

(12) PATENT

(19) NO

(11) 338744

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20065874	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2005.05.17 PCT/US2005/17412
(22)	Inng.dag	2006.12.18	(85)	Videreføringsdag	2006.12.18
(24)	Løpedag	2005.05.17	(30)	Prioritet	2004.05.28, US, 10/857,484 2004.10.05, US, 60/616,381 2004.10.12, US, 60/617,881 2004.10.21, US, 60/621,310 2004.12.02, US, 60/633,077 2005.04.14, US, 60/672,000 2004.05.28, WO, PCT/US04/17231
(41)	Alm.tilgj	2006.12.19			
(45)	Meddelt	2016.10.17			
(73)	Innehaver	Agensys Inc, 2225 Colorado Avenue, US-CA90404 SANTA MONICA , USA Aya Jakobovits, 3135 Hutton Drive, US-CA90210 BEVERLY HILLS, USA Arthur B Raitano, 12685 Rose Avenue, US-CA90066 LOS ANGELES, USA Pia M Challita-Eid, 15745 Morrison Street, US-CA91436 ENCINO, USA Karen J Morrison, 1044 Yale Street, US-CA90403 SANTA MONICA, USA Xiao-Chi Jia, 2262 Beverly Drive, US-CA90034 LOS ANGELES, USA Jean Gudas, 17157 Palisades Circle, US-CA90272 PACIFIC PALISADES, USA Robert Kendall Morrison, 1044 Yale Street, US-CA90403 SANTA MONICA, USA Hui Shao, 3175 South Sepulveda Blvd Apartment 206, US-CA90034 LOS ANGELES, USA			
(72)	Oppfinner				
(74)	Fullmektig	Bryn Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 OSLO, Norge			

(54)	Benevnelse	Monoklonale antistoffer og fremgangsmåte for fremstilling derav og anvendelse, samt hybridom, polynukleotid, peptid, vektor, celle og farmasøytisk sammensetning
(56)	Anførte publikasjoner	US 2004018571 A1 WO 0140309 A Ross S. ET AL. Prostate stem cell antigen as therapy target: Tissue expression and in vivo efficacy of an immunoconjugate. Cancer research. 2002, vol.62, no. 9, side 2546-2553. EP 2514876 A US 6258939 B1 Saffran D.C. ET AL. Anti-PSCA mAbbs inhibit tumor growth and metastasis formation and prolong the survival of mice bearing human prostate cancer xenografts. Proc. Natl. Acad.
(57)	Sammendrag	

Antistoffer og molekyler avledet derfra som binder til nye PSCA-protein og varianter derav, er beskrevet hvor PSCA oppviser vevsspesifikk ekspresjon i normalt voksent vev og er avvikende uttrykt i kreftene listet opp i tabell I. Følgelig tilveiebringer PSCA et diagnostisk, prognostisk, profylaktisk og/eller terapeutisk mål for kreft. PSCA-genet eller fragment derav, eller dens kodete protein eller varianter derav eller et fragment derav, kan anvendes for å fremkalle en humoral eller cellulær immunrespons; antistoffer eller T-celler reaktive med PSCA kan anvendes i aktiv eller passiv immunisering.

```

1          M K A V L L L A L L M A G L A L
1  agggagaggcagctgaeeatgaaggctgtgctgcttgcctgttgatggcagccttgccc
16  Q P G T A L L C Y S C K A Q V S H E D C
61  TGCAGCCAGGACATGCCCTGCTGTGCTACTGCTGCAAGCCAGGTGAGCAACGAGGACT
36  L Q V E N C T Q L G Z Q C W T A R I R A
121 GCCCTGACGTGGAGACTGCACCCAGCTGGGGAGACAGCTGCAGCCGCGGCGCTCCGG
56  V G L L T V I S R G C S L N C V D D S Q
181 CACTGGCCCTCTGACCGTCATCAGCAAGGCTGCAGCTTGAATCCGTGGATGACTCAC
76  D Y V Y V G K F N I T C C D T D L C H A S
241 AGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCA
36  G A H A L O C A A A I L A L L P A L G L
301 GCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCCCATCCTTGCCTGCTCTCCTGCTACCTGCC
116  L L W G P G Q L
361 TCTGCTCTGGGACCCGCCAGCTATAGctctggggggcccgctgcagctccactcg
421 ggtgtggtgcccacaggcccttctgcccactctccacgaacctggcccaagtggagcctgt
481 cctggttctcaggaccactccaaacgcgaagtgtaccatttatacttgcaccccttttcg
541 ccnaacccctgaccttccccatggggctttctccagatttccacccggcaagctcagtttag
601 tgcacagctacccgtgcagatggggccctccaaacctttctgtctgtttctatggccc
661 agcattttccacccttaacccctgtgttcagggaactttctcccccagggaagccttccctgc
721 ccccccatttatgaattgagccagtttttgctccgtggtgtcccccgcaccacagcagggg
781 acaggcaactcaggagggcccgataaaggctgagatgaagtggactgagtagaactcggagg
841 acaaggagtgcagctgagttctctggggagttttcccgagatggggcctggaggcttggggaa
901 ggggcacggcctacatttctgtgggctcccgagctgagcagcagcagagcttagccac
961 taataaacacctgttgataaagcaaaaaa

```

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0001] Oppfinnelsen beskrevet her angår monoklonale antistoffer og fremgangsmåte for fremstilling derav og anvendelse, samt hybridom, polynukleotid, peptid, vektor, celle og farmasøytisk sammensetning. Antistoffene binder proteiner betegnet PSCA.

[0002] BAKGRUNN FOR OPPFINNELSEN

[0003] Kreft er den andre viktigste årsaken til human død nest etter koronar sykdom. Verden over dør millioner av mennesker av kreft hver år. I USA alene, som angitt av den amerikanske kreftforeningen "American Cancer Society", forårsaker kreft døden godt over en halv million mennesker årlig, med over 1,2 million nye tilfeller diagnostisert pr. år. Mens dødsfall fra hjertesykdom er av nedgående betydelig er de resulterende fra kreft generelt i økningen. I den tidlige delen av neste århundre er kreft forutsagt til å bli den ledende årsaken til død.

[0004] Verden over står mange krefter som den ledende dødsårsak. Spesielt karsinomer i lungene, prostataen, brystet, kolonen, bukspyttkjertelen, eggstokken og blæren representerer den primære årsaken til kreftdød. Disse og praktisk talt alle andre karsinomer deler et vanlig dødelig trekk. Med meget få unntak er metastasisk sykdom fra et karsinom dødelig. Videre har selv for de kreftpasienter som innledningsvis overlever sin primærkreft vanlig erfaring vist at deres liv er dramatisk endret. Mange kreftpasienter erfarer sterk angst drevet av bevisstheten på potensialet for tilbakekomst eller behandlingssvikt. Mange kreftpasienter erfarer fysiske svakheter etterfulgt av behandling. Videre erfarer mange kreftpasienter en tilbakekomst.

[0005] Verden over er prostatakreft den fjerde mest utbredte kreften i menn. I Nord-Amerika og nordlig Europa er det i høy grad den vanligste kreften i menn og er den andre ledende årsak til kreftdød i menn. I USA alene dør godt over 30.000 menn årlig av denne sykdommen – nest etter kun lungekreft. Til tross for størrelsen av disse tallene er det fortsatt ingen effektiv behandling for metastasisk prostatakreft. Kirurgisk prostatektomi, strålingsterapi, hormon ablasjonsterapi, kirurgisk kastrasjon og kjemoterapi fortsetter å være hoved behandlingsmodalitetene. Uheldigvis er disse behandlingene ineffektive for mange og er ofte forbundet med uønskede konsekvenser.

[0006] På den diagnostiske fronten forblir mangelen på en prostatatumormarkør som nøyaktig kan detektere tidlig trinn lokaliserte tumorer en betydelig begrensning i diagnosen

og behandlingen av denne sykdommen. Selv om serum prostata spesifikt antigen (PSA)-forsøket er et meget anvendelig verktøy er imidlertid dens spesifisitet og generelle nytte bredt betraktet som manglende i mange viktige henseende.

[0007] Fremskritt i identifikasjon av ytterligere spesifikke markører for prostatakraft er forbedret ved dannelsen av prostatakraft-xenografts som kan rekapitulere forskjellige trinn av sykdommen hos mus. LAPC (Los Angeles Prostate Cancer)-xenograftene er prostatakraft-xenografts som har overlevd passasje i alvorlig kombinert immunsvikt (SCID)-mus og har vist kapasiteten til å etterligne overgangen fra androgenavhengighet til androgenuavhengighet (Klein *et al.*, 1997, Nat. Med. 3:402). Senere identifiserte prostatakraftmarkører omfatter PCTA-1 (Su *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), prostataspesifikk membran (PSM)-antigen (Pinn *et al.*, Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Dec 7; 96(25): 14523-8) og prostatastamcelleantigen (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735).

[0008] Mens tidligere identifiserte markører slik som PSA, PSM, PCTA og PSCA har forenklet anstrengelser for å diagnostisere og behandle prostatakraft er det behov for identifikasjon av ytterligere markører og terapeutiske mål for prostata og relaterte krefter for å videre forbedre diagnose og terapi.

[0009] Nyrecellekarsinom (RCC) svarer for omtrent 3 prosent av voksnes ondartede sykdommer. Med én gang adenomer når en diameter på 2 til 3 cm eksisterer ondartet potensiale. I de voksne er de to prinsipielle ondartete nyretumorer nyrecelle adenokarsinom og overgangs cellekarsinom fra nyrebekkenet eller ureteren. Forekomsten av nyrecelle adenokarsinom blir beregnet til mer enn 29.000 tilfeller i USA og mer enn 11.600 pasienter døde av denne sykdommen i 1998. Overgangs cellekarsinom er mindre frekvent, med en forekomst på omtrent 500 tilfeller pr. år i USA.

[0010] Kirurgi har vært den primære terapien for nyrecelle adenokarsinom i mange tiår. Inntil nylig har metastasisk sykdom vært motstandsdyktig til hvilken som helst systemisk terapi. Med nyere utviklinger i systemiske terapier, spesielt immunoterapier, kan metastasisk nyrecellekarsinom bli angrepet aggressivt i passende pasienter med en mulighet for varige responser. Allikevel er det et gjenværende behov for effektive terapier for disse pasientene.

[0011] Av alle nye tilfeller av kreft i USA representerer blærekraft omtrent 5 prosent i menn (femte vanligste neoplasme) og 3 prosent hos kvinner (åttende vanligste neoplasme). Forekomsten øker langsomt, samtidig med en økende eldre populasjon. I 1998 var det beregnet 54.500 tilfeller, omfattende 39.500 hos menn og 15.000 hos kvinner. Den

aldersregulerte forekomsten i USA er 32 pr. 100.000 for menn og åtte pr. 100.000 hos kvinner. Det historiske mannlig/kvinnelig-forholdet på 3:1 kan være minkende relatert til røkingsmønstre hos kvinner. Det ble beregnet 11.000 dødsfall fra blærekreft i 1998 (7.800 i menn og 3.900 hos kvinner). Blærekreftforekomst og dødelighet øker sterkt med alder og vil være et økende problem når populasjonen blir eldre.

[0012] De fleste blærekreft vender tilbake i blæren. Blærekreft er administrert med en kombinasjon av transuretral reseksjon av blæren (TUR) og intravesikal kjemoterapi eller immunoterapi. Den multifokale og tilbakevendende naturen til blærekreft påpeker begrensningene med TUR. Mest muskelinvasiv kreft blir ikke kurert ved TUR alene. Radikal cystektomi og urinær utlegging er det mest effektive middelet for å fjerne kreften, men bærer en ubeskridelig innvirkning på urinær og seksuell funksjon. Det fortsetter å være et betydelig behov for behandlingsmodaliteter som er fordelaktig for blærekreftpasienter.

[0013] Beregnet 130.200 tilfeller av kolorektal kreft skjedde i 2000 i USA, omfattende 93.800 tilfeller av kolonkreft og 36.400 av rektal kreft. Kolorektal kreft er den tredje vanligste kreft i menn og kvinner. Forekomstrater gikk betydelig ned i løpet av 1992-1996 (-2,1% pr. år). Forskning indikerer at disse nedgangene skyldes øket screening og polypfjerning, forhindring av polypprogresjon til invasive krefter. Det ble beregnet 56.300 dødsfall (47.700 fra kolonkreft, 8.600 fra rektal kreft) i 2000, som gjør rede for ca. 11% av alle U.S. kreftdødsfall.

[0014] Hittil er kirurgi den vanligste form av terapi for kolorektal kreft og for kreft som ikke har spredning, den er ofte kurativ. Kjemoterapi eller kjemoterapi pluss stråling, er gitt før eller etter kirurgi til de fleste pasienter hvor kreft har dypt perforert tarmveggen eller har spredning til lymfeknutene. En permanent kolostomi (frembringelse av en abdominal åpning for eliminering av kroppsavfall) er innimellom nødvendig for kolonkreft og er sjeldent nødvendig for rektal kreft. Det fortsetter å være et behov for effektive diagnostiske og behandlingsmodaliteter for kolorektal kreft.

[0015] Det ble beregnet 164.100 nye tilfeller av lunge- og bronkialkreft i 2000, som gjør rede for 14% av alle U.S. kreftdiagnoser. Forekomstraten av lunge- og bronkialkreft er betydelig nedgående i menn, fra en høy på 86,5 pr. 100.000 i 1984 til 70,0 i 1996. I 1990-årene begynte raten av økning blant kvinner å avta. I 1996 var forekomstraten hos kvinner 42,3 pr. 100.000.

[0016] Lunge- og bronkialkreft forårsaket beregnet 156.900 dødsfall i 2000, som gjør rede for 28% av alle kreftdødsfall. I løpet av 1992-1996 gikk dødelighet fra lungekreft betydelig

ned blant menn (-1,7% pr. år) mens rater for kvinner fortsatt var betydelig økende (0,9% pr. år). Siden 1987 har flere kvinner dødd hvert år av lungekreft enn brystkreft, som i over 40 år var hovedårsaken til kreftdød hos kvinner. Minkende lungekreftforekomst og dødelighetsrater resulterte sannsynligvis fra reduserte røkingsrater i løpet av de tidligere 30 år; imidlertid ligger minkende røkingsmønstre blant kvinner etter de for menn. Av betydning, selv om nedgangene i voksen tobakkanvendelse har saknet, øker tobakkanvendelse i unge igjen.

[0017] Behandlingsalternativer for lunge- og bronkialkreft blir bestemt ved typen og trinnet av kreften og omfatter kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi. For mange er lokalisert kreftkirurgi vanligvis behandlingsvalget. Fordi sykdommen vanligvis har spredning på tidspunktet den blir oppdaget er strålingsterapi og kjemoterapi ofte nødvendig i kombinasjon med kirurgi. Kjemoterapi alene eller kombinert med stråling er behandlingsvalget for småcellet lungekreft; på denne regimen erfarer en stor prosentdel av pasienter remisjon, som i noen tilfeller er langt vedvarende. Det er imidlertid et pågående behov for effektiv behandling og diagnostiske angrepmåter for lunge- og bronkialkreft.

[0018] Beregnet 182.800 nye invasive tilfeller av brystkreft ble forventet å forekomme blant kvinner i USA i løpet av 2000. I tillegg ble ca. 1.400 nye tilfeller av brystkreft forventet å bli diagnostisert i menn i 2000. Etter økning på ca. 4% pr. år i 1980-årene har brystkreftforekomstrater hos kvinner jevnet seg ut i 1990-årene til ca. 110,6 tilfeller pr. 100.000.

[0019] I U.S. alene ble det beregnet 41.200 dødsfall (40.800 kvinner, 400 menn) i 2000 på grunn av brystkreft. Brystkreft ranker som andre blant kreftdødsfall hos kvinner. I henhold til de nyeste data gikk dødelighetsrater betydelig ned i løpet av 1992–1996 med de største reduksjonene i yngre kvinner, både hvitte og sorte. Disse reduksjonene ble sannsynligvis resultatet av tidligere deteksjon og forbedret behandling.

[0020] Tatt i betraktning de medisinske omstendighetene og pasientens preferanser kan behandling av brystkreft involvere lumpektomi (lokal fjerning av tumoren) og fjerning av lymfeknutene under armen; mastektomi (kirurgisk fjerning av brystet) og fjerning av lymfeknutene under armen; strålingsterapi; kjemoterapi; eller hormonterapi. Ofte blir to eller flere fremgangsmåter anvendt i kombinasjon. En rekke undersøkelser har vist at for tidlig trinn sykdom er langvarig overlevelsesgrad etter lumpektomi pluss radioterapi lignende overlevelsesgrad etter modifisert radikal mastektomi. Betydelige fremskritt i rekonstruksjonsteknikker tilveiebringer mange alternativer for brystrekonstruksjon etter mastektomi. Nylig ble slik rekonstruksjon utført samtidig som mastektomien.

