,05
8	218	KMECEEQKV (SEQ ID Nr.: 26)	11,25
9	480	KGKGKGFPL (SEQ ID Nr.: 27)	10,47
10	461	GLGRDGKGI (SEQ ID Nr.: 28)	10,43

[0246] Die TABELLEN 3 BIS 16 umfassen weitere Analysen der prognostizierten Bindung von Peptiden aus 84P2A9-Proteinen an verschiedene HLA-Moleküle.

TABELLE 2: AMINOSÄURESUBSTITUTIONSMATRIX

[0247] Angepasst nach der BLOSUM62-Aminosäuresubstitutionsmatrix der GCG Software 9.0 (Blocksubstitutionsmatrix). Je höher der Wert, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit der Auffindung einer entsprechenden Substitution in verwandten natürlichen Proteinen.

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

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	AI
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 3A:

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	71	SLEEPSKDY	45.000
2	469	ISEPIQAMQ	27.000
3	283	KEDPTELDK	25.000
4	15	SSEQARGGF	13.500
5	23	FAETGDHSR	9.000
6	441	ILENNIGNR	9.000
7	241	STDAGLFTN	6.250
8	72	LEEPSKDYR	4.500
9	233	ESDSSSLSS	3.750
10	92	DSDDQMLVA	3.750
11	157	MTQPPEGCR	2.500
12	413	TGDIKRRRK	2.500
13	256	DDEQSDWFY	2.250
14	373	RTEHDQHQL	2.250
15	309	MSHPSRRGF	1.500
16	207	ESEETNQTN	1.350
17	231	MSESDSSSL	1.350
18	64	LSEGSDSSL	1.350
19	456	WTPGSLGR	1.250
20	375	EHDQHQLLR	1.250
21	293	VPDPVFESI	1.250
22	93	SDDQMLVAK	1.000
23	494	ATTPNAGK	1.000
24	208	SEETNQTNK	0.900
25	205	VLESEETNQ	0.900
26	79		0.900
27	11	ALEESSEQA	0.900
28	226	VSDELMSES	0.750
29	31	RSISCPLKR	0.750
30	90	HSDSDDQML	0.750

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRO ARKRRGRKRR
51     SYNVHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMO SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDLE MSESDDSSSL STDAGLFTND
251    EGROGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRRAERG HKNKCSVRTA
401    SROTSMLGGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 3B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A1
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 4A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	469	ISEPiQAMQR	675.000
2	92	DSDDqMLVAK	30.000
3	207	ESEEtNQTNK	27.000
4	168	DMDSdRAYQY	25.000
5	11	ALEEsSEQAR	9.000
6	71	SLEEpSKDYR	9.000
7	282	EKEDpTELDK	4.500
8	166	DQDMdSDRAY	3.750
9	90	HSDSdDQMLV	3.750
10	177	YQEFtKNKVK	2.700
11	144	AVDLpQDISN	2.500
12	373	RTEHdQHQLL	2.250
13	33	ISCPiKRQAR	1.500
14	231	MSESdSSSLS	1.350
15	15	SSEQaRGGFA	1.350
16	254	QGDDeQSDWF	1.250
17	255	GDDEqSDWfY	1.250
18	293	VPDPvFESIL	1.250
19	173	RAYQyQEFTK	1.000
20	481	GLGLgFPLPK	1.000
21	205	VLESeETNQT	0.900
22	79	YRENhNNNKK	0.900
23	441	ILENnIGNRM	0.900
24	23	FAETgDHSRS	0.900
25	121	ESDFaVDNVG	0.750
26	233		0.750
27	409	GSLCtGDIKR	0.750
28	259	QSDWfYEKES	0.750
29	70	SSLEePSKDY	0.750
30	67	GSDSsLLEEPS	0.750

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDNS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSOS SLEEPSKDYR ENHNNKKKH SDSDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDEAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTOP PEGCRDQDMO SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPRIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSESDDSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFEYKESGG ACCITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301    ILTGSPPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRNVHVFSP SHHHDHWFSP GARTHDQHQ LLRDNRARG HKNKCSVRTA
401    SROTSMLGSL LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQF ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 4B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A_0201
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 5A Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziations-halbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	300	SILTGSFPL	63.035
2	449	RMLQNMGWT	32.748
3	4	LVHDLVSAL	29.965
4	238	SLSTDAGL	21.362
5	198	KIQDEGVVL	17.282
6	433	FVGENAQPI	17.217
7	301	ILTGSFPLM	16.047
8	218	KMECEEQKV	11.252
9	480	KGLGLGFPL	10.474
10	461	GLGRDGKGI	10.433
11	341	SMVPIPGPV	6.530
12	468	GISEPIQAM	6.442
13	405	SMHLGSLCT	5.382
14	191	KIIRQGPKI	5.021
15	117	PLWHESDFA	2.445
16	117	YQEFTKNKV	2.076
17	454	MGWTPGSL	1.968
18	156	TMTQPPEGC	1.758
19	374	TEHDQHQLL	1.703
20	52	YNVHHPWET	1.678
21	474	QAMQRPKGL	1.098
22	240	SSTDAGLFT	1.097
23	438	AQPILENNI	1.058
24	269	GGACGITGV	1.044
25	143	MAVDLPQDI	1.010
26	206	LESEETNQT	1.010
27	173	RAYQYQEFT	0.893
28	3	ELVHDLVSA	0.857
29	132	RTLRRRRKV	0.715
30	266	KESGGACGI	0.710

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALLESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNNKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCHUQDMD SDRAYQYQEF TKNEVKKRKL KIIROGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDLE MSESDDSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301    ILTGSEPLMS RPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTERDQHQ LLRDNRRAERG HKKNCVSTA
401    SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 5B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A_0201
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 6A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	230	LMSEsDSSSL	107.536
2	63	CLSEgSDSSL	87.586
3	117	PLWHeSDFAV	73.661
4	453	NMGWtPGSGL	15.428
5	475	AMQRpKGLGL	15.428
6	433	FVGE _n AQPIL	14.454
7	323	RLHG _m SSKNI	10.433
8	142	RMAVdLPQDI	7.535
9	483	GLGFpLPKST	7.452
10	300	SILTgSFPLM	4.802
11	3	ELVHdLVSAL	3.685
12	473	IQAMqRPKGL	3.682
13	292	NVPDpVFESI	3.485
14	124	FAVD _n VGNRT	1.952
15	334	KSGGtPTSMV	1.589
16	445	NIGNrMLQNM	1.571
17	315	RGFQaRLSRL	1.187
18	268	SGGA _c GITGV	1.044
19	288	ELDK _n VPDPV	1.022
20	486	FPLPkSTSAT	0.828
21	205	VLESeETNQT	0.811
22	402	RQTS _m HLGSL	0.648
23	425	LPGP _t TAGFV	0.552
24	441	ILEN _n IGNRM	0.541
25	237	SSL _S TDAGL	0.516
26	10	SALE _e SSEQA	0.513
27	212	NOTN _k DKMEC	0.504
28	301	ILTG _s FPLMS	0.481
29	239	LSST _d AGLFT	0.455
30	103	RPSS _n LNNNV	0.454