[0021] Lokal bortskjæring av duktal karsinom in situ (DCIS) med tilstrekkelige mengder av omliggende normalt brystvev kan forhindre den lokale tilbakekomsten av DCIS. Stråling av brystet og/eller tamoxifen kan redusere sjansen av DCIS som forekommer i det gjenværende brystvev. Dette er viktig fordi DCIS, hvis forblir ubehandlet, kan utvikles til invasive brystkreft. Allikevel er det alvorlige bivirkninger eller følger til disse behandlingene. Det er derfor et behov for effektive brystkreftbehandlinger.

[0022] Det ble beregnet 23.100 nye tilfeller av eggstokkreft i USA i 2000. Det redegjør for 4% av all kreft blant kvinner og ranker andre blant gynekologisk kreft. I løpet av 1992–1996 var eggstokkreftforekomstrater betydelig nedgående. Påfølgende til eggstokkreft ble det beregnet 14.000 dødsfall i 2000. Eggstokkreft forårsaker flere dødsfall enn hvilken som helst annen kreft i det kvinnelige reproduktive systemet.

[0023] Kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi er behandlingsalternativer for eggstokkreft. Kirurgi omfatter vanligvis fjerning av én eller begge ovarier, egglederen (salpingo-ooforektomi) og livmoren (hysterektomi). I noen meget tidlige tumorer vil bare den involverte eggstokken bli fjernet, spesielt i yngre kvinner som ønsker å få barn. I langt fremskredene sykdom er et forsøk gjort for å fjerne all intraabdominal sykdom for å forbedre effekten av kjemoterapi. Det fortsetter å være et viktig behov for effektive behandlingsalternativer for eggstokkreft.

[0024] Det ble beregnet 28.300 nye tilfeller av pankreatisk kreft i USA i 2000. I løpet av de siste 20 år har rater for pankreatisk kreft gått ned i menn. Rater blant kvinner har forblitt omtrent konstant men kan være i begynnelsen til nedgang. Pankreatisk kreft forårsaket beregnet 28.200 dødsfall i 2000 i USA. I løpet av de siste 20 år er der en lett men betydelig reduksjon i dødelighetsrater blant menn (omtrent –0,9% pr. år) mens rater har øket lett blant kvinner.

[0025] Kirurgi, strålingsterapi og kjemoterapi er behandlingsalternativer for pankreatisk kreft. Disse behandlingsalternativer kan forlenge overlevelse og/eller lindre symptomer i mange pasienter men er ikke sannsynlig for å produsere en kur for de fleste. Det er et betydelig behov for ytterligere terapeutiske og diagnostiske alternativer for kreft. Disse omfatter anvendelse av antistoffer, vaksiner og små molekyler som behandlingsmodaliteter. I tillegg er det også et behov å anvende disse modaliteter som forskningsverktøy for å diagnostisere, detektere, monitorere og videre tilstanden av fagområdet på alle områder av kreftbehandling og undersøkelser.

[0026] Den terapeutiske nytten av monoklonale antistoffer (mAbs) (G. Kohler and C. Milstein, *Nature* 256:495-497 (1975)) er blitt realisert. Monoklonale antistoffer har nå blitt godkjent som terapier i transplantasjon, kreft, infeksjøs sykdom, kardiovaskulær sykdom og inflammasjon. Forskjellige isotyper har forskjellig effektorfunksjoner. Slike forskjeller i funksjon er reflektert i distinkte 3-dimensjonale strukturer for de forskjellige immunoglobulinisotyper (P.M. Alzari *et al.*, *Annual Rev. Immunol.*, 6:555-580 (1988)).

[0027] Fordi mus er hensiktsmessige for immunisering og gjenkjenner de fleste humane antigener som fremmede har mAbs mot humane mål med terapeutisk potensiale typisk vært av murin opprinnelse. Imidlertid har murine mAbs iboende ulemper som humane terapeutiske midler. De krever hyppigere dosering som mAbs har en kortere sirkulerende halveringstid hos mennesker enn humane antistoffer. Mer kritisk er at den gjentatte administreringen av murine antistoffer til det humane immunsystemet forårsaker at det humane immunsystemet responderer ved å gjenkjenner museproteinet som et fremmed og dannelse av et humant antimus antistoff (HAMA)-respons. Slik en HAMA-respons kan resultere i allergisk reaksjon og den raske fjerningen av det murine antistoffet fra systemet fremgir derved behandlingen med murint antistoff som verdiløs. For å unngå slike påvirkninger er forsøk for å skape humane immunsystemer innen mus forsøkt.

[0028] Innledende forsøk håpet å skape transgene mus som er i stand til å respondere på antigener med antistoffer som har humane sekvenser (Se Bruggemann *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 86:6709-6713 (1989)), men ble begrenset av DNA-mengden som kunne bli holdt stabile ved tilgjengelige kloningskonstituentene. Anvendelsen av kunstig gjærkromosom (YAC)-kloningsvektorer ledet veien til innføring av store germlinfragmenter av humant Ig-lokus inn i transgene pattedyr. I det vesentlige en majoritet av de humane V-, D- og J-regionene arrangert med samme fordeling som funnet i det humane genom og de humane konstante regionene ble innført i mus ved anvendelse av YACer. Én slik transgene musestamme er kjent som xenomus ("XenoMouse(r))-mus og er kommersielt tilgjengelig fra Abgenix, Inc. (Fremont CA).

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0029] Oppfinnelsen tilveiebringer monoklonalt antistoff eller et antigenbindende fragment derav, idet det omfatter et antigenbindingssete som binder spesifikt til et PSCA protein omfattende aminosyresekvensen SEKV ID NR: 2 og hvor det monoklonale antistoffet omfatter aminosyresekvensen til V_H regionen av SEKV ID NR: 47 og V_L regionen av SEKV ID NR: 51. Det monoklonale antistoffet er produsert av hybridomen deponert under American

Type Culture Collection (ATCC) Accession No. PTA-6701. Det er beskrevet murine og andre mammalske antistoffer, kimære antistoffer, humaniserte og fullstendig humane antistoffer og antistoffer merket med en detekterbar markør eller terapeutisk middel. I visse utførelsesformer er det et forbehold at hele nukleinsyresekvensen fra figur 3 ikke er kodet og/eller hele aminosyresekvensen fra figur 2 ikke er fremstilt. I visse utførelsesformer er hele nukleinsyresekvensen fra figur 3 kodet og/eller hele aminosyresekvensen fra figur 2 fremstilt, hvilke som helst som er i respektive humane enhetsdoseformer.

[0030] Oppfinnelsen tilveiebringer videre fremgangsmåter for å detektere tilstedeværelsen og statusen av PSCA-polynukleotider og proteiner i forskjellige biologiske prøver, så vel som fremgangsmåter for å identifisere celler som uttrykker PSCA. En utførelsesform av oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter for overvåkning av PSCA-genprodukter i en vev- eller hematologiprøve som har eller er mistenkt for å ha noen former av vekstdysregulering slik som kreft.

[0031] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre hybridom, idet den produserer det monoklonale antistoffet ifølge krav 1 eller 2.

[0032] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre polynukleotid, idet det koder for en sekvens som omfatter en lettjede variabel region av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3.

[0033] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre peptid, idet det koder for en sekvens som omfatter en tungkjede variabel region av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3.

[0034] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre vektor, idet den omfatter polynukleotidet ifølge krav 7, krav 9 eller begge.

[0035] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre celle, idet den er transfektert med vektoren ifølge krav 11.

[0036] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre fremgangsmåte for produsering av et antistoff eller et antigenbindende fragment derav, idet den omfatter:

[0037] dyrking av en celle, hvor:

[0038] (a) cellen er blitt transfektert med en vektor som omfatter et polynukleotid ifølge krav 7 som koder for en sekvens som omfatter en lettjede variabel region og en vektor som omfatter et polynukleotid ifølge krav 9 som koder for en sekvens som omfatter en tungkjede variabel region; eller

[0039] (b) cellen er blitt transfektert med en vektor som omfatter både et polynukleotid ifølge krav 7 som koder for en sekvens som omfatter en lettkjede variabel region og et polynukleotid ifølge krav 9 som koder for en sekvens som omfatter en tungkjede variabel region;

[0040] hvorved antistoffet eller et antigenbindende fragment derav blir produsert.

[0041] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre farmasøytisk sammensetning, idet den omfatter antistoffet, eller Fab, F(ab')₂, Fv eller Sfv fragmentet derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4.

[0042] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre anti-cancermiddel for redusering av tumorvekst, idet nevnte anti-cancermiddel omfatter en kombinasjon av antistoffet, eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3 og et kjemoterapeutisk middel.

[0043] Foreliggende oppfinnelse omfatter videre anvendelse av et antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 for fremstilling av et medikament for anvendelse i en fremgangsmåte for hemming av veksten av en cancercelle som uttrykker et PSCA protein som omfatter aminosyresekvensen SEKV ID NR: 2 i et individ.

[0044] De terapeutiske sammensetningene kan anvendes for behandling av kreft som uttrykker PSCA slik som kreft i vev listet opp i tabell I, omfattende terapier rettet mot hemming av transkripsjonen, translasjonen, prosesseringen eller funksjonen av PSCA så vel som kreftvaksiner. KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

[0045] Figur 1. cDNAet og aminosyresekvensen for PSCA (også betegnet "PSCA-v.1" eller "PSCA-variant 1") er vist i figur 1A. Startmetioninen er understreket. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 18-389 omfattende stoppkodonet.

[0046] cDNAet og aminosyresekvensen for PSCA-variant 2 (også betegnet "PSCA-v.2") er vist i figur 1B. Kodonet for startmetioninen er understreket. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 56-427 omfattende stoppkodonet.

[0047] cDNAet og aminosyresekvensen for PSCA-variant 3 (også betegnet "PSCA-v.3") er vist i figur 1C. Kodonet for startmetioninen er understreket. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 423-707 omfattende stoppkodonet.

[0048] cDNAet og aminosyresekvensen for PSCA-variant 4 (også betegnet "PSCA-v.4") er vist i figur 1D. Kodonet for startmetioninen er understreket. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 424-993 omfattende stoppkodonet.

[0049] cDNAet og aminosyresekvensen for PSCA-variant 5 (også betegnet “PSCA-v.5”) er vist i figur 1E. Kodonet for startmetioninen er understreket. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 910-1479 omfattende stoppkodonet.

[0050] cDNAet og aminosyresekvensen for PSCA-variant 6 (også betegnet “PSCA-v.6”) er vist i figur 1F. Kodonet for startmetioninen er understreket. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 83-427 omfattende stoppkodonet.

[0051] Figur 1 G. SNP-varianter av PSCA-v.2, PSCA-v.7 til og med v.18. PSCA-v.7 til og med v.18 proteinene har 123 aminosyrer. Varianter PSCA-v.7 til og med v.18 er varianter med enkel nukleotidforskjell fra PSCA-v.2 og koder for det samme proteinet som v.2. Selv om disse SNP-variantene er vist separat kan de også forekomme i hvilke som helst kombinasjoner og i hvilke som helst av transkriptvariantene listet opp ovenfor i figurer 1A til og med 1F.

[0052] Figur 1H. SNP-varianter av PSCA-v.4, PSCA-v.19 til og med v.30. PSCA-v.19 til og med v.30 proteinene har 189 aminosyrer. Varianter PSCA-v.19 til og med v.30 er varianter med enkel nukleotidforskjell fra PSCA-v.4. PSCA-v.9-, v.10-, v.11-, v.24- og v.25-proteiner skiller seg fra PSCA-v.1 med én aminosyre. PSCA-v.23, v.28, v.29 og v.30 koder for det samme proteinet som v.4. Selv om disse SNP-variantene er vist separat kan de også forekomme i hvilke som helst kombinasjoner og i hvilke som helst av transkriptvariantene v.3 og v.4.

[0053] Figur 1I. Ekspresjon av PSCA-varianter. (1I(a)) Primere ble utformet for å differensiere mellom variantene PSCA-v.1/v.2/v.4, PSCA-v.3 og PSCA-v.5. Primere A og B, angitt med små piler ovenfor eksoner i figuren resulterer i et PCR-produkt på 425 bp for PSCA-v.1/v.2/v.4, et PCR-produkt på 300 bp for PSCA-v.3 og et PCR-produkt på 910 bp for PSCA-v.5. (1I(b)) Første tråds cDNA ble fremstilt fra normal blære, hjerne, hjerte, nyre, lever, lunge, prostata, milt, skjelettmuskel, testikkel, bukspyttkjertel, kolon, mage, samlinger av prostatakreft, blærekreft, nyrekreft, kolonkreft, lungekreft, eggstokkreft, brystkreft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkreft. Normalisering ble utført med PCR ved anvendelse av primere til aktin. Semikvantitativ PCR ved anvendelse av de variantspesifikke primerne ble utført ved 30 syklerv av amplifisering. Resultater viser ekspresjon av PSCA-v.5 hovedsakelig i brystkreft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkreft og ved lavere nivå i kolonkreft og lungekreft. PSCA-v.1/v.2/v.4-PCR-produkt ble detektert i prostatakreft, blærekreft, nyrekreft, kolonkreft, lungekreft, eggstokkreft, brystkreft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkreft. Blant normalt vev ble PSCA-v.1/v.2/v.4-PCR-produkt detektert bare i prostata, mage og ved lavere

nivå i nyre og lunge, mens PSCA-v.5 ikke ble detektert i noen som helst normale vev. PSCA-v.3-PCR-detektert produkt ble ikke detektert i noen som helst av de testete prøvene.

[0054] Figur 1J. Ekspresjon av PSCA-v.4 og PSCA-v.5. 1J(a) Primere ble utformet for å differensiere mellom PSCA-v.4 og PSCA-v.5 som angitt med pilene merket B og C i figuren. Primere spesifikke for PSCA-v.4 fører til et PCR-produkt på 460 bp, mens primere spesifikke for PSCA-v.5 fører til et PCR-produkt på 945 bp i størrelse. 1J(b) Første tråds cDNA ble fremstilt fra normal blære, hjerne, hjerte, nyre, lever, lunge, prostata, milt, skjellettmskel, testikkel, bukspyttkjertel, kolon, mage, samlinger av prostatakraft, blærekræft og multi-xenograftsamling (prostatakraft-, nyrekræft- og blærekræft-xenograft). Normalisering ble utført med PCR ved anvendelse av primere til aktin. Semikvantitativ PCR ved anvendelse av de variantspesifikke primerne ble utført ved 30 sykler av amplifisering. Resultater viser ekspresjon av PSCA-v.4 i prostatakraft-, blærekræft- og multi-xenograftsamling, normal nyre og prostata. PSCA-v.5 ble detektert bare i normal prostata og blærekræft.

[0055] Figur 2. Aminosyresekvenser til PSCA-antistoffer. Figur 2A. Aminosyresekvensen til Ha1-4.117-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2B.

Aminosyresekvensen til Ha1-4.117-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur

2C. Aminosyresekvensen til Ha1-4.120-VH. Figur 2D. Aminosyresekvensen til Ha1-4.120-

VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 2E. Aminosyresekvensen til Ha1-

5.99-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2F. Aminosyresekvensen til

Ha1-5.99-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 2 G. Aminosyresekvensen

til Ha1-4.121-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2H.

Aminosyresekvensen til Ha1-4.121-VL-c.5. Understreket er lettkjedens konstante region.

Figur 2I. Aminosyresekvensen til Ha1-4.121-VL-c.26. Understreket er lettkjedens konstante

region. Figur 2J. Aminosyresekvensen til Ha1-1.16-VH. Understreket er tungkjedens

konstante region. Figur 2K. Aminosyresekvensen til Ha1-1.16-VL. Understreket er

lettkjedens konstante region. Figur 2L. Aminosyresekvensen til Ha1-4.5-VH. Understreket er

tungkjedens konstante region. Figur 2M. Aminosyresekvensen til Ha1-4.5-VL. Understreket

er lettkjedens konstante region. Figur 2N. Aminosyresekvensen til Ha1-4.40-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2O. Aminosyresekvensen til Ha1-4.40-

VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 2P. Aminosyresekvensen til Ha1-

4.37-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2Q. Aminosyresekvensen til

Ha1-4.37-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 2R. Aminosyresekvensen til

Ha1-1.43-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2S. Aminosyresekvensen

til Ha1-1.43-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 2T. Aminosyresekvensen til Ha1-1.152-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 2U.