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRO ARKRRGRKRR
51     SYNVHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNNKKDH SOSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRAKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEZQKVSDEL MSESDDSSSL STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSPPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRNVHFSPD SHHHDHWFSP GARTHDQHQ LLRDNRAERG HKKNCVVRTA
401    SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGETT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 6B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A3
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 7A Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	326	GMSSKNIKK	120.000
2	245	GLFTNDEGR	60.000
3	133	TLRRRRKVK	10.000
4	146	DLPQDISNK	9.000
5	410	SLCTGDIKR	8.000
6	107	NLNNNVRGK	6.000
7	258	EQSDWFYEK	4.860
8	71	SLEEPSKDY	4.500
9	381	LLRDNRAER	4.000
10	441	ILENNIGNR	1.800
11	494	ATTPNAGK	1.500
12	301	ILTGSFPLM	0.900
13	461	GLGRDGKGI	0.900
14	128	NVGNRTLRR	0.800
15	238	SLSSTDAGL	0.600
16	307	PLMSHPSRR	0.600
17	456	WTPGSGLGR	0.600
18	218	KMECEEQKV	0.600
19	283	KEDPTELDK	0.540
20	409	GSLCTGDIK	0.450
21	273	GITGVVPWW	0.405
22	344	PIPGVGNK	0.405
23	184	KVKKRKLKI	0.360
24	156	TMTQPPEGC	0.300
25	11	ALEESSEQA	0.300
26	180	FTKNKVKKR	0.300
27	35	CPLKRQARK	0.300
28	459	GSGGLGRDGK	0.300
29	191	KIIRQGPKI	0.270
30	483	GLGFPLPKS	0.270

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1    MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRO ARKRRGRKRR
51   SYNVHHPWET GHCLSEGSDS $LEEPSKDYR ENHNNNNKKDH SDSDDOMLVA
101  KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151  ISNKRMTQTP PEGCRDQDMU SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KII RQGPKIQ
201  DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSEDL MSESDSSSL S TDAGLFTND
251  ECRQGDDEQS DWFYKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301  ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351  NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRARG HKKNCVVRTA
401  SRQTSMHLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451  LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501  GKSA

```

TABELLE 7B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A3
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 8A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	481	GLGLgFPLPK	360.000
2	189	KLKIiRQGPK	18.000
3	71	SLEEpSKDYR	6.000
4	11	ALEEsSEQAR	6.000
5	380	QLLRdNRAER	6.000
6	175	YQYQeFTKNK	4.500
7	274	ITGVvPWWEK	4.500
8	133	TLRRrRKVKR	4.000
9	168	DMDSdRAYQY	3.600
10	173	RAYQyQEFTK	3.000
11	410	SLCTgDIKRR	3.000
12	156	TMTQpPEGCR	1.800
13	146	DLPQdISNKR	1.800
14	107	NLNNnVRGKR	1.800
15	475	AMQRpKGLGL	1.200
16	63	CLSEgSDSSL	0.900
17	453	NMGWtPGSGL	0.900
18	230	LMSEsDSSSL	0.900
19	3	ELVHdLVSAL	0.810
20	132	RTLRLRRKVK	0.750
21	180	FTKNkVKKRK	0.750
22	343	VPIPgPVGNK	0.608
23	238	SLSStDAGLF	0.600
24	142	RMAVdLPQDI	0.600
25	257	DEQSdWFYEK	0.486
26	323	RLHGmSSKNT	0.450
27	301	ILTGsFPLMS	0.360
28	117	PLWHeSDFAV	0.300
29	493	SATTtPNAGK	0.300
30	177	YQEFtKNKVK	0.300

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMO SDRAYQYQEF TKNKVKRRL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSESDDSSSL STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRONRAERG HKKNCVVRTA
401    SRQTSMHLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 8B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A_1101
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 9A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	326	GMSSKNIKK	2.400
2	174	AYQYQEFTK	1.200
3	494	ATTPNAGK	1.000
4	128	NVGNRTLRR	0.800
5	245	GLETNDEGR	0.480
6	456	WTPGSLGR	0.400
7	258	EQSDWFYEK	0.360
8	283	KEDPTLDDK	0.360
9	35	CPLKRQARK	0.300
10	133	TLRRRRKVK	0.200
11	176	QYQEFTKNK	0.200
12	157	MTQPPEGCR	0.200
13	40	QARKRRGRK	0.200
14	80	RENHNNKK	0.180
15	410	SLCTGDIKR	0.160
16	210	ETNQTNKKDK	0.150
17	146	DLPQDISNK	0.120
18	184	KVKKRKLKI	0.120
19	180	FTKNKVKKR	0.100
20	409	GSLCTGDIK	0.090
21	381	LLRDNRAER	0.080
22	441	ILENNIGNR	0.080
23	482	LGLGFPLPK	0.060
24	459	GSLGLRDGK	0.060
25	275	TGVVPWWEK	0.060
26	139	KVKRMAVDL	0.060
27	208	SEETNQTNK	0.060
28	306	FPLMSHPSR	0.060
29	178	QEFTKNKVK	0.060
30	179	EETKNKVKK	0.060

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHFWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPDQ
151    ISNKRITMQP PEGCRDQDMO SDRAYQYQEF TKNVKRRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSESDDSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRNVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRARG HKKNCVVRTA
401    SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGTWPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTTNA
501    GKSA

```

TABELLE 9B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A_1101
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 10A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	173	RAYQyQEFTK	3.600
2	481	GLGLgFPLPK	2.400
3	132	RTLRrRRKVK	2.250
4	274	ITGVvPWWEK	2.000
5	39	RQARkRRGRK	1.800
6	189	KLKliRQGPK	1.200
7	175	YQYQeFTKNK	0.600
8	180	FTKNkVKKRK	0.500
9	177	YQEFtKNKVK	0.300
10	343	VPIPgPVGNK	0.300
11	493	SATTtPNAGK	0.200
12	34	SCPLkRQARK	0.200
13	178	QEFTkNKVKK	0.120
14	78	DYREnHNNNK	0.120
15	380	QLLRdNRAER	0.120
16	22	GFAEtGDHSR	0.120
17	412	CTGDiKRRRK	0.100
18	133	TLRRrRKVKR	0.080
19	71	SLEEpSKDYR	0.080
20	325	HGMSsKNIKK	0.080
21	107	NLNNnVRGKR	0.080
22	11	ALEEsSEQAR	0.080
23	156	TMTQpPECCR	0.080
24	182	KNKVkKRKLK	0.060
25	216	KDKMcCEEQK	0.060
26	383	RDNRaERGHK	0.060
27	306	FPLMsHPSRR	0.060
28	128	NVGNrTLRRR	0.040
29	111	NVRGkRPLWH	0.040
30	311	HPSRrGFQAR	0.040

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEOAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNVAHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKOYR ENHNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTHMQP PEGCRCQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDLE MSESDSSSLs STDAGLFTND
251    EGRQGODEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGFVG
351    NKRNVHFSPP SHHHDHWFSP GARTHDQHQ LLRDNRARG HKKNCSVRTA
401    SRQTSMLHGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWT PGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA.

```

TABELLE 10B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A24
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 11A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	316	GFQARLSRL	30.000
2	480	KCLGLGFPL	14.400
3	198	KIODEGVVL	14.400
4	373	RTEHDQHQ	12.000
5	182	KNKVKKRKL	8.800
6	139	KVKRMAVDL	8.000
7	263	FYEKESGGA	7.500
8	78	DYRENHNNN	7.200
9	300	SILTGSFPL	6.000
10	474	QAMORPKGL	6.000
11	116	RPLWHESDF	6.000
12	110	NNVRGKRPL	6.000
13	231	MSESDSSSL	6.000
14	434	VGENAQPIL	6.000
15	64	LSEGSDDSL	6.000
16	443	ENNIGNRML	6.000
17	4	LVHDLVSAL	5.760
18	29	HSRSISCPL	5.600
19	56	HPWETGHCL	4.800
20	90	HSDSDDQML	4.800
21	478	RPKGLGLGF	4.800
22	476	MQRPKGLGL	4.800
23	400	ASRQTSML	4.000
24	454	MGWTPGSL	4.000
25	238	SLSSTDAGL	4.000
26	403	OTSMHLGSL	4.000
27	191	KIIRGPKI	3.300
28	349	VGNKRMVHF	3.000
29	15	SEEOARGGF	3.000
30	143	MAVDLPDI	2.592

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNKNDH SDSDDOMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKRKL KIIRQGPQIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSEDSSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP CARTEHDQHQ LLRDNRAERG HKNKCSVRTA
401    SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAOP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDEKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTTNA
501    GKSA

```

TABELLE 11B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	A24
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 12A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	297	VFESiLTGSF	18.000
2	373	RTEHdQHQLL	14.400
3	176	QYQEfTKNKV	11.880
4	174	AYQYqEFTKN	9.900
5	432	GFVGeNAQPI	9.000
6	51	SYNVhHPWET	8.250
7	402	RQTSmHLGSL	8.000
8	315	RGFQaRLSRL	8.000
9	263	FYEKeSGGAC	7.500
10	3	ELVHdLVSAL	7.200
11	280	WWEKeDPTEL	6.600
12	237	SSLsTDAGL	6.000
13	299	ESILtGSFPL	6.000
14	475	AMQRpKGLGL	6.000
15	109	NNNVrGKRPL	6.000
16	230	LMSEsDSSSL	4.800
17	293	VPDPvFESIL	4.800
18	433	FVGEaAQPIl	4.800
19	63	CLSEgSDSSL	4.800
20	125	AVDNvGNRTL	4.000
21	99	VAKRrPSSNL	4.000
22	473	IQAMqRPKGL	4.000
23	453	NMGWtPGSGL	4.000
24	399	TASRqTSMHL	4.000
25	292	NVPDpVFESI	3.024
26	142	RMAVdLPQDI	2.880
27	437	NAQPilENNI	2.592
28	254	QGDDeQSDWF	2.400
29	14	ESSEqARGGF	2.400
30	323	RLHCmSSKNI	2.000

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGSDS SLEEPSKDYR ENHNNNKDHD SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKAPLWH ESDFAVDNVC NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDM DSDRAYQYQEF TKNKYKRRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSEDSSSSLS STOAGLFTND
251    EGRQGDEEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVDPVPFES
301    ILTGSEPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGFVC
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRONRAERG HKNKCSVRTA
401    SRQTSMHLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 12B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	B7
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 13A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	400	ASRQTSMHL	120.000
2	56	HPWETGHCL	80.000
3	476	MQRPKGLGL	40.000
4	29	HSRSISCPL	40.000
5	474	QAMQRPKGL	36.000
6	4	LVHDLVSAL	20.000
7	139	KVKRMAVDL	20.000
8	100	AKRRPSSNL	18.000
9	423	APLPGPTTA	6.000
10	454	MGWTPGSGL	6.000
11	396	SVRTASRQT	5.000
12	196	GPKIQDEGV	4.000
13	182	KNKVKKRKL	4.000
14	110	NNVRGKRPL	4.000
15	198	KIQDEGVVL	4.000
16	403	QTSMHLGSL	4.000
17	238	SLSSTDAGL	4.000
18	285	DPTELDKNV	4.000
19	300	SILTGSFPL	4.000
20	347	GPVGNKRMV	4.000
21	480	KGLGLGFPL	4.000
22	417	KRRRKAAPL	4.000
23	443	ENNIGNRML	4.000
24	313	SRRGFQARL	4.000
25	18	QARGGFAET	3.000
26	293	VPDPVFESI	2.400
27	295	DPVFESILT	2.000
28	311	HPSRRGFQA	2.000
29	433	FVGENAQPI	2.000
30	486	FPLPKSTSA	2.000

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNHHHPWET GHCLSEGS DS SLEEPSKDYR ENHNNKNDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMVULPQO
151    ISNKRTMTQP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDEL MSES DSSSL SSTDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFOAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNR AERG HKNCSVRTA
401    SRQTSMHLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTT PNA
501    GKSA

```

TABELLE 13B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	B7
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 14A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	318	QARLsRLHGM	30.000
2	293	VPDPvFESIL	24.000
3	345	IPGPvGNKRM	20.000
4	433	FVGE _n AQPIL	20.000
5	125	AVDNvGNRTL	18.000
6	99	VAKRrPSSNL	18.000
7	399	TASRqTSMHL	12.000
8	475	AMORpKGLGL	12.000
9	453	NMGWtPGSGL	6.000
10	230	LMSEsDSSSL	4.000
11	473	IQAMqRPKGL	4.000
12	312	PSRRgFQARL	4.000
13	425	LPGPtTAGFV	4.000
14	103	RPSSnLNNNV	4.000
15	109	NNNVrGKRPL	4.000
16	63	CLSEgSDSSL	4.000
17	315	RGFQaRLSRL	4.000
18	237	SSLsTDAGL	4.000
19	416	IKRRrKAAPL	4.000
20	196	GPKIqDEGVV	4.000
21	299	ESILtGSFPL	4.000
22	402	RQTSmHLGSL	4.000
23	3	ELVHdLVSAL	4.000
24	147	LPQDiSNKRT	2.000
25	116	RPLWhESDFA	2.000
26	278	VPWWeKEDPT	2.000
27	488	LPKStSATTT	2.000
28	292	NVPDpVFESI	2.000
29	45	RGRKrRSYNV	2.000
30	486	FPLPkSTSAT	2.000

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDHS RSISCPLKRQ ARKRRGRKRR
51     SYNVHHPWET GHCLSEGS DS SLEEPSKDYR ENHNNNNKKDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRMTOP PEGCRDQDMD SDRAYQYQEF TKNKVKKRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSD EL MSESDSSSL S TDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESGG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTHDQHQ LLRDNR AERG HKKNC SVRTA
401    SRQTSMHLGS LCTGDIKRRR KAAPLP GPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 14B

Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	B_3501
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	9
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	496
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetabelle aufgeführt werden	30

TABELLE 15A

Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	478	RPKGLGLGF	120.000
2	56	HPWETGHCL	40.000
3	116	RPLWHESDF	40.000
4	425	LPGPTTAGF	20.000
5	334	KSGGTPTSM	20.000
6	400	ASROTSMHL	15.000
7	29	HRSISICPL	15.000
8	196	GPKIQDEGV	12.000
9	285	DPTELDKNV	8.000
10	239	LSSTDAGLF	7.500
11	139	KVKRMAVDL	6.000
12	223	EQKVSDELM	6.000
13	488	LPKSTSATT	6.000
14	198	KIQDEGVVL	6.000
15	182	KNKVKKRKL	6.000
16	309	MSHPSRRGF	5.000
17	360	DSHHHDHWF	5.000
18	50	RSYNVHHPW	5.000
19	103	RPSSNLNNN	4.000
20	468	GISEPIQAM	4.000
21	347	GPVGNKRMV	4.000
22	398	RTASRQTSM	4.000
23	295	DPVFESILT	3.000
24	476	MQRPKGLGL	3.000
25	74	EPSKDYREN	3.000
26	474	QAMQRPKGL	3.000
27	143	MAVDLPQDI	2.400
28	184	KVKKRKLKI	2.400
29	293	VPDPVFESI	2.400
30	90	HSDSDDQML	2.250

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