Aminosyresekvensen til Ha1-1.152-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

[0056] Figur 3. Nukleotid- og aminosyresekvenser for PSCA-antistoffer. Figur 3A. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.117-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3B. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.117-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3C. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.120-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3D. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.120-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3E. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-5.99-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3F. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-5.99-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3G. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.121-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3H. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.121-VL-c.5. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3I. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.121-VL-c.26. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3J. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-1.16-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3K. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-1.16-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3L. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.5-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3M. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.5-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3N. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.40-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3O. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.40-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3P. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.37-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3Q. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-4.37-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3R. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-1.43-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3S. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-1.43-VL. Understreket er lettkjedens konstante region. Figur 3T. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-1.152-VH. Understreket er tungkjedens konstante region. Figur 3U. cDNAet og aminosyresekvensen for Ha1-1.152-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

[0057] Figur 4. Oppstilling av PSCA-antistoffer til germlin-V-D-J-sekvenser. Figur 4A. Oppstilling av Ha1-4.117-VH (SEKV ID NR: 13) til human-VH4-31. Figur 4B. Oppstilling av Ha1-4.117-VL (SEKV ID NR: 14) til human L19. Figur 4C. Oppstilling av Ha1-4.120-VH

(SEKV ID NR: 15) til human-VH4-31. Figur 4D. Oppstilling av Ha1-4.120-VL (SEKV ID NR: 16) til human O2. Figur 4E. Oppstilling av Ha1-5.99-VH (SEKV ID NR: 17) til human-VH4-34. Figur 4F. Oppstilling av Ha1-5.99-VL (SEKV ID NR: 18) til human A27. Figur 4 G. Oppstilling av Ha1-4.121-VH (SEKV ID NR: 19) til human-VH4-34. Figur 4H. Oppstilling av Ha1-4.121-c.5-VL (SEKV ID NR: 20) til human O8. Figur 4I. Oppstilling av Ha1-4.121-c.26-VL (SEKV ID NR: 21) til human A3. Figur 4J. Oppstilling av Ha1-1.16-VH (SEKV ID NR: 22) til human-VH6-1. Figur 4K. Oppstilling av Ha1-1.16-VL (SEKV ID NR: 23) til human B3. Figur 4L. Oppstilling av Ha1-4.37-VH (SEKV ID NR: 28) til human-VH4-31. Figur 4M. Oppstilling av Ha1-4.37-VL (SEKV ID NR: 29) til human O2.

[0058] Figur 5. Ekspresjon av PSCA-protein i rekombinant murine, rotte og humane cellelinjer. De angitte murine, rotte og humane cellelinjene ble infiserte med retrovirus som bærer det humane PSCA-cDNAet og et neomycinresistensgen eller kontrollvirus med bare neomycinresistensgenet. Stabile rekombinante cellelinjer ble valgt i nærvær av G418. PSCA-ekspresjon ble bestemt ved FACS-merking med 1G8-anti-PSCA-MAb (5 ug/ml). Vist er FACS-profilen av hver cellelinje som demonstrerer et fluorescerende skift bare i den PSCA-infiserte linjen indikativ for celleoverflate-PSCA-ekspresjon. Disse linjene er anvendelige i MAb-utvikling som immunogener, MAb-screeningsreagenser og i funksjonelle forsøk.

[0059] Figur 6. Rensning av PSCA-protein fra *E. coli*. *E. coli*-stamme BL21-pLysS ble transformert med pET-21b-vektor som koder for aminosyrer 21-94 fra PSCA-cDNAet. PSCA-protein ble uttrykt ved induksjon av logfase-kulturer med IPTG og renses ved affinitetskromatografi fra enten de oppløselige eller uoppløselige fraksjonene av de lyserte bakteriene. Vist er SDS-PAGE Coomasie-blåfargete geler av de eluerte fraksjonene. Dette proteinet er anvendelig som et MAb- og pAb-immunogen og som et antistoffscreeningsreagens.

[0060] Figur 7. Rensning av rekombinant glykosylert PSCA-protein uttrykt fra 293T-celler. 293T-celler ble transfektert med psecTag2-vektoren som bærer et PSCA-cDNA som koder for aminosyrer 28-100. En stabil rekombinant PSCA-utskillende cellelinje ble dannet ved medikamentsелеksjon med hygromycin B. PSCA-protein til stede i kondisjonert dyrkningsmedium ble renses ved affinitetskromatografi ved anvendelse av 1G8-MAbet. Vist er en Coomasie-blåfarget SDS-PAGE-gel av de lav-pH-eluerte fraksjonene. Det brede molekylvektssmearen ("the molecular weight smear") av proteinet demonstrerer glykosylering av rekombinant PSCA-protein som sees i endogent uttrykt PSCA.

[0061] Figur 8. Rensning av GST-PSCA-protein fra *E. coli*. *E. coli*-stamme BL21-DE3 ble transformert med pGEX-2T som koder for aminosyrer 18-98 av PSCA kondensert til glutation-S-transferase (GST). GST-PSCA-protein ble indusert med isopropyl-beta-D-tiogalaktopyranosid (IPTG) fra logfase-kulturer og rensset fra lyserte bakterier ved affinitetskromatografi med glutation-agarosematriks. Vist er en SDS-PAGE Coomassie-blåfarget gel av de glutationeluerte fraksjonene inneholdende GST-PSCA. Angitt er det intakte GST-PSCA-fusjonsproteinet og et mindre nedbrytningsprodukt inneholdende GST. Dette proteinet er anvendelig som et MAb- og pAb-immunogen og som en Ab-screeningsreagens.

[0062] Figur 9. Screening for humane PSCA-antistoffer ved FACS. Antistoffkonsentrasjon for supernatanter ble bestemt ved ELISA. 50ul/brønn (nøyaktig) ble satt til 96-brønners FACS-plater og serielt fortynnet. PSCA-uttrykkende celler ble tilsatt (endogen eller rekombinant, 50.000 celler/brønn) og blandingen innkubert ved 4°C i to timer. Etter innkubering ble cellene vasket med FACS-buffer og videre innkubert med 100ul av deteksjonsantistoff (anti-hIgG-PE) i 45 minutter ved 4°C. Ved slutten av innkubering ble cellene vasket med FACS-buffer, fiksert med formaldehyd og analysert ved anvendelse av FACScan. Data ble analysert ved anvendelse av CellQuest Pro-programvare. Faste histogrammer representerer data fra negative kontrollceller og åpne histogrammer indikerer data fra PSCA-positive celler.

[0063] Figur 10. Relativ affinitetsrankering av PSCA-MAbs ved FACS. 21 serielle 1:2-fortynninger av hvert PSCA-antistoff ble innkubert med SW780-celler (50.000 celler pr. brønn) natten over ved 4°C (endelige MAb-konsentrasjoner varierte fra 40nM til 0,038pM). Ved slutten av innkuberingen ble celler vasket og innkubert med anti-hIgG-PE-deteksjonsantistoff. Etter vasking av de ubundne sekundære antistoffene ble cellene analysert ved FACS og gjennomsnitts fluorescensintensiteten for hvert punkt oppnådd ved anvendelse av CellQuest Pro-programvare. Affinitet ble beregnet med Graphpad Prisme-programvare ved anvendelse av en sigmoidal doserespons (variabel stignings)-ligning. En representativ FACS-analyse som viser bindingstitrasjonen for PSCA-MAb-4.121 er presentert i figuren.

[0064] Figur 11. Ekspresjon av murin- og cynomolgus-ape-PSCA i 293T-celler og gjenkjennelse ved antihumane PSCA-MAbs. 293T-celler ble forbigående transfektert med pcDNA3.1-vektor som bærer det murine PSCA-cDNAet, det simiane PSCA-cDNAet eller med tom vektor (neo). To dager etterfulgt av transfeksjon ble celler høstet og merket med enten human anti-PSCA-MAb-Ha1-4.117 eller murin MAb-1G8 (5 ug/ml). Vist er FACS-

profilen som demonstrerer at MAb-Ha1-4.117 dannet mot det humane PSCA-proteinet binder til både murin og simian PSCA-protein uttrykt i 293T-celler. Det murine 1G8-MAb binder til simian PSCA men ikke til murin PSCA. Slike resultater demonstrerer evnen til å selekttere MAbs som kryssreagerer med antigen fra andre arter. Kryssreagerende MAbs vil være anvendelige for å studere ekspresjon og toksisitet i de artene.

[0065] Figur 12. Internalisering av PSCA etter innkubering med MAb-4.121. PSCA-MAb-4.121 ble innkubert med PC3-PSCA-celler ved 4°C i 90 min for å tillate binding av antistoffene til celleoverflaten. Cellene ble deretter splittet i to alikvoter og innkubert ved enten 37°C (for å tillate antistoffinternalisering) eller 4°C (kontroll ingen internalisering). Etter innkubering ved 37°C eller 4°C ble den gjenværende PSCA-MAb-4.121 bundet til celleoverflaten fjernet med en syrevask. Påfølgende permeabilisering og innkubering med et sekundært deteksjonsantistoff tillot deteksjon av internalisert PSCA-MAb-4.121. Celler ble analysert ved anvendelse av FACS eller observert under fluorescensmikroskopet. Omtrent 30% av PSCA-MAb-4.121 ble internalisert etter innkubering ved 37°C i to timer.

[0066] Figur 13. Antistoffer mot PSCA-mediert saporinavhengig drap i PSCA-uttrykkende celler. B300.19-celler (750 celler/brønn) ble sådd i en 96-brønners plate på dag 1. Den følgende dagen et likt volum av medium inneholdende en 2X-konsentrasjon av det angitte primære antistoffet sammen med et 2-gangers overskudd av antihuman (Hum-Zap) eller antigeit (Geit-Zap) polyklonalt antistoff konjugert med saporintoksin (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) ble satt til hver brønn. Cellene fikk innkubere i 5 dager ved 37 grader C. Ved slutten av innkuberingsperioden ble MTS (Promega) satt til hver brønn og innkubering fortsatte i ytterligere 4 timer. OD₄₅₀ ble bestemt. Resultatene i figur 13(A) viser at PSCA-antistoffer HA1-4.121 og HA1-4.117 medierte saporinavhengig cytotoxiskitet i B300.19-PSCA-celler mens en kontroll, uspesifikt IgG₁-antistoff, hadde ingen effekt. Resultatene i figur 13(B) viser at tilsetningen av et sekundært saporinkonjugertantistoff som ikke gjenkjenner human-Fc, feiler i å mediere cytotoxiskitet.

[0067] Figur 14. Komplementmediert cytotoxiskitet av PSCA-Mabs. PSCA-antistoffer (0–50 µg/ml) ble fortynnet med RHB-buffer (RPMI 1640, Gibco Life Technologies, 20 mM HEPES). B300.19-PSCA-uttrykkende celler ble vasket i RHB-buffer og resuspendert ved en tetthet på 10⁶ celler/ml. I et typisk forsøk ble 50 µl av PSCA-antistoff, 50 µl av fortynnet komplement kaninserum (Cedarlane, Ontario, Can) og 50 µl av en celsuspensjon tilsatt sammen i en flatbunnet vevkultur 96-brønners plate. Blandingen ble innkubert i 2 timer. ved 37°C i en 5% CO₂-innkubator for å lette komplementmediert cellelyse. 50 µl av Alamar Blue

(Biosource Intl. Camarillo, CA) ble satt til hver brønn og innkubering fortsatte i ytterligere 4-5 timer ved 37°C. Fluorescensen i hver brønn ble lest ved anvendelse av et 96-brønners fluormeter med eksitasjon ved 530 nm og emisjon ved 590 nm. Resultatene viser at PSCA-antistoffer som har en IgG₁-(HA1-4.121) eller en IgG₂-isotype (HA1-5.99.1), men ikke en IgG₄-isotype (HA1-6.46) var i stand til å mediere komplementavhengig lyse av målceller.

[0068] Figur 15. Dannelse av F(ab')₂-fragmenter av MAb-Ha1-4.121 ved pepsinfordøyelse. 20 mg av MAb-Ha1-4.121 i 20 mM natriumacetatbuffer pH 4,5 ble innkubert med og uten immobilisert pepsin (Pierce. Rockford IL) for de angitte tidene. Intakt MAb og fordøyete Fc-fragmenter ble fjernet ved protein-A-kromatografi. Vist er en SDS-PAGE Coomasie-farget gel av intakt ufordøyet uredusert MAb, ureduserte alikvoter av fordøyet materiale tatt ved de angitte tidene og en redusert prøve av det endelige fordøyete F(ab')₂-produktet.

[0069] Figur 16. Binding av rekombinant anti-PSCA humant mAb til PSCA ved flowcytometri. (16A) 293T-celler ble transfektert med ekspresjonskonstruksjoner som koder for tung- og lettkjedene til anti-PSCA humant mAb. Supernatant ble oppsamlet etter 48 timer og undersøkt for binding til PSCA. (16B) Anti-PSCA humant mAb ble rensset fra hybridomsupernatant og anvendt for PSCA-bindingsforsøk. PSCA-binding ble testet som følger. PC3-parentale eller PC3-PSCA-celler ble innkubert med de anti-PSCA humane mAbs beskrevet ovenfor i 30 minutter på is. Cellene ble vasket og innkubert med PE-konjugert antihuman Ig i 30 minutter på is. Cellene ble vasket og deretter undersøkt ved flowcytometri.

[0070] Figur 17. Deteksjon av PSCA-protein ved immunohistokjemi. Ekspresjon av PSCA-protein i tumorprøver fra kreftpasienter ble detektert ved anvendelse av antistoffet HA1-4.117. Formalinfiksert, parafininnstøpt vev ble kuttet i 4 mikron snitt og anbrakt på glasobjektglass. Snittene ble avvokset, rehydrert og behandlet med antigengjennervelsesløsning (Antigen Retrieval Citra Solution; BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA, 94583) ved høy temperatur. Snitt ble deretter innkubert i fluoresceinkonjugert humant monoklonalt anti-PSCA-antistoff, Ha1-4.117, i 16 timer ved 4°C. Objektglassene ble vasket tre ganger i buffer og innkubert videre med kanin-antifluorescein i 1 time og, etter vasking i buffer, nedsenket i DAKO EnVision+™-peroksydasekonjugert geit-antikanin immunoglobulin sekundært antistoff (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) i 30 minutter. Snittene ble deretter vasket i buffer, utviklet ved anvendelse av DAB-kittet (Sigma Chemicals), kontrastfarget ("counterstained") ved anvendelse av hematoksylin og analysert ved brightfield-mikroskopi. Resultatene viser

ekspresjon av PSCA i tumorcellene fra prostata adenokarsinom (panel A, panel B), blære overgangskarsinom (panel C) og pankreatisk ductal adenokarsinom (panel D). Disse resultatene indikerer at PSCA er uttrykt i human kreft og at antistoffer rettet mot dette antigenet er anvendelige som diagnostiske reagenser.

[0071] Figur 18. PSCA-MAb-Ha1-4.120 hemmer veksten av subkutane prostatakreft-xenografter. LAPC-9AI-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutan i mannlige SCID-mus. Musene ble randomisert i grupper ($n=10$ i hver gruppe) og behandling innledet intraperitonealt (i.p.) på dag 0 med HA1-4.120 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 7 doser inntil undersøkelsesdag 28. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt. Resultatene viser at humant anti-PSCA monoklonalt antistoff Ha1-4.120 signifikant hemmet veksten av humane prostatakreft-xenografter implantert subkutan i SCID-mus ($p < 0,05$).

[0072] Figur 19. PSCA-MAb-Ha1-5.99 hemmer veksten av etablerte prostatakreft-xenografter i SCID-mus. LAPC-9AI-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutan i mannlige SCID-mus. Når tumorvolum nådde 50 mm^3 ble musene randomisert i grupper ($n=10$ i hver gruppe) og behandling innledet intraperitonealt (i.p.) med HA1-5.99.1 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 5 doser inntil undersøkelsesdag 14. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt. Resultatene viser at fullstendig humant anti-PSCA monoklonalt antistoff Ha1-5.99 signifikant hemmet veksten av etablerte androgenavhengige humane prostatakreft-xenografter implantert subkutan i SCID-mus ($p < 0,05$).

[0073] Figur 20. PSCA-MAb-HA1-4.121 hemmer veksten av etablerte androgenavhengige humane prostatakreft-xenografter. LAPC-9AD-tumorceller ($2,5 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutan i mannlige SCID-mus. Når tumorvolumet nådde 40 mm^3 ble musene randomisert i grupper ($n=10$ i hver gruppe) og behandling ble innledet intraperitonealt (i.p.) med økende konsentrasjoner av HA1-4.121 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 7 doser inntil undersøkelsesdag 21. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt. Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerte at HA1-4.121 hemmet veksten av etablerte subkutane humane androgenavhengige prostata-xenografter i SCID-mus. Resultatene ble statistisk signifikante for 300 ug dosegruppen på dager 14, 17 og 21 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-test, tosidig med $\alpha=0,05$) og for 700 ug dosegruppen på dager 10, 14, 17 og 21 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-test, tosidig med $\alpha=0,05$).

[0074] Figur 21. Pasientavledete, androgenavhengige LAPC-9AD-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) ble injisert i de dorsale lappene av prostataer til mannlige SCID-mus. Tumorene fikk vokse i omtrent 10 dager på hvilken tid musene ble randomisert i grupper. Behandling med human 500 ug av HA1-4.117, HA1-4.121 eller isotypekontroll-MAb ble innledet 10 dager etter tumorimplantasjon. Antistoffer ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 7 doser. Fire dager etter siste dose ble dyr avlivet og primærtumorer skåret ut og veid. Resultatene viser at humane anti-PSCA monoklonale antistoffer Ha1-4.121 ($p < 0,01$) og Ha1-4.117 ($p < 0,05$) signifikant hemmet veksten av LAPC-9AD-prostatakreft-xenografter ortotopisk implantert i SCID-mus.