```

1      MEELVHDLVS ALEESSEQAR GGFAETGDRS RSISCPLKRQ ARKRGRKRR
51     SYNVHHPWET GHCLSEGS DS SLEEPSKDYR ENHNNKNDH SDSDDQMLVA
101    KRRPSSNLNN NVRGKRPLWH ESDFAVDNVG NRTLRRRRKV KRMAVDLPQD
151    ISNKRTHQTP PEGCRDQDMO SDRAYQYQEF TKNKVKRRKL KIIRQGPKIQ
201    DEGVVLESEE TNQTNKDKME CEEQKVSDLE MSESDDSSLS STDAGLFTND
251    EGRQGDDEQS DWFYEKESCG ACGITGVVPW WEKEDPTELD KNVPDPVFES
301    ILTGSFPLMS HPSRRGFQAR LSRLHGMSSK NIKKSGGTPT SMVPIPGPVG
351    NKRMVHFSPD SHHHDHWFSP GARTEHDQHQ LLRDNRARG HKKNCSVRTA
401    SRQTSMLGS LCTGDIKRRR KAAPLPGPTT AGFVGENAQP ILENNIGNRM
451    LQNMGWTPGS GLGRDGKGIS EPIQAMQRPK GLGLGFPLPK STSATTTPNA
501    GKSA

```

TABELLE 15B Ergebnisse der Suche nach HLA-Peptidmotiven

Anwenderparameter und Bewertungsinformationen	
Zur Eingrenzung der Anzahl von Ergebnissen verwendetes Verfahren	Explizite Zahl
Anzahl der angeforderten Ergebnisse	30
Ausgewählter HLA-Molekültyp	B_3501
Für die Bewertung der Untersequenzen ausgewählte Länge	10
Für die Eingabesequenz ausgewählter Wiedergabemodus	Y
Wiedergabeformat	Nummerierte Zeilen
Länge der Eingabepeptidsequenz des Anwenders	504
Anzahl der berechneten Untersequenz-Scores	495
Anzahl der Untersequenzen mit Höchstbewertung, die in der Bewertungs-Ausgabetable aufgeführt werden	30

TABELLE 16A Scoring-Ergebnisse (Bewertungsergebnisse)

Rangnummer	Startposition	Auflistung der Untersequenzreste	Score (Geschätzte Dissoziationshalbwertszeit eines diese Untersequenz enthaltenden Moleküls)
1	345	IPGPvGNKRM	40.000
2	70	SSLEePSKDY	20.000
3	196	GPKIqDEGVV	18.000
4	318	QARLsRLHGM	18.000
5	14	ESSEqARGGF	10.000
6	99	VAKRrPSSNL	9.000
7	103	RPSSnLNNNV	8.000
8	116	RPLWhESDFA	6.000
9	488	LPKStSATTT	6.000
10	293	VPDPvFESIL	6.000
11	299	ESILtGSFPL	5.000
12	237	SSLsTDAGL	5.000
13	467	KGISePIQAM	4.000
14	56	HPWEtGHCLS	4.000
15	147	LPQDiSNKRT	4.000
16	425	LPGPtTAGFV	4.000
17	358	SPDSHhHDHW	3.000
18	230	LMSEsDSSSL	3.000
19	253	RQGDdEQSDW	3.000
20	399	TASRqTSMHL	3.000
21	184	KVKKrKLKII	2.400
22	445	NIGNrMLQNM	2.000
23	402	RQTSmHLGSL	2.000
24	300	SILTgSFPLM	2.000
25	334	KSGGtPTSMV	2.000
26	433	FVGEaAQPIl	2.000
27	210	ETNQtnKDKM	2.000
28	63	CLSEgSDSSL	2.000
29	486	FPLPkSTSAT	2.000
30	315	RGFQaRLSRL	2.000

Wiedergegebene Peptidsequenz des Anwenders

(Länge = 504 Reste)

1	MEELVHDLVS	ALEESSEQAR	GGFAETGDHS	RSISCPLKRQ	ARKRRGRKRR
51	SYNVHHPWET	GHCLSEGSQS	SLEEPSKDYR	ENHNNKNDH	SDSDQMLVA
101	KRRPSSNLNN	NVRGKRPLWH	ESDFAVDNVC	NRTLRRRRKV	KRMVLDLPQD
151	ISNKRTMTQP	PEGCRDQDMD	SDRAYQYQEF	TKNKVKKRKL	KIIRQGPKIQ
201	DEGVVLESEE	TNQTNKDKME	CEEQKVSDCL	MSESDSSSLC	STDAGLFTND
251	EGRQGDDEQS	DWFYEKESGG	ACGITGVVPW	WEKEDPTCLD	KNVPDPVIES
301	ILTG3FPLMS	HPSRRGFQAR	LSRLHGMSSK	NIKKSGGTPT	SMVPIPGPVG
351	NKRMVHFSPD	SHHHDHWFSP	GARTEHDQHQ	LLRDNRAERG	HKKNC5VRTA
401	SRQTSMLGS	LCTGDIKRRR	KAAPLPGPTT	AGFVGENAQP	ILENNIGNRM
451	LQNMGWTPGS	GLGRDGKGIS	EPIQAMQRPK	GLGLGFPLPK	STSATTTTNA
501	GKSA				

SEQUENZLISTE

<110> UroGenesys, Inc.

<120> 84P2A9: PROSTATA- UND HODENSPEZIFISCHES PROTEIN,
HOCH EXPRIMIERT IN PROSTATAKREBS

<130> 129.1WOU1

<160> 28

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 2345

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<220>

<221> CDS

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

<400> 1

attcggcacg aggtggaagt cgccggtgct gttgtagttg gagtctgttc acgggcctga	60
gcttcgagggc caggtctctg ggtgtcgta atgttcgggg ccgcccggcg ccaaccgatc	120
ggagctccag cagccgggaa cagctggcat ttcagtagaa cc atg gag gag ctg	174
Met Glu Glu Leu	
1	

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

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

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

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

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

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

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

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

```

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

```

<210> 2

<211> 504

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

```

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

```

	340		345		350										
Arg	Met	Val	His	Phe	Ser	Pro	Asp	Ser	His	His	His	Asp	His	Trp	Phe
	355						360					365			
Ser	Pro	Gly	Ala	Arg	Thr	Glu	His	Asp	Gln	His	Gln	Leu	Leu	Arg	Asp
	370					375						380			
Asn	Arg	Ala	Glu	Arg	Gly	His	Lys	Lys	Asn	Cys	Ser	Val	Arg	Thr	Ala
385					390					395				400	
Ser	Arg	Gln	Thr	Ser	Met	His	Leu	Gly	Ser	Leu	Cys	Thr	Gly	Asp	Ile
			405					410					415		
Lys	Arg	Arg	Arg	Lys	Ala	Ala	Pro	Leu	Pro	Gly	Pro	Thr	Thr	Ala	Gly
		420					425					430			
Phe	Val	Gly	Glu	Asn	Ala	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Asn	Asn	Ile	Gly	Asn
	435					440					445				
Arg	Met	Leu	Gln	Asn	Met	Gly	Trp	Thr	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Arg
450					455					460					
Asp	Gly	Lys	Gly	Ile	Ser	Glu	Pro	Ile	Gln	Ala	Met	Gln	Arg	Pro	Lys
465				470					475				480		
Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Phe	Pro	Leu	Pro	Lys	Ser	Thr	Ser	Ala	Thr	Thr
			485				490						495		
Thr	Pro	Asn	Ala	Gly	Lys	Ser	Ala								
	500														

<210> 3
 <211> 425
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<400> 3
 gatcaagctt tttttttttt tttttttttt ttttggataa caacgatgag gtttattttt
 60
 gtcaaaacat ccaagggaaa cattaattgt tgtttgtcaa ctgtgaactt cacactacat
 120
 tgtctaagga tagaaaattg atgggtatca ctctgtcaga aaatcctcac caagaagcca
 180
 attcaaggaa tatgaaattg acaagccttt caaacaaga tgtgttcgga cttcactgat
 240
 gcgatggtag gtcttttggg ttacaataga tagggatgat ataaaacaca atcttttctt
 300
 gtctattcca ttttagaaac tgggtgggtgt gctcacggtt gtctgggcat tgcagcactg
 360
 cacacatata tgaattaagc aaagcatcgg aaagtattga cacatgagac taaaataaat
 420
 aagag
 425

<210> 4
 <211> 7
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens

<400> 4
 aacatgg
 7

<210> 5

<211> 320
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 5

```

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

```

<210> 6
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 6

```

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

```

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

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 7

ttttgatcaa gctttttttt tttttttttt tttttttttt tttt
44

<210> 8

<211> 42

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Adaptor

<400> 8

ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc ag
42

<210> 9

<211> 12

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Adaptor

<400> 9

ggcccgtcct ag
12

<210> 10

<211> 40

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Adaptor

<400> 10

gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcgcccgag
40

<210> 11

<211> 10

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Adaptor

<400> 11

cggctcctag

10

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 12

ctaatacgac tcactatagg gc

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 13

tcgagcggcc gcccgggcag ga

22

<210> 14

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 14

agcgtggtcg cggccgagga

20

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 15

atatcgccgc gctcgtcgtc gacaa
25

<210> 16
<211> 26
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 16
agccacacgc agtcattgt agaagg
26

<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 17
gacttcactg atgcgatggt aggt
24

<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Primer

<400> 18
gtcaatactt tccgatgctt tgct
24

<210> 19
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 19
Ser Ile Leu Thr Gly Ser Phe Pro Leu
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 20
Arg Met Leu Gln Asn Met Gly Trp Thr

1

5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 21

Leu Val His Asp Leu Val Ser Ala Leu

1

5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

Ser Leu Ser Ser Thr Asp Ala Gly Leu

1

5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 23

Lys Ile Gln Asp Glu Gly Val Val Leu

1

5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 24

Phe Val Gly Glu Asn Ala Gln Pro Ile

1

5

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 25

Ile Leu Thr Gly Ser Phe Pro Leu Met

1

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 26

Lys Met Glu Cys Glu Glu Gln Lys Val

1

5

<210> 27
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 27
 Lys Gly Leu Gly Leu Gly Phe Pro Leu
 1 5

<210> 28
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens

<400> 28
 Gly Leu Gly Arg Asp Gly Lys Gly Ile
 1 5
 1

9

Patentansprüche

1. Antikörper oder Fragment desselben, welcher/welches immunspezifisch an ein 84P2A9 Protein bindet, das die Sequenz SEQ ID Nr. 2 enthält, welche mit einem zytotoxischen Mittel zur Abtötung einer Krebszelle gelabelt ist, die das 84P2A9 Protein exprimiert.

2. Antikörper oder Fragment desselben nach Anspruch 1, wobei das zytotoxische Mittel von einem radioaktiven Isotop, einem chemotherapeutischen Mittel oder einem Toxin gebildet ist.

3. Antikörper oder Fragment desselben nach Anspruch 2, wobei das radioaktive Isotop aus der Gruppe ²¹¹At, ¹³¹I, ¹²⁵I, ⁹⁰Y, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ²¹²Bi, ³²P und radioaktiven Isotopen von Lu gewählt ist.

4. Antikörper oder Fragment desselben nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Antikörper oder das Fragment desselben ferner einen pharmazeutisch verträglichen Träger aufweist.

5. In vitro Verfahren zur Feststellung von Krebs in einer Untersuchungsprobe, umfassend:
 – Inkontaktbringen der Probe mit einem Antikörper bzw. mit einem Polynukleotid, welcher/welches spezifisch an das 84P2A9 Protein (SEQ ID Nr. 2) bzw. an das Polynukleotid, welches das Protein kodiert, bindet; und
 – Ermitteln einer Bindung des 84P2A9 Protein bzw. des Polynukleotides in der Probe an dieselbe, wobei das Vorhandensein von erhöhtem 84P2A9 Polynukleotid oder Protein in der Untersuchungsprobe im Vergleich mit der normalen Gewebeprobe einen Hinweis auf das Vorhandensein von Krebs liefert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Polynukleotid eine mRNA ist.

7. Verfahren nach Anspruch 5, wobei das Polynukleotid eine cDNA ist, welche von der Probe durch reverse Transkription produziert worden ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 7, wobei der Krebs aus der Gruppe Leukämie sowie Krebsen der Prostata, der Hoden, der Nieren, des Gehirns, der Knochen, der Haut, der Eierstöcke, der Brust, der Bauchspeicheldrüse, des Darmes (Kolon) und der Lungen gewählt ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 8, wobei die Untersuchungsprobe und die normale Gewebeprobe aus der Gruppe Serum, Blut und Urin sowie Geweben der Prostata, der Hoden, der Nieren, des Gehirns, der Knochen, der Haut, der Eierstöcke, der Brust, der Bauchspeicheldrüse, des Darmes (Kolon) und der Lungen gewählt sind.

10. Verwendung eines Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 4 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Beförderung eines zytotoxischen Mittels an eine Krebszelle, welche ein 84P2A9 Protein (SEQ ID Nr. 2) exprimiert.

11. Viraler Vektor, welcher das Polynukleotid der SEQ ID Nr. 1 enthält, zur Erzeugung einer Immunreaktion gegen das Protein der SEQ ID Nr. 2.

12. Viraler Vektor nach Anspruch 11, wobei der virale Vektor aus der Gruppe Vaccinia, Fowlpox, Canarypox, Adenovirus, Influenza, Poliovirus, Adeno-verbundene Viren, Lentivirus und Sindbisvirus gewählt ist.

Es folgen 14 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

GATCAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGATAACAACGATGAGGTTTATTTTTGTCAAAACA
TCCAAGGGAAACATTAATTGTTGTTTGTCAACTGTGAAC TTCACACTACATTGTCTAAGGATAGAAAAT
TGATGGGTATCACTCTGTCAGAAAATCCTCACCAAGAAGCCAATTCAAGGAATATGAAATTGACAAGCC
TTTCAAACAAAGATGTGTTTCGGACTTCACTGATGCGATGGTAGGTCTTTTGGGTTACAATAGATAGGGA
TGATATAAAACACAATCTTTTCCTGTCTATTCCATTTAGAAACTGGTGGGTGTGCTCACGTTTGTCTG
GGCATTGCAGCACTGCACACATACATGAATTAAGCAAAGCATCGGAAAGTATTGACACATGAGACTAAA
ATAAATAAGAG

FIG. 2A