[0075] Figur 22. PSCA-MAb-HA1-4.121 forlenger overlevelsen av SCID-mus med etablerte ortotopiske humane androgenavhengige prostatatumorer. Pasientavledete, androgenavhengige LAPC-9AD-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) ble injisert i de dorsale lappene av prostataer til mannlige SCID-mus. Tumorene fikk vokse i omtrent 9 dager på hvilken tid musene ble randomisert i grupper. Dyrene randomisert i overlevelsesgruppene omfatter 11 mus i isotype-MAb-kontrollen og 12 mus i den HA1-4.121-behandlede gruppen. Dyr ble behandlet i.p. med 1000 ug Ha1-4.121 eller 1000 ug av isotype-MAb-kontroll to ganger ukentlig med totalt 9 doser. Resultatene demonstrerte at HA1-4.121 signifikant (log-rank test: $p < 0,01$) forlenget overlevelsen av SCID-mus med humane androgenavhengige prostatatumorer. To mus i den HA1-4.121-behandlede gruppen forble frie for åpenbare tumorer 110 dager etter siste behandling.

[0076] Figur 23. Forbedret hemning av prostatatumorvekst med HA1-4.21 og taxotere-kombinasjonsterapi. LAPC-9AI-tumorceller (2×10^6 celler pr. dyr) ble injisert subkutan i mannlige SCID-mus. Når tumorvolumet nådde 65 mm^3 ble dyr randomisert og utpekt til fire forskjellige grupper ($n=10$ i hver gruppe) som angitt. I begynnelsen på dag 0 ble Ha1-4.121 eller isotype-MAb-kontroll administrert i.p. to ganger ukentlig i en dose på 500 ug med totalt 6 doser. Den siste dosen ble gitt på dag 17. Taxotere ble gitt intravenøst i en dose på 5 mg/kg på dager 0, 3 og 7. Tumorvekst ble overvåket hver 3-4 dager ved anvendelse av skyvelærmålinger. Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerer at HA1-4.121 som et enkelt middel hemmet veksten av androgenuavhengige prostata-xenografter i SCID-mus med 45% når sammenlignet med kontrollantistoffbehandling alene på dag 28 (ANOVA/Tukey-test: $p < 0,05$). Administrering av isotype-MAb-kontrollen pluss taxotere hemmet tumorvekst med 28% når sammenlignet med kontrollantistoffbehandling alene, som ikke ble statistisk signifikant. Administrering av HA1-4.121 i kombinasjon med taxotere forbedret effekten og

resulterte i en 69% hemning av tumorvekst når sammenlignet med kontrollantistoff alene (ANOVA/Tukey-test: $p < 0,01$). En statistisk signifikant forskjell ble også demonstrert når HA1-4.121-pluss-taxotere-kombinasjonsgruppen ble sammenlignet med enten HA1-4.121- eller isotype-MAb-kontroll-pluss-taxotere-gruppene (ANOVA/Tukey-test: $p < 0,05$).

[0077] Figur 24. Humane PSCA-MAbs hemmer veksten av pankreatisk kreft-xenografter i SCID-mus/ human HPAC. Pankreatiske kreftceller (2×10^6 / mus) ble injisert subkutan i immundefekte ICR-SCID-mus (Taconic Farm, Germantown, NY). Musene ble randomisert i grupper ($n = 10$ dyr/gruppe) og behandling med det angitte humane PSCA monoklonale antistoffet innledet samme dag. Antistoffer (500 mg/mus) ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 8 doser. Resultatene demonstrerte at humane anti-PSCA monoklonale antistoffer Ha1-4.121, Ha1-4.117 og Ha1-1.16 signifikant hemmet veksten av humane pankreatiske kreft-xenografter subkutan implantert i SCID-mus. Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av en t-test (tosidig, $\alpha = 0,05$).

[0078] Figur 25. PSCA-MAb-HA1-4.121 hemmer veksten av pankreatiske tumorer implantert ortotopisk i SCID-mus. HPAC-celler ($3,0 \times 10^6$ celler) ble implantert ortotopisk inn i pankreasøyen ("the pancreata") til SCID-mus. Mus ble tilfeldig utpekt til tre grupper ($n = 9$ i hver gruppe) som angitt. Behandling med HA1-4.121 (250 ug eller 1000 ug) eller isotype-MAb-kontroll (1000 ug) ble innledet på implantasjonsdagen. Antistoffer ble administrert i.p. to ganger ukentlig med totalt 10 doser. Tretten dager etter den siste dosen ble dyr avlivet og primærtumorer skåret ut og veid. Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerte at HA1-4.121 signifikant hemmet den ortotopiske veksten av humane pankreatisk kreft-xenografter i SCID-mus ved begge undersøkte dosenivåer. Behandling med 250 ug og 1000 ug AGS-PSCA hemmet tumorvekst med henholdsvis 66% og 70% (Kruskal-Wallis/Tukey-test henholdsvis: $p < 0,01$ og $p < 0,01$).

[0079] Figur 26. PSCA-MAb-HA1-4.121 hemmer metastaser. Ved autopsi ble synlige metastaser i lymfeknuter og spredtliggende organer observert hos den kontrollantistoffbehandlede gruppen. Ingen synlige metastaser ble observert i begge HA1-4.121-behandlede grupper. Lymfeknuter, lunger og leverer ble fjernet fra alle dyr og undersøkt histologisk for tilstedeværelsen av metastatisk tumor. Snitt fra lungene og lymfeknutene fjernet fra hvert dyr ble merket for human cytokeratin og antallet metastaser bestemt mikroskopisk. Resultatene fra den histologiske analysen demonstrerte en signifikant reduksjon i lymfeknute (LN)-metastaser i dyr behandlet med HA1-4.121 ($p = 0,0152$ detektert ved Fishers eksakte test). Forekomsten av metastase og invasjon ble også redusert signifikant

i dyr behandlet med begge konsentrasjoner av HA1-4.121 ($p=0,0152$ detektert ved Fishers eksakte test). Antallet lungemetastaser redusertes signifikant hos mus behandlet med bare 1,0 mg dosen av HA1-4.121 ($p=0,0498$ detektert ved Fishers eksakte test).

[0080] Figur 27. Humane PSCA-MABs hemmer veksten av SW780-blæretumorer i SCID-mus. Humane SW780-blærekreftceller (2×10^6 / mus) ble injisert subkutan i immundefekte ICR-SCID-mus (Taconic Farm, Germantown, NY). Musene ble randomisert i grupper ($n=10$ dyr/gruppe) og behandling med det angitte humane PSCA-MAB innledet samme dag. Antistoffer (250 mg/mus) ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 7 doser. Resultatene demonstrerte at HA1-4.117 ($p=0,014$), HA1-4.37 ($p=0,0056$), HA1-1.78 ($p=0,001$), HA1-5.99 ($p=0,0002$) og HA1-4.5 ($p=0,0008$) signifikant hemmet veksten av SW780-blæretumorer implantert subkutan i SCID-mus. Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av en t-test (tosidig, $\alpha=0,05$).

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Avsnittsoversikt

- I.) Definisjoner
- II.) PSCA-polynukleotider
 - II.A.) Anvendelser av PSCA-polynukleotider
 - II.A.1.) Overvåkning av genetiske anormaliteter
 - II.A.2.) Antisenseutførelsesformer
 - II.A.3.) Primere og primerpar
 - II.A.4.) Isolering av PSCA-kodende nukleinsyremolekyler
 - II.A.5.) Rekombinante nukleinsyremolekyler og vertsvektorsystemer
- III.) PSCA-beslektede proteiner
 - III.A.) Motivbærende proteinutførelsesformer
 - III.B.) Ekspresjon av PSCA-beslektede proteiner
 - III.C.) Modifikasjoner av PSCA-beslektede proteiner
 - III.D.) Anvendelser av PSCA-beslektede proteiner
- IV.) PSCA-antistoffer
- V.) PSCA-cellulære immunresponser
- VI.) PSCA-transgene dyr
- VII.) Fremgangsmåter for deteksjon av PSCA
- VIII.) Fremgangsmåter for overvåkning statusen til PSCA-relaterte gener og deres produkter
- IX.) Identifikasjon av molekyler som interagerer med PSCA
- X.) Terapeutiske fremgangsmåte og sammensetninger
 - X.A.) Antikreftvaksiner
 - X.B.) PSCA som et mål for antistoffbasert terapi
 - X.C.) PSCA som et mål for cellulære immunresponser
 - X.C.1. Minigenvaksiner
 - X.C.2. Kombinasjoner av CTL-peptider med hjelpepeptider
 - X.C.3. Kombinasjoner av CTL-peptider med T-celle-primingsmidler
 - X.C.4. Vaksinesammensetninger omfattende DC pulserte med CTL- og/eller HTL-peptider

- X.D.) Adoptiv immunoterapi
- X.E.) Administrering av vaksiner for terapeutiske eller profylaktiske formål
- XI.) Diagnostiske og prognostiske utførelsesformer av PSCA
- XII.) Hemning av PSCA-proteinfunksjon
 - XII.A.) Hemning av PSCA med intracellulære antistoffer
 - XII.B.) Hemning av PSCA med rekombinante proteiner
 - XII.C.) Hemning av PSCA-transkripsjon eller translasjon
 - XII.D.) Generelle betraktninger for terapeutiske strategier
- XIII.) Identifikasjon, karakterisering og anvendelse av modulatorer av PSCA
- XIV.) RNAi og terapeutisk anvendelse av små interfererende RNA (siRNAer)
- XV.) Kitt/artikler for fremstilling

I.) Definisjoner:

[0081] Hvis ikke på annen måte definert, alle betegnelser fra fagområdet, anmerkninger og andre vitenskapelige betegnelser eller terminologi anvendt her skal ha betydningene vanlig forstått av fagfolk på området hvor foreliggende oppfinnelse tilhører. I noen tilfeller er betegnelser med vanlige forståtte betydninger definert her for klargjøring og/eller for klar referanse og inklusjonen av slike definisjoner her skal ikke nødvendigvis være konstruert for å representere en vesentlige forskjell i forhold til hva som generelt er forstått på området. Mange av teknikkene og prosedyrene beskrevet eller referert her er godt forstått og vanlig anvendt ved anvendelse av konvensjonell metodikk av fagfolk på området, slik som for eksempel de utstrakt anvendte molekylære kloningsfremgangsmåtene beskrevet i Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 2nd. edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Som passende blir prosedyrer som involverer anvendelse av kommersielt tilgjengelig kitt og reagenser generelt utført i henhold til produsentdefinerte protokoller og/eller parametere hvis ikke på annen måte betegnet.

[0082] Betegnelsene “langt fremskredet prostatakraft”, “lokalt langt fremskredet prostatakraft”, “langt fremskredet sykdom” og “lokalt langt fremskredet sykdom” betyr prostatakraft som har bredd seg gjennom prostatakapselen og skal omfatte trinn C-sykdom i Amerikanske urologiske forening (“American Urological Assosiation”) (AUA)-systemet, trinn C1 - C2-sykdom ved Whitmore-Jewett-systemet og trinn T3 - T4 og N+-sykdom ved TNM (tumor, knute, metastase)-systemet. Generelt er ikke kirurgi anbefalt for pasienter med lokalt langt fremskredet sykdom og disse pasientene har hovedsakelig mindre fordelaktig resultater sammenlignet med pasienter som har klinisk lokalisert (organbegrenset) prostatakraft. Lokalt langt fremskredet sykdom er klinisk identifisert ved åpenbare bevis på invadering utover den laterale grense av prostata eller asymmetri eller invadering ovenfor prostata base. Lokalt langt fremskredet prostatakraft er for tiden diagnostisert patologisk etter

radikal prostatektomi hvis tumoren invaderer eller penetraterer prostataisk kapsel, strekker seg inn i den kirurgiske marginen eller invaderer de seminale blærene.

[0083] “Endring av det naturlige glykosyleringsmønstrer” er ment for formål her til å bety fjerning av én eller flere karbohydratgrupper funnet i naturlige sekvens PSCA (enten ved å fjerne det underliggende glykosyleringssetet eller ved fjerning av glykosyleringen ved kjemisk og/eller enzymatisk betydning) og/eller tilsetning av én eller flere glykosylerings seter som ikke er til stede i den naturlige sekvensen av PSCA. I tillegg omfatter uttrykket kvalitative endringer i glykosyleringen av de naturlige proteinene, som involverer en forandring i naturen og proporsjonene av de forskjellige karbohydratgruppene til stede.

[0084] Betegnelsen “analog” angir et molekyl som er strukturelt lignende eller deler lignende eller tilsvarende kjennetegn med et annet molekyl (*f.eks.* et PSCA-relatert protein). For eksempel kan en analog til et PSCA-protein være spesifikt bundet av et antistoff eller T-celle som spesifikt binder til PSCA.

[0085] Betegnelsen “antistoff” blir anvendt i den bredeste forstanden hvis ikke klart angitt på annen måte. Derfor kan et “antistoff” være naturlig forekommende eller menneskelaget slik som monoklonale antistoffer produsert ved konvensjonell hybridomteknologi. Anti-PSCA-antistoffer omfatte monoklonale og polyklonale antistoffer så vel som fragmenter inneholdende antigenbindende domene og/eller én eller flere komplementaritetsbestemmende regioner av disse antistoffene. Som anvendt her angir betegnelsen "antistoff" hvilken som helst form av antistoff eller fragment derav som spesifikt binder PSCA og/eller oppviser den ønskede biologiske aktiviteten og spesifikt dekker monoklonale antistoffer (omfattende fullengde monoklonale antistoffer), polyklonale antistoffer, multispecifiserte antistoffer (*f.eks.* bispesifikke antistoffer) og antistofffragmenter så lenge de spesifikt binder PSCA og/eller viser den ønskede biologiske aktiviteten. Hvilket som helst spesifikt antistoff kan anvendes med fremgangsmåtene og sammensetningene tilveiebrakt her. Således omfatter i én utførelsesform betegnelsen “antistoff” et molekyl omfattende minst én variabel region fra et lett kjede immunoglobulinmolekyl og minst én variabel region fra et tungkjede molekyl som i kombinasjon danner et spesifikt bindingssete for målantigenet. I én utførelsesform er antistoffet et IgG-antistoff. For eksempel er antistoffet et IgG1, IgG2, IgG3 eller IgG4-antistoff. Antistoffene anvendelige i de foreløpige fremgangsmåtene og sammensetningene kan dannes i cellekultur, i fag eller i forskjellige dyr, omfattende men ikke begrenset til kuer, kaniner, geiter, mus, rotter, hamstere, marsvin, sauer, hunder, katter, aper, chimpanser. Derfor er i én utførelsesform et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse et mammalsk antistoff.

Fagteknikker kan anvendes for å isolere et innledende antistoff eller for å danne varianter med endret spesifisitet eller glupsk karakteristika. Slike teknikker er rutine og velkjent på området. I én utførelsesform er antistoffet produsert ved rekombinante midler kjent på området. For eksempel kan et rekombinant antistoff produseres ved transfektering av en vertscelle med en vektor omfattende en DNA-sekvens som koder for antistoffet. Én eller flere vektorer kan anvendes for å transfekte DNA-sekvensen som uttrykker minst én VL- og én VH-region i vertscellen. Eksempler på beskrivelser på rekombinante midler for antistoffdannelse og produksjon omfatter Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, nyeste utgave). Et antistoff ifølge foreliggende oppfinnelse kan modifiseres med rekombinante midler for å øke større effektivitet av antistoffet i mediering av den ønskede funksjonen. Således er det innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen at antistoffer kan modifiseres med substitusjoner ved anvendelse av rekombinante betydninger. Typisk vil substitusjonene være konservative substitusjoner. For eksempel kan minst én aminosyre i den konstante regionen av antistoffet erstattes med en ulik residue. Se *f.eks.* US-patent nr. 5.624.821, US-patent nr. 6.194.551, søknadsnr. WO 9958572; og Angal, *et al.*, Mol. Immunol. 30 : 105-08 (1993). Modifikasjonen i aminosyrer omfatter delesjoner, addisjoner, substitusjoner av aminosyrer. I noen tilfeller er slike endringer gjort for å redusere uønskete aktiviteter, *f.eks.* komplementavhengig cytotoksisitet. Ofte er antistoffene merket ved kobling, enten kovalent eller ikke-kovalent, til en substans som tilveiebringer et detekterbart signal. En rekke merker og konjugeringsteknikker er kjent og er angitt i stor utstrekning i både den vitenskapelige og patentlitteraturen. Disse antistoffene kan være screenet for binding til normal eller defekt PSCA. Se *f.eks.* ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996). Egnede antistoffer med de ønskede biologiske aktivitetene kan identifiseres ved de følgende *in vitro*-forsøkene omfattende men ikke begrenset til: proliferasjon, migrering, adhesjon, mykagar ("soft agar")-vekst, angiogenese, celle-celle-kommunikasjon, apoptose, transport, signaltransduksjon og de følgende *in vivo*-forsøkene slik som hemning av tumorvekst. Antistoffene tilveiebrakt her kan også være anvendelige i diagnostiske applikasjoner. Som capture eller ikke-nøytraliserende antistoffer kan de være screenet for evnen til å binde til det spesifikke antigenet uten å hemme reseptorbindingen eller biologiske aktiviteten til antigenet. Som nøytraliserende antistoffer

kan antistoffene være anvendelige i kompetitive bindingsforsøk. De kan også anvendes til å kvantifisere PSCA eller dens reseptor.

[0086] Et “antistofffragment” er definert som minst en del av den variable regionen av immunoglobulinmolekylet som binder til sitt mål, *dvs.* den antigenbindende regionen. I én utførelsesform dekker det spesifikt enkelte anti-PSCA-antistoffer og kloner derav (omfattende agonist, antagonist og nøytraliserende antistoffer) og anti-PSCA-antistoffsammensetninger med polyepitopisk spesifisitet. Antistoffet av foreliggende fremgangsmåter og sammensetninger kan være monoklonale eller polyklonale. Et antistoff kan være i form av et antigenbindende antistofffragment omfattende et Fab-fragment, F(ab')₂-fragment, en enkeltkjede variabel region og lignende. Fragmenter av intakte molekyler kan dannes ved anvendelse av fremgangsmåter velkjente på området og omfatter enzymatisk fordøyelse og rekombinante midler.

[0087] Som anvendt her kan hvilken som helst form av “antigenet” anvendes for å danne et antistoff som er spesifikt for PSCA. Således kan det induserte antigenet være en enkel epitop, multiple epitoper eller hele proteinet alene eller i kombinasjon med én eller flere immunogenisitsforsterkende midler kjent på området. Det induserte antigenet kan være et isolert fullengde protein, et celleoverflateprotein (*f.eks.* immunisering med celler transfektert med minst en del av antigenet) eller et oppløselig protein (*f.eks.* immunisering med bare den ekstracellulære domenedelen av proteinet). Antigenet kan produseres i en genetisk modifisert celle. DNAet som koder for antigenet kan være genomisk eller ikke-genomisk (*f.eks.* cDNA) og koder for minst en del av det ekstracellulære domenet. Som anvendt her angir betegnelsen “del” det minimale antallet aminosyrer eller nukleinsyrer, som passende, til å utgjøre en immunogen epitop av det interessante antigenet. Hvilke som helst av genetiske vektorer egnet for transformasjon av de interessante cellene kan anvendes, omfattende men ikke begrenset til adenovirale vektorer, plasmider og ikke-virale vektorer, slik som kationiske lipider. I én utførelsesform binder antistoffet fra fremgangsmåtene og sammensetningene her spesifikt minst en del av det ekstracellulære domenet av det interessante PSCA.

[0088] Antistoffene eller antigenbindingsfragmentene derav tilveiebrakt her kan være konjugert til et “bioaktivt middel.” Som anvendt her angir betegnelsen “bioaktivt middel” hvilken som helst syntetisk eller naturlig forekommende forbindelse som binder antigenet og/eller forsterker eller medierer en ønsket biologisk effekt for å forbedre celledraptoksiner.

[0089] I én utførelsesform er bindingsfragmentene anvendelige i foreliggende oppfinnelse biologisk aktive fragmenter. Som anvendt her angir betegnelsen “biologisk aktiv” et antistoff

eller antistoffragment som er i stand til å binde den ønskede antigenepitopen og direkte eller indirekte utøvelse av en biologisk effekt. Direkte effekter omfatter, men er ikke begrenset til moduleringen, stimuleringen og/ eller hemningen av et vekstsignal, moduleringen, stimuleringen og/ eller hemningen av et antiapoptotisk signal, moduleringen, stimuleringen og/ eller hemningen av et apoptotisk eller nekrotisk signal, modulering, stimulering og/ eller hemning ADCC-kaskaden og modulering, stimulering og/ eller hemning CDC-kaskaden.

[0090] "Bispesifikke" antistoffer er også anvendelige i de foreliggende fremgangsmåtene og sammensetningene. Som anvendt her angir betegnelsen "bispesifikt antistoff" et antistoff, typisk et monoklonalt antistoff, som har bindingsspesifisiteter for minst to forskjellige antigenepitoper. I én utførelsesform er epitopene fra samme antigen. I en annen utførelsesform er epitopene fra to forskjellige antigener. Fremgangsmåter for fremstilling av bispesifikke antistoffer er kjent på området. For eksempel kan bispesifikke antistoffer produseres rekombinant ved anvendelse av koekspresjonen av to immunoglobulin tungkjede/lettkjede par. Se *f.eks.* Milstein *et al.*, Nature 305:537-39 (1983). Alternativt kan bispesifikke antistoffer fremstilles ved anvendelse av kjemisk binding. Se *f.eks.* Brennan, *et al.*, Science 229:81 (1985). Bispesifikke antistoffer omfatter bispesifikke antistoffragmenter. Se *f.eks.* Hollinger, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:6444-48 (1993), Gruber, *et al.*, J. Immunol. 152:5368 (1994).

[0091] De monoklonale antistoffene omfatter her spesifikt "kimære" antistoffer hvor en del av tung- og/eller lettkjeden er identisk med eller homolog til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en spesiell art eller som tilhører en spesiell antistoffklasse eller underklasse, mens resten av kjeden(e) er identisk med eller homolog til tilsvarende sekvenser i antistoffer avledet fra en annen art eller som tilhører en annen antistoffklasse eller underklasse, så vel som fragmenter av slike antistoffer, så lenge de spesifikt binder målantigenet og/eller viser den ønskede biologiske aktiviteten (US-pat. nr. 4.816.567; og Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855 (1984)).

[0092] Betegnelsen "kjemoterapeutisk middel" angir alle kjemiske forbindelser som er effektive i hemming av tumorvekst. Ikke begrensende eksempler på kjemoterapeutiske midler omfatter alkyleringsmidler; for eksempel nitrogenmustarder, etyleniminforbindelser og alkylsulfonater; antimetabolitter; for eksempel folinsyre-, purin- eller pyrimidinantagonister; mitotiske inhibitorer; for eksempel vincaalkaloider og derivater av podofyllotoksin, cytotoxiske antibiotika, forbindelser som skader eller griper inn i DNA-ekspressjon og

vekstfaktor reseptorantagonister. I tillegg omfatter kjemoterapeutiske midler cytotoksiske midler (som definert her), antistoffer, biologiske molekyler og små molekyler.

[0093] Betegnelsen "kodonoptimaliserte sekvenser" angir nukleotidsekvenser som er optimalisert for en spesiell vertsart ved omplassering av hvilke som helst kodoner som har en anvendelsesfrekvens på mindre enn ca. 20%. Nukleotidsekvenser som er optimalisert for ekspresjon i en gitt vertsart ved eliminering av uekte polyadenyleringssekvenser, eliminering av ekson/intron-spleisingssignaler, eliminering av transposonlignende repetisjoner og/eller optimalisering av GC-innhold i tillegg til kodonoptimalisering er referert til her som en "ekspresjonsforbedrete sekvenser."

[0094] Et "kombinatorisk bibliotek" er en samling av ulike kjemiske forbindelser dannet ved enten kjemisk syntese eller biologisk syntese ved å kombinere flere kjemiske "byggeblokker" slik som reagenser. For eksempel et lineært kombinatorisk kjemisk bibliotek, slik som et polypeptid (*f.eks.* mutein) -bibliotek, blir dannet ved å kombinere et sett av kjemiske byggeblokker betegnede aminosyrer på hver mulige måte for en gitt forbindelseslengde (*dvs.* antallet aminosyrer i en polypeptidforbindelse). En rekke kjemiske forbindelser blir syntetisert gjennom slik kombinatorisk blanding av kjemiske byggeblokker (Gallop *et al.*, J. Med. Chem. 37(9): 1233-1251 (1994)).

[0095] Fremstilling og screening av kombinatoriske biblioteker er velkjent for fagfolk på området. Slik kombinatorisk kjemiske biblioteker omfatter, men er ikke begrenset til, peptidbiblioteker (se *f.eks.* US-patent nr. 5.010.175, Furka, Pept. Prot. Res. 37:487-493 (1991), Houghton *et al.*, Nature, 354:84-88 (1991)), peptoider (PCT-publikasjon nr. WO 91/19735), kodete peptider (PCT-publikasjon WO 93/20242), tilfeldige bio-oligomere (PCT-publikasjon WO 92/00091), benzodiazepiner (US-pat. nr. 5.288.514), "diversomers" slik som hydantoiner, benzodiazepiner og dipeptider (Hobbs *et al.*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90:6909-6913 (1993)), vinylogous polypeptider (Hagihara *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:6568 (1992)), ikke-peptidiske peptidomimetika med et beta-D-glukosestillas ("scaffolding") (Hirschmann *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218 (1992)), analoge organiske synteser av små forbindelsesbiblioteker (Chen *et al.*, J. Amer. Chem. Soc. 116:2661 (1994)), oligokarbarnater (Cho, *et al.*, Science 261:1303 (1993)) og/eller peptidylfosfonater (Campbell *et al.*, J. Org. Chem. 59:658 (1994)). Se generelt Gordon *et al.*, J. Med. Chem. 37:1385 (1994), nukleinsyrebiblioteker (se *f.eks.* Stratagene, Corp.), peptid-nukleinsyrebiblioteker (se *f.eks.* US-patent 5.539.083), antistoffbiblioteker (se *f.eks.* Vaughn *et al.*, Nature Biotechnology 14(3): 309-314 (1996) og PCT/US96/10287),

karbohydratbiblioteker (se *f.eks.* Liang *et al.*, Science 274:1520-1522 (1996) og US-patent nr. 5.593.853) og små organiske molekylbiblioteker (se *f.eks.* benzodiazepiner, Baum, C&EN, Jan 18, side 33 (1993); isoprenoider, US-patent nr. 5.569.588; tiazolidinoner og metatiazanoner, US-patent nr. 5.549.974; pyrrolidiner, US-patent nr. 5.525.735 og 5.519.134; morfolinoforbindelser, US-patent nr. 5.506.337; benzodiazepiner, US-patent nr. 5.288.514; og lignende).

[0096] Anordninger for fremstilling av kombinatoriske biblioteker er kommersielt tilgjengelig (se *f.eks.* 357 NIPS, 390 NIPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050, Pluss, Millipore, Bedford, NIA). Flere velkjent robotiserte systemer har også vært utviklet for løsningsfasekjemier. Disse systemene omfatter automatiserte arbeidsstasjoner slik som det automatiserte synteseapparatet utviklet av Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japan) og mange robotiserte systemer ved anvendelse av robotiserte armer (Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinto, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.), som etterligner de manuelle syntetiske operasjoner utført av en kjemiker. Hvilken som helst av de ovenfor anordningene er egnet for anvendelse med foreliggende oppfinnelse. Naturen og implementeringen av modifikasjoner til disse anordningene (hvis noen) slik at de kan operere som beskrevet her vil være åpenbare for fagpersoner i det relevante området. I tillegg er en rekke kombinatoriske biblioteker selv kommersielt tilgjengelige (se *f.eks.* ComGenex, Princeton, NJ; Asinex, Moscow, RU; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd, Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia, MD; etc.).

[0097] Som anvendt her angir betegnelsen "konservativ substitusjon" substitusjoner av aminosyrer som er kjent for fagfolk på dette området og kan generelt fremstilles uten endring av den biologiske aktiviteten til det resulterende molekylet. Fagfolk på dette området gjenkjenner generelt at enkle aminosyresubstitusjoner i ikke-essensielle regioner av et polypeptid hovedsakelig ikke endrer biologisk aktivitet (se *f.eks.* Watson, *et al.*, MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Edition 1987)). Slike eksempler på substitusjoner er fortrinnsvis gjort i henhold til de angitt i tabell(er) III(a-b). For eksempel omfatter slike endringer substituering av hvilken som helst av isoleucin (I), valin (V) og leucin (L) for hvilken som helst andre av disse hydrofobe aminosyrer; asparaginsyre (D) for glutaminsyre (E) og vice versa; glutamin (Q) for asparagin (N) og vice versa; og serin (S) for treonin (T) og vice versa. Andre substitusjoner kan også være betraktet konservative, avhengig av omgivelsen til den spesielle aminosyren og dens

rolle i den tredimensjonale strukturen av proteinet. For eksempel glycin (G) og alanin (A) kan ofte være byttet med hverandre, likeledes kan alanin (A) og valin (V). Metionin (M), som er relativt hydrofob, kan ofte være byttet med leucin og isoleucin og noen ganger med valin. Lysin (K) og arginin (R) er ofte byttet med hverandre i lokalisasjoner hvor det betydelige trekket ved aminosyreresiduen er dens ladning og de ulike pK_aene til disse to aminosyreresiduene ikke er betydelige. Fortsatt kan andre endringer betraktes "konservative" i spesielle omgivelser (se f.eks. tabell III(a) her; sider 13-15 "Biochemistry" 2nd ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff *et al.*, PNAS 1992 Vol 89 10915-10919; Lei *et al.*, J Biol Chem 1995 May 19; 270(20):11882-6). Andre substitusjoner er også tillatt og kan bestemmes empirisk eller i samsvar med kjente konservative substitusjoner.

[0098] Betegnelsen "cytotoksisk middel" angir en substans som hemmer eller forhindrer ekspressjonsaktivitet til celler, funksjon av celler og/eller forårsaker destruksjon av celler. Betegnelsen skal omfatte radioaktive isotoper, kjemoterapeutiske midler og toksiner slik som små molekyl toksiner eller enzymatisk aktive toksiner av bakterielle, fungale, plante eller dyre opprinnelse, omfattende fragmenter og/eller varianter derav. Eksempler på cytotoxiske midler omfatter, men er ikke begrenset til auristatiner, auristatin E, auromyciner, maytansinoider, yttrium, vismut, ricin, ricin A-kjede, combrestatin, duocarmyciner, dolostatiner, doxorubicin, daunorubicin, taxol, cisplatin, cc1065, etidiumbromid, mitomycin, etoposid, tenoposid, vincristin, vinblastin, colchicin, dihydroksyantrakindion, actinomycin, difteritoksin, Pseudomonas eksotoksin (PE) A, PE40, abrin, abrin A-kjede, modeccin A-kjede, alfa-sarcin, gelonin, mitogellin, retstrictocin, fenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, Sapaonaria officinalis-hemmer og glukokortikoid og andre kjemoterapeutiske midler, så vel som radioisotoper slik som At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹² eller ²¹³P, ³²P og radioaktive isotoper av Lu omfattende Lu¹⁷⁷. Antistoffer kan også være konjugert til et antikreftprodrug aktiverende enzym som er i stand til omdannelse av prodruget til dens aktive form.

[0099] Som anvendt her angir betegnelsen "diameriske antistoffragmenter" små antistoffragmenter med to antigenbindende seter, hvor fragmenter omfatte en tungkjede variabel domene (V_H) forbundet med en lettkjede variabel domene (V_L) i samme polypeptidkjede (V_H-V_L). Ved anvendelse av en linker som er for kort for å tillate paring mellom de to domenene på samme kjede er domenene tvunget til å pare med de komplementære domenene til en annen kjede og frembringe to antigenbindende seter.

Diameriske antistoffragmenter er beskrevet mer fullstendig i *f.eks.* EP 404.097; WO 93/11161; og Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48 (1993).

[00100] “Genproduktet” blir anvendt her for å indikere et peptid/protein eller mRNA. For eksempel er et “genprodukt ifølge oppfinnelsen” noen ganger referert til her som en "kreft aminosyresekvens", "kreftprotein", “protein fra en kreft listet opp i tabell I”, en "kreft-mRNA", “mRNA fra en kreft listet opp i tabell I”, etc. I én utførelsesform er kreftproteiniet kodet for av en nukleinsyre fra figur 1. Kreftproteiniet kan være et fragment eller alternativt, være fullengde proteinet kodet for av nukleinsyrer fra figur 1. I én utførelsesform blir en kreftaminosyresekvens anvendt for å bestemme sekvensidentitet eller similaritet. I en annen utførelsesform er sekvensene naturlig forekommende alleliske varianter av et protein kodet for av en nukleinsyre fra figur 1. I en annen utførelsesform er sekvensene sekvensvarianter som ytterligere beskrevet her.

[00101] “Heterokonjugate” antistoffer er anvendelige i foreliggende fremgangsmåte og sammensetning. Som anvendt her angir betegnelsen “heterokonjugat antistoff” to kovalent bundne antistoffer. Slike antistoffer kan fremstilles ved anvendelse av kjente fremgangsmåter i syntetisk proteinkjemi, omfattende anvendelse av kryssbindingsmidler. Se *f.eks.* US-patent nr. 4.676.980.

[00102] “Høy gjennomstrømnings screenings”-forsøk for tilstedeværelsen, fraværet, kvantifiseringen eller andre egenskaper til spesielle nukleinsyrer eller proteinprodukter er velkjent for fagfolk på området. Tilsvarende er bindingsforsøk og rapportørgenforsøk tilsvarende velkjente. Således beskriver *f.eks.* US-patent nr. 5.559.410 høy gjennomstrømnings screeningsfremgangsmåter for proteiner; US-patent nr. 5.585.639 beskriver høy gjennomstrømnings screeningsfremgangsmåter for nukleinsyrebinding (*dvs.* i arrayer); mens US-patent nr. 5.576.220 og 5.541.061 beskriver høy gjennomstrømning fremgangsmåter for screening for ligand-/antistoffbinding.