```

5'  ATT  CGG  CAC  GAG  GTG  GAA  GTC  GCC  GGT  GCT  GTT  GTA  GTT  GGA  GTC  TGT  TCA  CGG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      11      20      29      38      47      56
GCC  TGA  GCT  TCG  AGG  CCA  GGC  TCC  TGG  GTG  TCG  TTA  ATG  TTC  GGG  GCC  GCC  GGG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      65      74      83      92     101     110
CGC  CAA  CCG  ATC  GGA  GCT  CCA  GCA  GCC  GGG  AAC  AGC  TGG  CAT  TTC  AGT  AGA  ACC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      119     128     137     146     155     164
ATG  GAG  GAG  CTG  GTT  CAT  GAC  CTT  GTC  TCA  GCA  TTG  GAA  GAG  AGC  TCA  GAG  CAA
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      173     182     191     200     209     218
    N  E  E  L  V  H  D  L  V  S  A  L  E  E  S  S  E  Q

GCT  CGA  GGT  GGA  TTT  GCT  GAA  ACA  GGA  GAC  CAT  TCT  CGA  AGT  ATA  TCT  TGC  CCT
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      227     236     245     254     263     272
    A  R  G  G  F  A  E  T  G  D  H  S  R  S  I  S  C  P

CTG  AAA  CGC  CAG  GCA  AGG  AAA  AGG  AGA  GGG  AGA  AAA  CGG  AGG  TCG  TAT  AAT  GTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      281     290     299     308     317     326
    L  K  R  Q  A  R  K  R  R  G  R  K  R  R  S  Y  N  V

CAT  CAC  CCG  TGG  GAG  ACT  GGT  CAC  TGC  TTA  AGT  GAA  GGC  TCT  GAT  TCT  AGT  TTA
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      335     344     353     362     371     380
    H  H  P  W  E  T  G  H  C  L  S  E  G  S  D  S  S  L

GAA  GAA  CCA  AGC  AAG  GAC  TAT  AGA  GAG  AAT  CAC  AAT  AAT  AAT  AAA  AAA  GAT  CAC
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      389     398     407     416     425     434
    E  E  P  S  K  D  Y  R  E  N  H  N  N  N  K  K  D  H

AGT  GAC  TCT  GAT  GAC  CAA  ATG  TTA  GTA  GCA  AAG  CGC  AGG  CCG  TCA  TCA  AAC  TTA
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      443     452     461     470     479     488
    S  D  S  D  D  Q  M  L  V  A  K  R  R  R  P  S  S  N  L

AAT  AAT  AAT  GTT  CGA  GGG  AAA  AGA  CCT  CTA  TGG  CAT  GAG  TCT  GAT  TTT  GCT  GTG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      497     506     515     524     533     542
    N  N  N  V  R  G  K  R  P  L  W  H  E  S  D  F  A  V

GAC  AAT  GTT  GGG  AAT  AGA  ACT  CTG  CGC  AGG  AGG  AGA  AAG  GTA  AAA  CGC  ATG  GCA
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      551     560     569     578     587     596
    D  N  V  G  N  R  T  L  R  R  R  R  K  V  K  R  M  A

GTA  GAT  CTC  CCA  CAG  GAC  ATC  TCT  AAC  AAA  CGG  ACA  ATG  ACC  CAG  CCA  CCT  GAG
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      605     614     623     632     641     650
    V  D  L  P  Q  D  I  S  N  K  R  T  M  T  Q  P  P  E

GGT  TGT  AGA  GAT  CAG  GAC  ATG  GAC  AGT  GAT  AGA  GCC  TAC  CAG  TAT  CAA  GAA  TTT
    ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---  ---
      659     668     677     686     695     704
    G  C  R  D  Q  D  M  D  S  D  R  A  Y  Q  Y  Q  E  F

```

FIG. 2B

ACC	AAG	AAC	AAA	GTC	AAA	AAA	AGA	AAG	TTG	AAA	ATA	ATC	AGA	CAA	GGA	CCA	AAA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
T	K	N	K	V	K	K	R	K	L	K	I	I	R	Q	G	P	K
ATC	CAA	GAT	GAA	GGA	GTA	GTT	TTA	GAA	AGT	GAG	GAA	ACG	AAC	CAG	ACC	AAT	AAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
I	Q	D	E	G	V	V	L	E	S	E	E	T	N	Q	T	N	K
GAC	AAA	ATG	GAA	TGT	GAA	GAG	CAA	AAA	GTC	TCA	GAT	GAG	CTC	ATG	AGT	GAA	AGT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	K	M	E	C	E	E	Q	K	V	S	D	E	L	M	S	E	S
GAT	TCC	AGC	AGT	CTC	AGC	AGC	ACT	GAT	GCT	GGA	TTG	TTT	ACC	AAT	GAT	GAG	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
D	S	S	S	L	S	S	T	D	A	G	L	F	T	N	D	E	G
AGA	CAA	GGT	GAT	GAT	GAA	CAG	AGT	GAC	TGG	TTC	TAC	GAA	AAG	GAA	TCA	GGT	GGA
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
R	Q	G	D	D	E	Q	S	D	W	F	Y	E	K	E	S	G	G
GCA	TGT	GGT	ATC	ACT	GGA	GTT	GTG	CCC	TGG	TGG	GAA	AAG	GAA	GAT	CCT	ACT	GAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
A	C	G	I	T	G	V	V	P	W	W	E	K	E	D	P	T	E
CTA	GAC	AAA	AAT	GTA	CCA	GAT	CCT	GTC	TTT	GAA	AGT	ATC	TTA	ACT	GGT	TCT	TTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
L	D	K	N	V	P	D	P	V	F	E	S	I	L	T	G	S	F
CCC	CTT	ATG	TCA	CAC	CCA	AGC	AGA	AGA	GGT	TTC	CAA	GCT	AGA	CTC	AGT	CGC	CTT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
P	L	M	S	H	P	S	R	R	G	F	Q	A	R	L	S	R	L
CAT	GGA	ATG	TCT	TCA	AAG	AAT	ATT	AAA	AAA	TCT	GGA	GGG	ACT	CCA	ACT	TCA	ATG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	G	M	S	S	K	N	I	K	K	S	G	G	T	P	T	S	M
GTA	CCC	ATT	CCT	GGC	CCA	GTG	GGT	AAC	AAG	AGA	ATG	GTT	CAT	TTT	TCC	CCG	GAT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
V	P	I	P	G	P	V	G	N	K	R	M	V	H	F	S	P	D
TCT	CAT	CAC	CAT	GAC	CAT	TGG	TTT	AGC	CCT	GGG	GCT	AGG	ACA	GAG	CAT	GAC	CAG
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
S	H	H	H	D	H	W	F	S	P	G	A	R	T	E	H	D	Q
CAT	CAG	CTT	CTG	AGA	GAT	AAT	CGA	GCT	GAA	AGA	GGA	CAC	AAG	AAA	AAT	TGT	TCT
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
H	Q	L	L	R	D	N	R	A	E	R	G	H	K	K	N	C	S

FIG. 2C

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

FIG. 2D

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

FIG. 3A