[00103] I tillegg er høy gjennomstrømnings screeningssystemer kommersielt tilgjengelige (se *f.eks.* Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Tehnical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA; etc.). Disse systemene typisk automatiserer hele prosedyrer, omfattende alle prøve- og reagenspipetteringer, væskedispensinger, tidsinnkuberinger og endelige avlesninger med mikroplaten i detektor(er) som passer for forsøket. Disse konfigurerbare systemene tilveiebringer høy gjennomstrømning og rask oppstart så vel som en høy grad av fleksibilitet og brukertilpasning. Produsentene av slike systemer tilveiebringer

detaljerte protokoller for forskjellige høy gjennomstrømningssystemer. Således tilveiebringer *f.eks.* Zymark Corp. tekniske rapporter som beskriver screeningssystemer for detektering av moduleringen av gentranskripsjon, ligandbinding og lignende.

[00104] Betegnelsen "homolog" angir et molekyl som oppviser homologi med et annet molekyl, ved for eksempel å ha sekvenser av kjemiske residuer som er like eller lignende ved tilsvarende posisjoner.

[00105] I én utførelsesform er antistoffet tilveiebrakt her et "humant antistoff." Som anvendt her angir betegnelsen "humant antistoff" et antistoff hvor i det vesentlige hele sekvensene av lettkjede og tungkjede sekvensene, omfattende de komplementær-bestemmende regionene (CDRene), er fra human gener. I én utførelsesform blir humane monoklonale antistoffer fremstilt ved trioma-teknikken, den humane B-celle teknikken (se *f.eks.* Kozbor, *et al.*, Immunol. Today 4: 72 (1983) , EBV-transformasjonsteknikk (se *f.eks.* Cole *et al.* MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96 (1985)) eller ved anvendelse av fagdisplay (se *f.eks.* Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222:581 (1991)). I en spesifikk utførelsesform er det humane antistoffet dannet i en transgen mus. Teknikker for fremstilling av slik delvis til fullstendige humane antistoffer er kjent på området og hvilken som helst av slike teknikker kan anvendes. I henhold til én spesielt foretrukket utførelsesform er fullstendige humane antistoffsekvenser gjort i en transgen mus konstruert til å uttrykke humane tung- og lettkjede antistoffgener. Et eksempel på beskrivelse på fremstilling av transgene mus som produserer humane antistoffer finnes i søknadsnr. WO 02/43478 og US-patent 6.657.103 (Abgenix) og dens avkom. B-celler fra transgene mus som produserer det ønskede antistoffet kan deretter bli kondensert til å fremstille hybridomcellelinjer for kontinuerlig produksjon av antistoffet. Se *f.eks.* US-patent nr. 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.661.016; og 5.545.806; og Jakobovits, Adv. Medikament Del. Rev. 31:33-42 (1998); Green, *et al.*, J. Exp. Med. 188:483-95 (1998).

[00106] "Humant leukocyttantigen" eller "HLA" er et humant klasse I- eller klasse II-hoved vevsforlikelighetskompleks (MHC)-protein (se *f.eks.* Stites, *et al.*, IMMUNOLOGY, 8TH ED., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994).

[00107] Som anvendt her angir betegnelsen "humaniserte antistoff"-former av antistoffer som inneholder sekvenser fra ikke-humane (*f.eks.* murine) antistoffer så vel som humane antistoffer. Slike antistoffer er kimære antistoffer som inneholder minialsekvens avledet fra ikke-human immunoglobulin. Generelt vil det humaniserte antistoffet omfatte hovedsakelig alle minst en og typisk to, variable domener, hvor alle eller hovedsakelig alle de hypervariable

løkkene tilsvarer de fra en ikke-human immunoglobulin og alle eller hovedsakelig alle FR-regionene er de fra en human immunoglobulinsekvens. Det humaniserte antistoffet vil eventuelt også omfatte minst en del av en immunoglobulin konstant region (Fc), typisk det til et humant immunoglobulin. Se *f.eks.* Cabilly US-patent nr. 4.816.567; Queen *et al.* (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033; og ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996).

[00108] Betegnelsene “hybridisere”, “hybridisering”, “hybridiserer” og lignende, anvendt i sammenheng med polynukleotider, menes å referere til konvensjonelle hybridiseringsbetingelser, fortrinnsvis slike som hybridisering i 50% formamid/6XSSC/0,1% SDS/100 µg/ml ssDNA, hvor temperaturer for hybridisering er over 37 grader C og temperaturer for vasking i 0,1XSSC/0,1% SDS er over 55 grader C.

[00109] Frasene "isolert" eller "biologisk ren" refererer til materiale som hovedsakelig eller i det vesentlige er fritt fra komponenter som normalt ledsager materialet som det er funnet i dens naturlige tilstand. Således inneholder isolerte peptider i henhold til oppfinnelsen fortrinnsvis ikke materialer normalt forbundet med peptidene i deres in situ-omgivelse. For eksempel er et polynukleotid nevnte å være “isolert” når det hovedsakelig er separert fra forurensningspolynukleotider som korresponderer eller er komplementære til gener forskjellig fra PSCA-genene eller som koder for polypeptider forskjellig fra PSCA-genprodukt eller fragmenter derav. En fagmann kan lett anvende nukleinsyreisoleringsprosedyrer for å oppnå et isolert PSCA-polynukleotid. Et protein er nevnte å være “isolert,” for eksempel når fysisk, mekanisk eller kjemiske fremgangsmåter blir anvendt for å fjerne PSCA-proteinene fra cellulære bestanddeler som normalt er forbundet med proteinet. En fagmann kan lett anvende standardrensingsfremgangsmåter for å oppnå et isolert PSCA-protein. Alternativt kan et isolert protein fremstilles ved kjemiske midler.

[00110] Egnet “merker” omfatter radionuklider, enzymer, substrater, kofaktorer, inhibitorer, fluorescerende grupper, kjemiluminescent grupper, magnetiske partikler og lignende. Patenter lærer bort anvendelsen av slike merker omfatter US-patent nr. 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; og 4.366.241. I tillegg kan antistoffene tilveiebrakt her være anvendelige som den antigenbindende komponenten av fluorobodies. Se *f.eks.* Zeytun *et al.*, Nat. Biotechnol. 21:1473-79 (2003).

[00111] Betegnelsen “mammal” angir hvilken som helst organisme klassifisert som et pattedyr omfattende mus, rotter, kaniner, hunder, katter, kuer, hester og mennesker. I én utførelsesform er pattedyret en mus. I en annen utførelsesform er pattedyret et menneske.

[0100] Betegnelsene “metastasisisk prostatakraft” og “metastasisisk sykdom” betyr prostatakraft som har spredning til regionale lymfeknuter eller til spredtliggende steder og skal omfatte trinn D-sykdom i AUA-systemet og trinn TxNxM+ i TNM-systemet. Som er tilfellet med lokalt langt fremskredet prostatakraft er kirurgi generelt ikke angitt for pasienter med metastasisisk sykdom og hormonell (androgen ablasjons)-terapi er en foretrukket behandlingsmodalitet. Pasienter med metastasisisk prostatakraft utvikler til slutt en androgen-motstandsdyktig tilstand innen 12 til 18 måneder fra behandlingsinnledning. Omtrent halvparten av disse androgen-motstandsdyktige pasienter dør innen 6 måneder etter utvikling av den statusen. Det vanligste stedet for prostatakraftmetastase er ben.

Prostatakraftbenmetastaser er ofte osteoblastiske heller enn osteolytisk (*dvs.* hvilket resulterer i netto bendannelse). Benmetastaser er oftest funnet i ryggraden, fulgt av femuren, bekken, ribbeinene, kraniumet og humerus. Andre vanlig steder for metastase omfatter lymfeknuter, lunge, lever og hjerne. Metastasisisk prostatakraft er typisk diagnostisert ved åpen eller laparoskopisk bekkenlymfadenektomi, helkroppsradioklidscanner, skjelettradiografi og/eller benlesjonbiopsi.

[0101] Betegnelsen "modulator" eller "testforbindelse" eller "medikamentkandidat" eller grammatikalske ekvivalenter som anvendt her beskriver hvilket som helst molekyl, *f.eks.* protein, oligopeptid, lite organisk molekyl, polysakkarid, polynukleotid, etc., som skal testes for kapasiteten til direkte eller indirekte endre kreftfenotypen eller ekspresjonen av en kreftsekvens, *f.eks.* en nukleinsyre eller proteinsekvenser eller effekter av kreftsekvenser (*f.eks.* signalering, genekspresjon, proteininteraksjon, etc.) I ett aspekt vil en modulator nøytralisere effekten av et kreftprotein ifølge oppfinnelsen. Med "nøytralisere" menes at en aktivitet til et protein er hemmet eller blokkert, sammen med den påfølgende effekten på cellen. I et annet aspekt vil en modulator nøytralisere effekten av et gen, og dens tilsvarende protein, ifølge oppfinnelsen ved nøytralisering av nivåer til nevnte protein. I foretrukne utførelsesformer endrer modulatorer ekspresjonsprofiler eller ekspresjonsprofilnukleinsyrer eller proteiner tilveiebrakt her eller nedstrøms effektorreaksjonsveier. I én utførelsesform undertrykker modulatorene en kreftfenotype, *f.eks.* til et normalt vevs fingeravtrykk. I en annen utførelsesform fremkaller en modulator kreftfenotype. Generelt er en rekke forsøksblandinger kjørt parallelt med forskjellige midlers konsentrasjoner for å oppnå en differensiell respons på de forskjellige konsentrasjoner. Typisk tjener én av disse konsentrasjonene som en negative kontroll, *dvs.* ved nullkonsentrasjon eller nedenfor deteksjonsnivået.

[0102] Modulatorer, medikamentkandidater eller testforbindelser omfatter en rekke kjemiske klasser, selv om de typisk er organiske molekyler, fortrinnsvis små organiske forbindelser som har en molekylvekt på mer enn 100 og mindre enn ca. 2.500 dalton. Foretrukne små molekyler er mindre enn 2000 eller mindre enn 1500 eller mindre enn 1000 eller mindre enn 500 D. Kandidatmidler omfatter funksjonelle grupper nødvendig for strukturell interaksjon med proteiner, spesielt hydrogenbinding og omfatter typisk minst en amin-, karbonyl-, hydroksyl- eller karboksylgruppe, fortrinnsvis minst to av de funksjonelle kjemiske gruppene. Kandidatmidlene omfatter ofte syklisk karbon eller heterosykliske strukturer og/eller aromatiske eller polyaromatiske strukturer substituert med én eller flere av de funksjonelle gruppene ovenfor. Modulatorer omfatter også biomolekyler slik som peptider, sakkarider, fettsyrer, steroider, puriner, pyrimidiner, derivater, strukturelle analoger eller kombinasjoner derav. Spesielt foretrukket er peptider. Én klasse av modulatorer er peptider, på for eksempel fra omtrent fem til ca. 35 aminosyrer, med fra omtrent fem til ca. 20 aminosyrer som blir foretrukket og fra ca. 7 til ca. 15 som blir spesielt foretrukket. Fortrinnsvis er det kreftmodulerende proteinet oppløselig, omfatter en ikke-transmembran region og/eller har en N-terminal Cys til å hjelpe på oppløselighet. I én utførelsesform blir C-terminus av fragmentet holdt som en fri syre og N-terminus er en fri amin for å hjelpe i kobling, *dvs.* til cystein. I én utførelsesform er et kreftprotein ifølge oppfinnelsen konjugert til et immunogent middel som beskrevet her. I én utførelsesform er kreftprotein konjugert til BSA. Peptidene ifølge oppfinnelsen, *f.eks.* av foretrukne lengder, kan være bundet til hverandre eller til andre aminosyrer for å skape et lengre peptid/protein. De modulerende peptidene kan bli fordøyet av naturlig forekommende proteiner som er beskrevet ovenfor, tilfeldige peptider eller "ensidig" tilfeldige peptider. I en foretrukket utførelsesform er peptid/proteinbaserte modulatorer antistoffer og fragmenter derav, som definert her.

[0103] Kreftmodulatorer kan også være nukleinsyrer. Nukleinsyremodulerende midler kan være naturlig forekommende nukleinsyrer, tilfeldige nukleinsyrer eller "ensidig" tilfeldige nukleinsyrer. For eksempel kan fordøyning av prokaryote eller eukaryote genomer anvendes i en angrepmåte analog med den beskrevet ovenfor for proteiner.

[0104] Betegnelsen "monoklonalt antistoff", som anvendt her, angir et antistoff oppnådd fra en populasjon av hovedsakelig homogene antistoffer, *dvs.* de individuelle antistoffer omfattende i populasjonen er identiske bortsett fra for mulige naturlig forekommende mutasjoner som kan være til stede i mindre mengder. Monoklonale antistoffer er meget spesifikke som blir rettet mot en enkel antigenepitop. I motsetning omfatter konvensjonelle

(polyklonale) antistoffremstillinger typisk en mengde antistoffer rettet mot (eller spesifikk for) forskjellige epitoper. I én utførelsesform inneholder det polyklonale antistoffet en rekke monoklonale antistoffer med forskjellige epitopspesifisiteter, affiniteter eller glupskheter innen et enkelt antigen som inneholder multiple antigenepitoper. Modifisereren "monoklonal" indikerer karakteren til antistoffet som blir oppnådd fra en hovedsakelig homogen populasjon av antistoffer og er ikke blitt konstruert som krever produksjon av antistoffet ved hvilken som helst spesiell fremgangsmåte. For eksempel kan de monoklonale antistoffene som skal anvendes i henhold til foreliggende oppfinnelse fremstilles ved hybridomfremgangsmåten først beskrevet av Kohler *et al.*, Nature 256: 495 (1975) eller kan fremstilles ved rekombinant DNA-fremgangsmåter (se *f.eks.* US-pat. nr. 4.816.567). De "monoklonale antistoffene" kan også bli isolert fra fagantistoffbiblioteker ved anvendelse av teknikkene for eksempel beskrevet i Clackson *et al.*, Nature 352: 624-628 (1991) og Marks *et al.*, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1991). Disse monoklonale antistoffene vil vanligvis binde med minst en Kd på ca. 1 μ M, mer vanligvis minst ca. 300 nM, typisk minst ca. 30 nM, fortrinnsvis minst ca. 10 nM, mer foretrukket minst ca. 3 nM eller bedre, vanligvis bestemt ved ELISA.

[0105] Et "motiv", som i biologisk motiv av et PSCA-relatert protein, angir hvilket som helst mønster av aminosyrer som former del av primærsekvensen til et protein som er forbundet med en spesiell funksjon (*f.eks.* protein-proteininteraksjon, protein-DNA-interaksjon, etc) eller modifikasjon (*f.eks.* som er fosforylert, glykosylert eller amidert) eller lokalisering (*f.eks.* sekretorisk sekvens, nukleær lokaliseringssekvens, etc.) eller en sekvens som er i samsvar med å bli immunogen, enten humoralt eller cellulært. Et motiv kan være enten påfølgende eller i stand til å bli oppstilt til visse posisjoner som generelt er i samsvar med en viss funksjon eller egenskap. I sammenheng med HLA-motiver angir "motiv" mønstret av residuer i et peptid av definert lengde, vanligvis et peptid på fra ca. 8 til ca. 13 aminosyrer for et klasse I-HLA-motiv og fra ca. 6 til ca. 25 aminosyrer for et klasse II-HLA-motiv, som er gjenkjent av et spesielt HLA-molekyl. Peptidmotiver for HLA-binding er typisk forskjellig for hvert protein kodet for av hver human HLA-allele og avviker i mønstret til de primære og sekundære ankerresiduene. Ofte forekommende motiver er angitt i tabell V.

[0106] Et "farmasøytiske tilsetningsmiddel" omfatter et materiale slik som en adjuvans, en bærer, pH-regulerings- og buffermidler, tonisiterende midler, fuktmidler, konserveringsmiddel og lignende.

[0107] "Farmasøytisk akseptabel" angir en ikke-toksisk, inert og/eller sammensetning som er fysiologisk kompatibel med mennesker eller andre pattedyr.

[0108] Betegnelsen “polynukleotid” betyr en polymere dannet av nukleotider på minst 10 baser eller basepar i lengde, enten ribonukleotider eller deoksynukleotider eller en modifisert form av hvilken som helst type av nukleotid og skal omfatte enkel- og dobbeltrådet former av DNA og/eller RNA. På området er denne betegnelsen ofte anvendt om hverandre med “oligonukleotid”. Et polynukleotid kan omfatte en nukleotidsekvens beskrevet her hvor thymidin (T), som vist for eksempel i figur 1, også kan være uracil (U); denne definisjonen tilhører til forskjellene mellom de kjemiske strukturene til DNA og RNA, spesielt observasjonen at én av de fire hovedbasene i RNA er uracil (U) istedenfor thymidin (T).

[0109] Betegnelsen “polypeptid” betyr en polymer på minst ca. 4, 5, 6, 7 eller 8 aminosyrer. Gjennom hele spesifikasjonen blir standard trebokstavs- eller enkelbokstavsbenevnelser for aminosyrer anvendt. På området er denne betegnelsen ofte anvendt om hverandre med “peptid” eller “protein”.

[0110] En HLA “primær ankerresidue” er en aminosyre på en spesifikk posisjon langs en peptidsekvens som er forstått å tilveiebringe et kontaktpunkt mellom det immunogene peptidet og HLA-molekylet. Én til tre, vanligvis to, primære ankerresiduer innen et peptid av definert lengde definerer generelt et “motiv” for et immunogent peptid. Disse residuene er forstått å passe til i nær kontakt med peptidbindingsgrop til et HLA-molekyl, med deres sidekjeder fordypet i spesifikke lommer av bindingensgropen. I én utførelsesform er for eksempel de primære ankerresiduene for et HLA-klasse I-molekyl lokalisert i posisjon 2 (fra den aminoternale posisjonen) og ved den karboksylterminale posisjonen av en 8, 9, 10, 11 eller 12 residues peptidepitop i henhold til oppfinnelsen. Alternativt, i en annen utførelsesform, binder de primære ankerresiduene til et peptid et HLA-klasse II-molekyl som er fordelt i forhold til hverandre, heller enn til terminusen til et peptid, hvor peptidet generelt er av minst 9 aminosyrer i lengde. De primære ankerposisjonene for hvert motiv og supermotiv er angitt i tabell IV(a). For eksempel kan analoge peptider dannes ved å endre nærværet eller fraværet av spesielle residuer i de primære og/eller sekundære ankerposisjonene vist i tabell IV. Slike analoger blir anvendt til å modulere bindingsaffiniteten og/eller populasjonsdekningen til et peptid omfattende et spesielt HLA-motiv eller supermotiv.

[0111] “Radioisotoper” omfatter, men er ikke begrenset til de følgende (ikke begrensede eksempler på anvendelser er også angitt i tabell IV(I)).

[0112] Med “randomisert” eller grammatikalske ekvivalenter som her påført på nukleinsyrer og proteiner menes at hver nukleinsyre og peptid består av i det vesentlige

tilfeldige henholdsvis nukleotider og aminosyrer. Disse tilfeldige peptidene (eller nukleinsyrene, beskrevet her) kan inkorporere hvilken som helst nukleotid eller aminosyre i hvilken som helst posisjon. Den syntetiske prosessen kan utformes for å danne randomiserte proteiner eller nukleinsyrer, for å tillate dannelsen av alle eller mesteparten av de mulige kombinasjoner over lengden av sekvensen, således dannelsen av et bibliotek av randomiserte kandidatbioaktive proteinholdige midler.

[0113] I én utførelsesform er et bibliotek “fullstendig randomisert,” med ingen sekvenspreferanser eller konstanter i hvilken som helst posisjon. I en annen utførelsesform er biblioteket et “ensidig tilfeldig” bibliotek. Det er, noen posisjoner innen sekvensen er enten holdt konstante eller er valgt fra et begrenset antall av muligheter. For eksempel er nukleotidene eller aminosyreresiduen randomisert innen en definert klasse, *f.eks.* av hydrofobe aminosyrer, hydrofile residuer, sterisk ensidige (enten små eller store) residuer, mot dannelsen av nukleinsyrebindingsdomener, dannelsen av cysteiner, for kryssbinding, proliner i SH-3-domener, seriner, treoniner, tyrosiner eller histidiner i fosforylerings seter, etc. eller til puriner, etc.

[0114] Et “rekombinant” DNA- eller RNA-molekyl er et DNA- eller RNA-molekyl som blir underkastet molekylær manipulering *in vitro*.

[0115] Som anvendt her angir betegnelsen "enkeltkjede-Fv-" eller "scFv-" eller “enkeltkjede”-antistoff antistofffragmenter omfattende V_H- og V_L-domenene av antistoff, hvor disse domenene er til stede i en enkel polypeptidkjede. Generelt omfatter Fv-polypeptidet videre en polypeptidlinker mellom V_H- og V_L-domenene som setter sFv i stand til å danne den ønskede strukturen for antigenbinding. For en oversikt over sFv se Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

[0116] Ikke begrensede eksempler på “små molekyler” omfatter forbindelser som binder eller interagerer med PSCA, ligander omfattende hormoner, neuropeptider, kjemokiner, odoranter, fosfolipider og funksjonelle ekvivalenter derav som binder og fortrinnsvis hemmer PSCA-proteinfunksjon. Slike ikke begrensede små molekyler har fortrinnsvis en molekylvekt på mindre enn ca. 10 kDa, mer foretrukket under ca. 9, ca. 8, ca. 7, ca. 6, ca. 5 eller ca. 4 kDa. I visse utførelsesformer er små molekyler fysisk forbundet med eller binder PSCA-protein; ikke funnet i naturlig forekommende metabolske reaksjonsveier; og/eller er mer oppløselig i vandige enn ikke-vandige løsninger.

[0117] Som anvendt her angir betegnelsen “spesifikk” den selektive bindingen av antistoffet til målantigenepitopen. Antistoffer kan testes for spesifisitet av binding ved å sammenligne binding til passende antigen mot binding til irrelevant antigen eller antigenblanding under et gitt sett av forhold. Hvis antistoffet binder til det passende antigenet minst 2, 5, 7 og fortrinnsvis 10-ganger mer enn til irrelevant antigen eller antigenblanding da det er betraktet å være spesifikt. I én utførelsesform er et spesifikt antistoff ett som bare binder PSCA-antigenet, men ikke binder til det irrelevante antigenet. I en annen utførelsesform er et spesifikt antistoff ett som binder humant PSCA-antigen men ikke binder et ikke-humant PSCA-antigen med 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% eller større aminosyrehomologi med PSCA-antigenet. I en annen utførelsesform er et spesifikt antistoff ett som binder humant PSCA-antigen og binder murint PSCA-antigen, men med en høyere grad av binding til det humane antigenet. I en annen utførelsesform er et spesifikt antistoff ett som binder humant PSCA-antigen og binder primat PSCA-antigen, men med en høyere grad av binding til det humane antigenet. I en annen utførelsesform binder det spesifikke antistoffet til humant PSCA-antigen og hvilket som helst ikke-humant PSCA-antigen, men med en høyere grad av binding til det humane antigenet eller hvilken som helst kombinasjon derav.

[0118] “Stringens” av hybridiseringsreaksjoner er lett determinerbar av en fagmann på området og generelt er en empirisk beregning avhengig av probelengde, vaskingstemperatur og saltkonsentrasjon. Generelt krever lengre prober høyere temperaturer for korrekt annealing, mens kortere prober trenger lavere temperaturer. Hybridisering avhenger generelt av evnen til denaturerte nukleinsyresekvenser til å reanneale når komplementær tråder er til stede i en omgivelse under deres smeltetemperatur. Dess høyere graden av ønsket homologi mellom proben og hybridiserbare sekvens, dess høyere den relative temperaturen som kan anvendes. Som et resultat følger det at høyere relative temperaturer vil ha tendens til å fremstille reaksjonsbetingelsene mer stringente, mens lavere temperaturer mindre så. For ytterligere detaljer og forklaring av hybridiseringsstringensreaksjoner, se Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, (1995).

[0119] “Stringente betingelser” eller “høy stringens betingelser” som definert her er identifisert ved, men ikke begrenset til, de som: (1) anvender lav ionestyrke og høy temperatur i vasking, for eksempel 0,015 M natriumklorid/0,0015 M natriumcitrat/0,1% natriumdodecylsulfat ved 50°C; (2) anvender under hybridisering et denaturerende middel, slik som formamid, for eksempel 50% (volum/volum) formamid med 0,1% bovint

serumalbumin/0,1% Ficoll/0,1% polyvinylpyrrolidon/50 mM natriumfosfatbuffer ved pH 6,5 med 750 mM natriumklorid, 75 mM natriumcitrat ved 42°C; eller (3) anvender 50% formamid, 5 x SSC (0,75 M NaCl, 0,075 M natriumcitrat), 50 mM natriumfosfat (pH 6,8), 0,1% natriumpyrofosfat, 5 x Denhardts løsning, ultralydbehandlet laksesperm DNA (50 µg/ml), 0,1% SDS og 10% dekstransulfat ved 42°C, med vaskinger ved 42°C i 0,2 x SSC (natriumklorid/natriumcitrat) og 50% formamid ved 55°C, fulgt av en høy stringens vask bestående av 0,1 x SSC inneholdende EDTA ved 55°C. "Moderat stringente betingelser" er beskrevet ved, men ikke begrenset til, de i Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989 og omfatter anvendelsen av vaskingsløsning og hybridiseringsbetingelser (*f.eks.* temperatur, ionestyrke og %SDS) mindre stringente enn de beskrevet ovenfor. Et eksempel på moderat stringente betingelser er natten over innkubering ved 65°C i en løsning omfattende: 1% bovint serumalbumin, 0,5M natriumfosfat pH7,5, 1,25mM EDTA og 7% SDS 5 x SSC (150 mM NaCl, 15 mM trinatriumcitrat), fulgt av vasking av filtrene i 2 x SSC/1% SDS ved 50°C og 0,2 X SSC/0,1% SDS ved 50°C. Fagfolk vil forstå hvorledes regulere temperaturen, ionestyrke, etc. nødvendig for å tilpasse faktorer slik som probelengde og lignende.

[0120] Et HLA "supermotiv" er en peptidbindingsspesifisitet delt av HLA-molekyler kodet for av to eller flere HLA-alleler. Totalt fenotypiske frekvenser av HLA-supertyper i forskjellige etniske populasjoner er angitt i tabell IV (f). De ikke begrensene bestanddelene av forskjellige supertyper er som følger:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Beregnet populasjonsdekning tilveiebrakt ved forskjellig HLA-supertypekombinasjoner er angitt i tabell IV(g).

[0121] Som anvendt her “å behandle” eller “terapeutisk” og grammatisk relaterte betegnelser refererer til hvilken som helst forbedring av hvilken som helst konsekvens av sykdom, slik som forlenget overlevelse, mindre sykdom og/eller en minskning av bivirkninger som er biproduktene av en alternative terapeutisk modalitet; som er lett anerkjent på området, full utrydding av sykdom er et foretrukket utkom skjønt ikke et krav for at en behandling virker.

[0122] Et “transgent dyr” (*f.eks.* en mus eller rotte) er et dyr som har celler som inneholder et transgen, hvilket transgen som ble innført i dyret eller et opphav til dyret på et prenatalt, *f.eks.* et embryonisk trinn. Et “transgen” er et DNA som er integrert i genomet til en celle fra hvilken et transgent dyr utvikles.

[0123] Som anvendt her er en HLA eller cellulær immunrespons- “vaksine” en sammensetning som inneholder eller koder for ett eller flere peptider ifølge oppfinnelsen. Det er en rekke utførelsesformer av slike vaksiner, slik som en cocktail av én eller flere individuelle peptider; ett eller flere peptider ifølge oppfinnelsen omfattet av et polyepitopisk peptid; eller nukleinsyrer som koder for slike individuelle peptider eller polypeptider, *f.eks.* et minigen som koder for et polyepitopisk peptid. De “en eller flere peptidene” kan omfatte hvilken som helst hele integerenhet fra 1-150 eller flere *f.eks.* minst 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145 eller 150 eller flere peptider ifølge oppfinnelsen. Peptidene eller polypeptidene kan eventuelt være modifisert, slik som ved lipidering, tilsetning av målrettede eller andre sekvenser. HLA-klasse I-peptider ifølge oppfinnelsen kan blandes med eller bindes til HLA-klasse II-peptider, for å lette aktivering av både cytotoksiske T-lymfocytter og hjelpe-T-lymfocytter. HLA-vaksiner kan også omfatte peptidpulserte antigenpresenterende celler, *f.eks.* dendritiske celler.

[0124] Betegnelsen “variant” angir et molekyl som oppviser en variasjon fra en beskrevet type eller norm, slik som et protein som har én eller flere forskjellige aminosyreresiduer i de tilsvarende posisjon(er) av et spesifikt beskrevet protein (*f.eks.* PSCA-proteinet vist i figur 1. En analog er et eksempel på et variantprotein. Spleiseisoformer og polymorfismer i enkelt nukleotider (SNPer) er ytterligere eksempler på varianter.

[0125] De “PSCA-beslektede proteinene” ifølge oppfinnelsen omfatter de spesifikt identifiserte her, så vel som alleliske varianter, konservative substitusjonsvarianter, analoger og homologer som kan isoleres/dannes og karakteriseres uten unødvendig eksperimentering ved å følge fremgangsmåtene beskrevet her eller lett tilgjengelige på området.

Fusjonsproteiner som kombinerer deler av forskjellige PSCA-proteiner eller fragmenter derav, så vel som fusjonsproteiner av et PSCA-protein og et heterologt polypeptid er også omfattet. Slike PSCA-proteiner er kollektivt referert til som de PSCA-beslektede proteinene, proteinene ifølge oppfinnelsen eller PSCA. Betegnelsen “PSCA-relatert protein” angir et polypeptidfragment eller en PSCA-proteinsekvens på 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 eller flere enn 25 aminosyrer; eller minst 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 eller flere aminosyrer.

II.) PSCA-polynukleotider

[0126] Et aspekt ifølge oppfinnelsen tilveiebringer polynukleotider tilsvarende eller komplementære til hele eller deler av et PSCA-gen, mRNA og/eller kodende sekvens, fortrinnsvis i isolert form, omfattende polynukleotider som koder for et PSCA-relatert protein og fragmenter derav, DNA, RNA, DNA/RNA-hybrid og relaterte molekyler, polynukleotider eller oligonukleotider komplementære til et PSCA-gen eller mRNA-sekvens eller en del derav og polynukleotider eller oligonukleotider som hybridiserer til et PSCA-gen, mRNA eller til et PSCA som koder for polynukleotid (kollektivt “PSCA-polynukleotider”). I alle tilfeller når referert til i dette avsnittet, T kan også være U i figur 1.

[0127] Utførelsesformer av et PSCA-polynukleotid omfatter: et PSCA-polynukleotid som har sekvensen vist i figur 1, nukleotidsekvensen til PSCA som vist i figur 1 hvor T er U; minst 10 påfølgende nukleotider til et polynukleotid som har sekvensen som vist i figur 1; eller minst 10 påfølgende nukleotider til et polynukleotid som har sekvensen som vist i figur 1 hvor T er U.

[0128] Polynukleotider som koder for relativt lange deler av et PSCA-protein er også innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen. For eksempel kan polynukleotider som koder fra omtrent aminosyre 1 (eller 20 eller 30 eller 40 etc.) til omtrent aminosyre 20, (eller 30 eller 40 eller 50 etc.) av PSCA-proteinet “eller variant” vist i figur 1 eller figur 3 dannes ved en rekke teknikker velkjente på området. Disse polynukleotidfragmentene kan omfatte hvilken som helst del av PSCA-sekvensen som vist i figur 1.

II.A.) Anvendelser av PSCA-polynukleotider

II.A.1. Overvåkning av genetiske anormaliteter

[0129] Polynukleotidene fra de foregående paragrafene har flere forskjellige spesifikke anvendelser. Det humane PSCA-genkartet til den kromosomale lokalisasjonen angitt i eksemplet betegnet "Kromosomal kartlegging av PSCA." For eksempel fordi PSCA-genkartet til dette kromosomet blir polynukleotider som koder for forskjellige regioner av PSCA-proteinene anvendt til å karakterisere cytogenetiske anormaliteter av dette kromosomale lokalet, slik som anormaliteter som er identifisert til å bli forbundet med forskjellige kreft. I visse gener er en rekke kromosomale anormaliteter omfattende omleiringer identifisert som frekvente cytogenetiske anormaliteter i flere forskjellige kreft (se *f.eks.* Krajinovic *et al.*, *Mutat. Res.* 382(3-4): 81-83 (1998); Johansson *et al.*, *Blood* 86(10): 3905-3914 (1995) og Finger *et al.*, *P.N.A.S.* 85(23): 9158-9162 (1988)). Således tilveiebringer polynukleotider som koder for spesifikke regioner av PSCA-proteinene nye verktøy som kan anvendes til å tegne konturene av, med større presisjon enn tidligere mulig, cytogenetiske anormaliteter i den kromosomale regionen som koder for PSCA som kan bidra til den ondartete fenotypen. I denne sammenhengen tilfredsstiller disse polynukleotidene et behov på området for å utvide sensitiviteten for kromosomal screening for å identifisere mer subtile og mindre vanlige kromosomale anormaliteter (se *f.eks.* Evans *et al.*, *Am. J. Obstet. Gynecol* 171(4): 1055-1057 (1994)).

[0130] Videre siden PSCA ble vist å være høyt uttrykt i prostata og annen kreft blir PSCA-polynukleotider anvendt ved fremgangsmåter for å fastsette statusen til PSCA-genprodukter i normalt versus kanserøst vev. Typisk blir polynukleotider som koder for spesifikke regioner av PSCA-proteinene anvendt for å bedømme tilstedeværelsen av foruroligheter (slik som delesjoner, insersjoner, punktmutasjoner eller endringer hvilket resulterer i et tap av et antigen etc.) i spesifikke regioner av PSCA-genet, slik som regioner inneholdende én eller flere motiver. Eksempler på forsøk omfatter både RT-PCR-forsøk så vel som enkelttrådig konformasjonspolymorfisme (SSCP)-analyse (se *f.eks.* Marrogi *et al.*, *J. Cutan. Pathol.* 26(8): 369-378 (1999), som begge anvender polynukleotider som koder for spesifikke regioner av et protein for å undersøke disse regioner innen proteinet.