```

4 MDELVHDLASALEQTSQNKLG--ELWEEMALSPRQQRQLRKRGRKRRS-DFTHLAEH
1 MEELVHDLVSALEESSEQARCGFAETGDHSRSISCPILKRQARKRRGRKRRSYNVHHPWET
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
61 TCCYSEASESSLDEATKDCREVAPVT--NFSDSDDTM-VAKRHFA--LNAIVKSKQHSWH
61 GHCLSEGSDSSLEEPSKYRENNNNKDHSDSDQMLVAKRRPSSNLNNNVRGKRPLWH
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
116 ESDSFTENAPCRPLRRRKVKRVTSEVAASLQQKLKVDWSYERGCRFKSAKKQRLSRWK
121 ESDFAVDNVGNRTLRRRKVKRMAVDLPQDISNKRMT--QPFEGCRDQDMDSRAYQYQ
  *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
176 ENTPWTSSGH-----GLCESAENRTFLSKTGRKERMECETDEQKQGSDENMSECETSS
179 EFTKNKVKRKLKIIRQGPKIQDEGVVLESEETNQTNKDKMECEEQKVSDELMSESDSS
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
229 VCSSSDTGLFTNDEGRQGDDEQSDWFYEGECVPGFTVPNLLPKWAPDHCSEVERM--DSG
239 L-SSTDAGLFTNDEGRQGDDEQSDWFYEKESGGACGITGVVPWWEKEDPTELDKNVDPDV
  ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
287 LDKFSDSTFLLPSRPAQRGYHTRLNRLPGAAARCLRK
298 FESILTGSFPLMSHPRRGFQARLSRLHGMSSKNIKK
  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIG. 3B

```

744 SNIGNKMLQAMGWREGSGLGRKCOGITAPIEAQVRLKAGLG
444 NNIGNRMLQNMGWTPGSGLGRDGKGISEPIQAMQRPKGLGLG
  **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIG. 4A

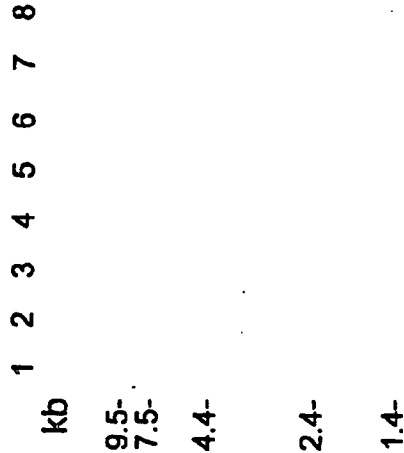
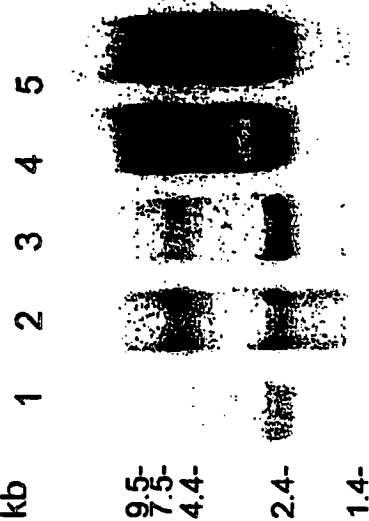


FIG. 4B



FIG. 4C



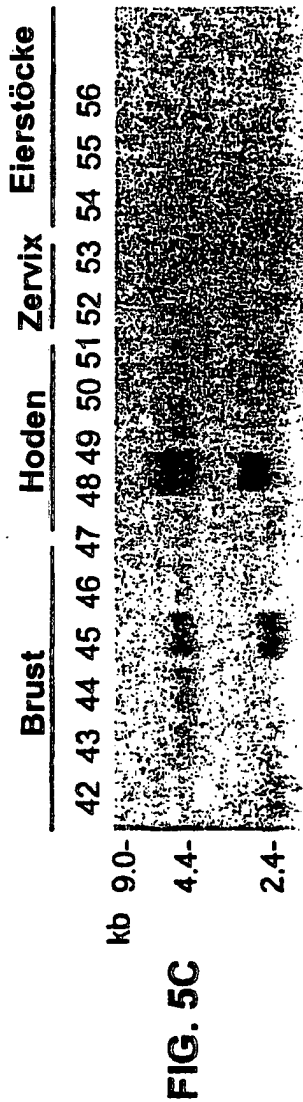
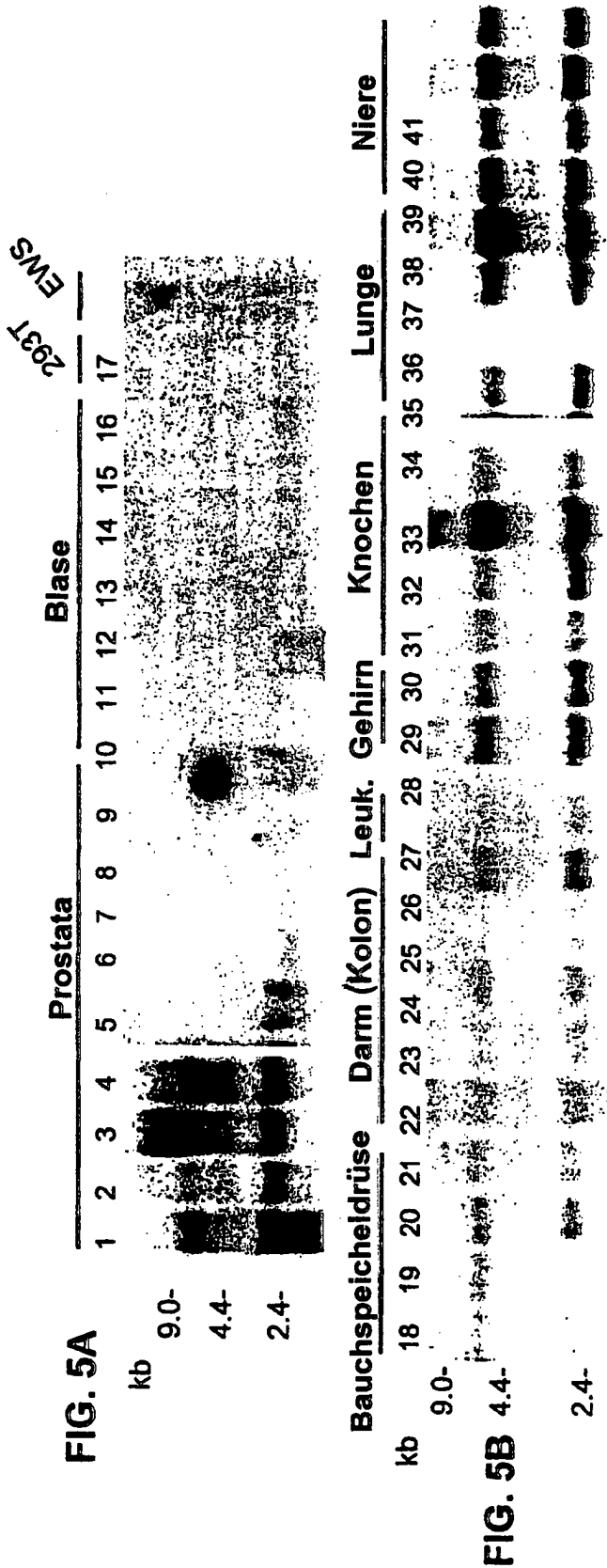


FIG. 6



FIG. 7

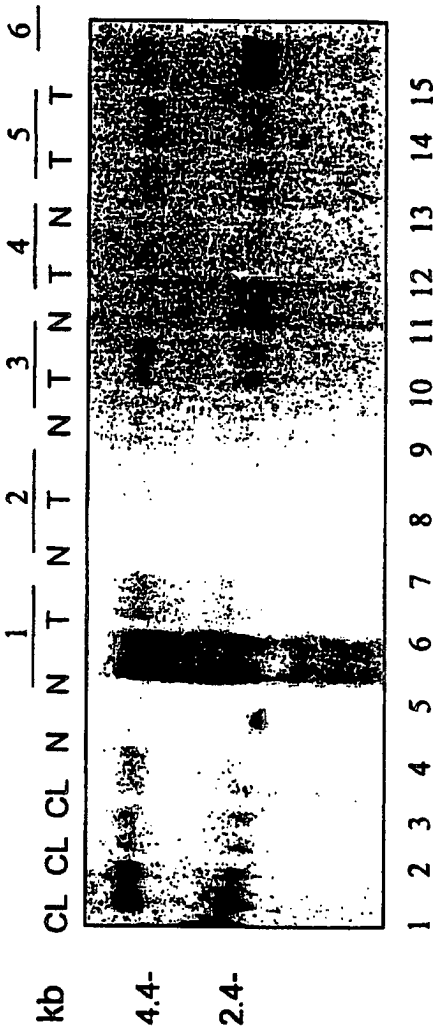


FIG. 8

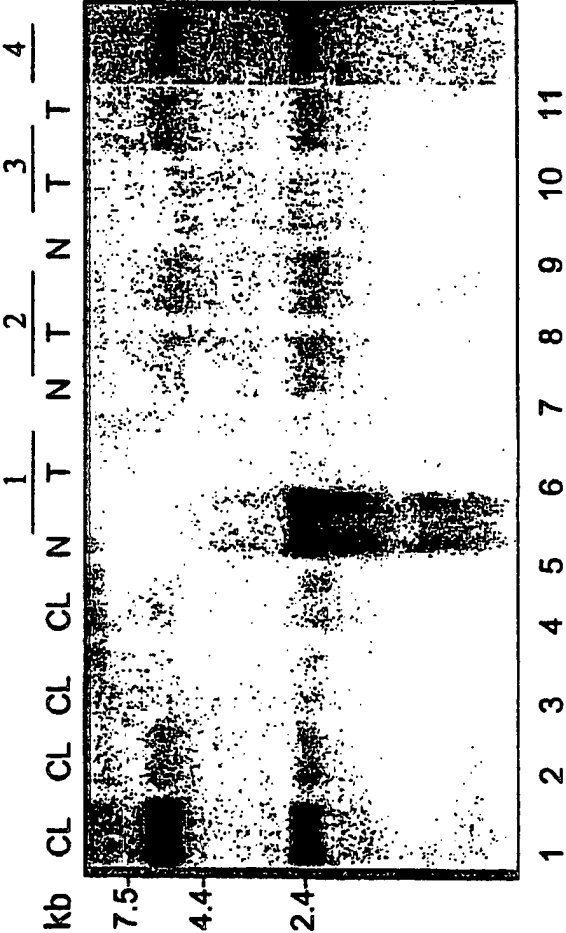


FIG. 9

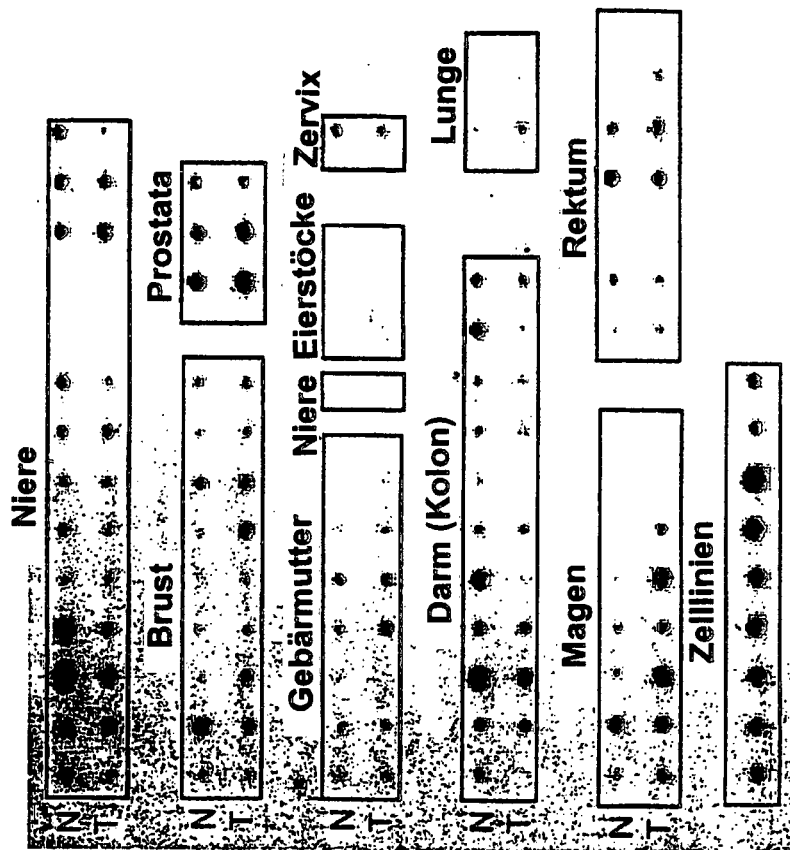


FIG. 10

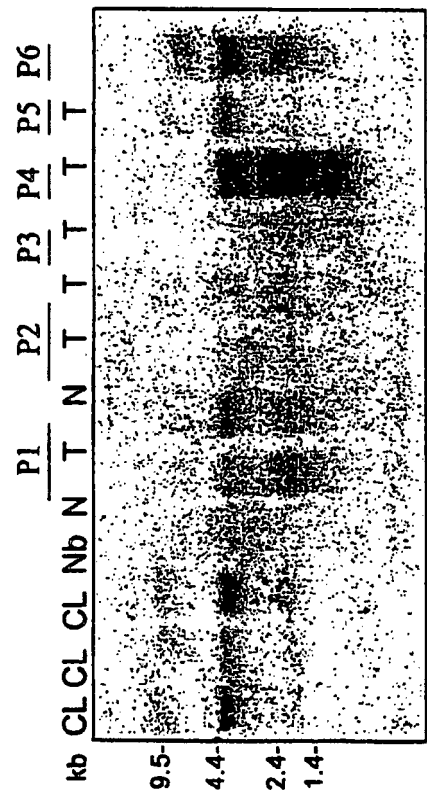


FIG. 11