II.A.2. Antisenseutførelsesformer

[0131] Andre spesifikt forventede nukleinsyrerelaterte utførelsesformer beskrevet her er genomisk DNA, cDNAer, ribozymmer og antisensemolekyler, så vel som nukleinsyremolekyler basert på en alternativ ryggrad eller omfattende alternative baser, hvorvidt avledet fra

naturlige kilder eller syntetiserte, og omfatter molekyler som er i stand til å hemme RNA- eller proteinekspresjonen av PSCA. For eksempel kan antisensemolekyler være RNAer eller andre molekyler, omfattende peptidnukleinsyrer (PNAer) eller ikke-nukleinsyremolekyler slik som fosforotioatderivater som spesifikt binder DNA eller RNA på en baseparavhengig måte. En fagmann kan lett oppnå disse klassene av nukleinsyremolekyler ved anvendelse av PSCA-polynukleotidene og polynukleotidsekvensene beskrevet her.

[0132] Antisenseteknologi medfører administrering av eksogene oligonukleotider som binder til et målpolynukleotid lokalisert i cellene. Betegnelsen "antisense" angir det faktumet at slike oligonukleotider er komplementære til deres intracellulære mål *f.eks.* PSCA. Se for eksempel Jack Cohen, Oligodeoxynucleotides, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; og Synthesis 1:1-5 (1988). PSCA-antisenseoligonukleotidene ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter derivater slik som S-oligonukleotider (fosforotioatderivater eller S-oligoer, se Jack Cohen, *supra*), som viser forbedret kreftcelleveksthemmende virkning. S-oligoer (nukleosidfosforotioater) er isoelektroniske analoger til et oligonukleotid (O-oligo) hvor et ikke-brudannende oksygenatom til fosfatgruppen blir erstattet med et svovelatom. S-oligoene ifølge foreliggende oppfinnelse kan fremstilles ved behandling av de tilsvarende O-oligoene med 3H-1,2-benzodithiol-3-on-1,1-dioksyd, som er en svoveloverføringsreagens. Se *f.eks.* Iyer, R. P. *et al.*, J. Org. Chem. 55:4693-4698 (1990); og Iyer, R. P. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 112:1253-1254 (1990). Ytterligere PSCA-antisenseoligonukleotider ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter morfolinoantisenseoligonukleotider kjent på området (se *f.eks.* Partridge *et al.*, 1996, Antisense & Nukleic Acid Drug Development 6: 169-175).

[0133] PSCA-antisenseoligonukleotidene ifølge foreliggende oppfinnelse kan typisk være RNA eller DNA som er komplementær til og stabilt hybridiserer med de første 100 5'-kodonene eller siste 100 3'-kodonene til en PSCA-genomisk sekvens eller den tilsvarende mRNA. Absolutt komplementaritet er ikke nødvendig, selv om høye grader av komplementaritet er foretrukket. Anvendelse av et oligonukleotid komplementært til denne regionen tillater den selektive hybridiseringen til PSCA-mRNA og ikke til mRNA som spesifiserer andre regulatorisk subenheter til proteinkinase. I én utførelsesform er PSCA-antisenseoligonukleotider ifølge foreliggende oppfinnelse 15 til 30-mer fragmenter av antisense-DNA-molekylet som har en sekvens som hybridiserer til PSCA-mRNA. Eventuelt er PSCA-antisenseoligonukleotid en 30-mer oligonukleotid som er komplementær til en region i de første 10 5'-kodoner eller siste 10 3'-kodoner av PSCA. Alternativt blir

antisensemolekylene modifisert til å anvende ribozymmer i hemningen av PSCA-ekspresjon, se *f.eks.* L. A. Couture & D. T. Stinchcomb; Trends Genet 12: 510-515 (1996).

II.A.3. Primere og primerpar

[0134] Videre omfatter spesifikke utførelsesformer av disse nukleotidene ifølge oppfinnelsen primere og primerpar, som tillater den spesifikke amplifiseringen av polynukleotider ifølge oppfinnelsen eller av hvilke som helst spesifikke deler derav og prober som selektivt eller spesifikt hybridiserer til nukleinsyremolekyler ifølge oppfinnelsen eller til hvilken som helst del derav. Prober kan være merket med en detekterbar markør, slik som for eksempel en radioisotop, fluorescerende forbindelse, bioluminescerende forbindelse, en kjemiluminescerende forbindelse, metallkjelator eller enzym. Slike prober og primere blir anvendt for å detektere tilstedeværelsen av et PSCA-polynukleotid i en prøve og som et middel for detektering av en celle som uttrykker et PSCA-protein.

[0135] Eksempler på slike prober omfatter polypeptider omfattende hele eller del av den humane PSCA-cDNA-sekvensen vist i figur 1. Eksempler på primerpar som er i stand til å spesifikt amplifisere PSCA-mRNAer er også beskrevet i eksemplene. Som det vil forstås av fagfolk, en stor mengde forskjellig primere og prober kan fremstilles basert på sekvensene tilveiebrakt her og anvendt effektivt til å amplifisere og/eller detektere en PSCA-mRNA.

[0136] PSCA-polynukleotidene ifølge oppfinnelsen er anvendelige for en rekke formål, omfattende men ikke begrenset til anvendelse av dem som prober og primere for amplifiseringen og/eller deteksjonen av PSCA-genet(ene), mRNA(er) eller fragmenter derav; som reagenser for diagnosen og/eller prognosen til prostatakraft og annen kreft; som kodende sekvenser som er i stand til å dirigere ekspresjonen av PSCA-polypeptider; som verktøy for å modulere eller hemme ekspresjonen av PSCA-genet(ene) og/eller translasjonen av PSCA-transkriptet(ene); og som terapeutiske midler.

[0137] Foreliggende oppfinnelse omfatter anvendelse av hvilken som helst probe som beskrevet her for å identifisere og isolere et PSCA eller PSCA-relaterte nukleinsyresekvens fra en naturlig forekommende kilde, slik som mennesker eller andre pattedyr, så vel som den isolerte nukleinsyresekvensen per se, som vill omfatte alle eller mesteparten av sekvensene funnet i den anvendte proben.

II.A.4. Isolering av PSCA-kodende nukleinsyremolekyler

[0138] PSCA-cDNA-sekvensene beskrevet her setter i stand til isoleringen av andre polynukleotider som koder for PSCA-genprodukt(er), så vel som isoleringen av polynukleotider som koder for PSCA-genproduktthomologer, alternativt spleisete isoformer,

alleliske varianter og mutantformer av et PSCA-genprodukt så vel som polynukleotider som koder for analoger til PSCA-beslektede proteiner. Forskjellige molekylære kloningsfremgangsmåter som kan anvendes for å isolere fullengde cDNAer som koder for et PSCA-gen er velkjente (se for eksempel Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2d edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel *et al.*, Eds., Wiley and Sons, 1995). For eksempel kan lambda-fagkloningsfremgangsmåter hensiktsmessig anvendes ved anvendelse av kommersielt tilgjengelige kloningssystemer (*f.eks.* Lambda ZAP Express, Stratagene). Fagkloner inneholdende PSCA-gen-cDNAer kan identifiseres ved probing med et merket PSCA-cDNA eller et fragment derav. For eksempel kan i én utførelsesform et PSCA-cDNA (*f.eks.* figur 1) eller en del derav syntetiseres og anvendes som en probe til å gjenvinne overlappende og fullengde cDNAer svarende til et PSCA-gen. Et PSCA-gen selv kan isoleres ved screening av genomiske DNA-biblioteker, bakterielle kunstige kromosombiblioteker (BACer), kunstig gjærkromosombiblioteker (YACer) og lignende, med PSCA-DNA-prober eller primere.

II.A.5. Rekombinante nukleinsyremolekyler og vertsvektorsystemer

[0139] Oppfinnelsen tilveiebringer også rekombinante DNA- eller RNA-molekyler inneholdende et PSCA-polynukleotid, et fragment, analog eller homolog derav, omfattende men ikke begrenset til fag, plasmider, fagmider, kosmider, YACer, BACer, så vel som forskjellige virale og ikke-virale vektorer velkjente på området og celler transformerte eller transfektert med slike rekombinante DNA- eller RNA-molekyler. Fremgangsmåter for dannelse av slike molekyler er velkjent (se for eksempel Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

[0140] Oppfinnelsen tilveiebringer videre et vertsvektorsystem omfattende et rekombinant DNA-molekyl inneholdende et PSCA-polynukleotid, fragment, analog eller homolog derav innen en egnet prokaryot eller eukaryot vertscelle. Eksempler på egnede eukaryote vertsceller omfatter en gjærcele, en plantecelle eller en dyrecelle, slik som en mammalske celle eller en insektcelle (*f.eks.* en baculovirus-infekterbar celle slik som en Sf9- eller HighFive-celle). Eksempler på egnede mammalske celler omfatter forskjellige prostatakreftecellelinjer slik som DU145 og TsuPr1, andre transfekterbare eller transducible prostatakreftecellelinjer, primære celler (PrEC), så vel som flere mammalske celler rutinemessig anvendte for ekspresjon av rekombinante proteiner (*f.eks.* COS-, CHO-, 293-, 293T-celler). Mer spesielt kan et polynukleotid omfattende den kodende sekvensen av PSCA eller et fragment, analog eller homolog derav anvendes for å danne PSCA-proteiner eller fragmenter derav ved anvendelse

av hvilket som helst antall av vertsvektorsystemer rutinemessig anvendt og bredt kjent på området.

[0141] Et bredt område av vertsvektorsystemer egnet for ekspresjon av PSCA-proteiner eller fragmenter derav er tilgjengelig, se for eksempel Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, *supra*). Foretrukne vektorer for mammalsk ekspresjon omfatter men er ikke begrenset til pcDNA 3.1-myc-His-tag (Invitrogen) og den retrovirale vektoren pSR α tkneo (Muller *et al.*, 1991, MCB 11:1785). Ved anvendelse av disse ekspresjonsvektorene kan PSCA uttrykkes i mange prostatakreft- og ikke-prostatacellelinjer, omfattende for eksempel 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 og TsuPr1. Vertsvektorsystemene ifølge oppfinnelsen er anvendelige for fremstilling av et PSCA-protein eller fragment derav. Slike vertsvektorsystemer kan anvendes for å undersøke de funksjonelle egenskapene til PSCA og PSCA-mutasjoner eller analoger.

[0142] Rekombinant humant PSCA-protein eller en analog eller homolog eller fragment derav kan produseres av mammalske celler transfektert med en konstruksjon som koder for et PSCA-relatert nukleotid. For eksempel kan 293T-celler transfekteres med et ekspresjonsplasmid som koder for PSCA eller fragment, analog eller homolog derav, et PSCA-relatert protein er uttrykt i 293T-cellene og det rekombinante PSCA-proteinet blir isolert ved anvendelse av standardrensningsfremgangsmåter (*f.eks.* affinitetsrensning ved anvendelse av anti-PSCA-antistoffer). I en annen utførelsesform er en PSCA-kodende sekvens subklonet inn i den retrovirale vektoren pSR α MSVtkneo og anvendt for å infisere forskjellige mammalske cellerlinjer, slik som NIH 3T3, TsuPr1, 293 og rat-1 for å etablere PSCA-uttrykkende cellerlinjer. Forskjellige andre ekspresjonssystemer velkjente på området kan også anvendes. Ekspresjonskonstruksjoner som koder for et lederpeptid bundet i ramme til en PSCA-kodende sekvens kan anvendes for dannelsen av en utskilt form av rekombinant PSCA-protein.

[0143] Som beskrevet her tillater overskudd i den genetiske koden variasjon i PSCA-gensekvenser. Spesielt er det kjent på området at spesifikke vertsarter ofte har spesifikke kodonpreferanser og således kan én adaptere den beskrevne sekvensen som foretrukket for en ønsket vert. For eksempel foretrukne analoge kodonsekvenser har typisk sjeldne kodoner (*dvs.* kodoner som har en anvendelsesfrekvens på mindre enn ca. 20% i kjente sekvenser til den ønskede vert) erstattet med høyere frekvens kodoner. Kodonpreferanser for en spesifikk art blir beregnet, for eksempel ved anvendelse av kodonanvendelsestabeller tilgjengelig på INTERNETTET slik som på URL dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html.

[0144] Ytterligere sekvensmodifikasjoner er kjent for å forbedre proteinekspresjon i en cellulær vert. Disse omfatter eliminering av sekvenser som koder for uekte polyadenyleringssignaler, ekson/intron-spleisesetesignaler, transposonlignende repetisjoner og/eller andre slike velkarakteriserte sekvenser som er skadelige for genekspressjon. GC-innholdet til sekvensen blir regulert til gjennomsnittnivåer for en gitt cellulær vert, som beregnet med referanse til kjente gener uttrykt i vertscellen. Hvor mulig blir sekvensen modifisert for å unngå forutsagte sekundære mRNA-hårnålstrukturer. Andre anvendelige modifikasjoner omfatter tilsetningen av en translasjonell initierings konsensussekvens ved starten av den åpne leserammen, som beskrevet i Kozak, Mol. Cell Biol., 9:5073-5080 (1989). Fagfolk forstår at den generelle regelen at eukaryot ribosomer initierer translasjon utelukkende ved den 5'-proksimale AUG-kodonen er avskaffet kun ved sjeldne forhold (se *f.eks.* Kozak PNAS 92(7): 2662-2666, (1995) og Kozak NAR 15(20): 8125-8148 (1987)).

III.) PSCA-beslektede proteiner

[0145] Et annet aspekt ifølge foreliggende oppfinnelse tilveiebringer PSCA-beslektede proteiner. Spesifikke utførelsesformer av PSCA-proteiner omfatter et polypeptid som har hele eller del av aminosyresekvensen til humant PSCA som vist i figur 1, fortrinnsvis figur 1A. Alternativt omfatter utførelsesformer av PSCA-proteiner variant, homologe eller analoge polypeptider som har endringer i aminosyresekvensen til PSCA vist i figur 1.

[0146] Utførelsesformer av et PSCA-polypeptid omfatter: et PSCA-polypeptid som har en sekvens vist i figur 1, en peptidsekvens av et PSCA som vist i figur 1 hvor T er U; minst 10 påfølgende nukleotider til et polypeptid som har sekvensen som vist i figur 1; eller minst 10 påfølgende peptider til et polypeptid som har sekvensen som vist i figur 1 hvor T er U.

[0147] Aminosyreforkortelser er gitt i tabell II. Konservative aminosyresubstitusjoner kan ofte være gjort i et protein uten endring av hverken konformasjonen eller funksjonen av proteinet. Proteiner ifølge oppfinnelsen kan omfatte 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 konservative substitusjoner.

[0148] Utførelsesformer ifølge oppfinnelsen beskrevet her omfatter en rekke artsaksepterte varianter eller analoger til PSCA-proteiner slik som polypeptider som har aminosyreinsersjoner, -delesjoner og -substitusjoner. PSCA-varianter kan fremstilles ved anvendelse av fremgangsmåter kjent på området slik som setedirigert mutagenese, alaninscanning og PCR-mutagenese. Setedirigert mutagenese (Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), kasettmutagenese (Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)), restriksjonssleksjonsmutagenese (Wells *et al.*, Philos. Trans. R.

Soc. London SerA, 317:415 (1986)) eller andre kjente teknikker som kan utføres på det klonete DNAet for å produsere PSCA-variant DNAet.

[0149] Scanningaminosyreanalyse kan også anvendes for å identifisere én eller flere aminosyrer langs en sammenhengende sekvens som er involvert i en spesifikk biologisk aktivitet slik som en protein-proteininteraksjon. Blant den foretrukne scanningen er aminosyrer relativt små, nøytrale aminosyrer. Slike aminosyrer omfatter alanin, glycin, serin og cystein. Alanin er typisk en foretrukket scanningsaminosyre blant denne gruppen fordi den eliminerer sidekjeden ut over betakarbonet og er mindre sannsynlig for å endre hovedkjedekonformasjonen av varianten. Alanin er også typisk foretrukket fordi det er den vanligste aminosyren. Videre er den ofte funnet i både fordypede og eksponerte posisjoner (Creighton, *The Proteins*, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, *J. Mol. Biol.*, 150:1 (1976)). Hvis alaninsubstitusjon ikke gir utbytte i tilstrekkelige mengder av variant kan en isosterisk aminosyre anvendes.

[0150] Som definert her har PSCA-varianter, analoger eller homologer de atskilte attributer av å ha minst én epitop som er "kryssreaktiv" med et PSCA-protein som har en aminosyresekvens fra figur 1. Som anvendt i denne setningen betyr "kryssreaktiv" at et antistoff eller T-celle som spesifikt binder til en PSCA-variant også spesifikt binder til et PSCA-protein som har en aminosyresekvens angitt i figur 1. Et polypeptid opphører å være en variant av et protein vist i figur 1, når det ikke lenger inneholder hvilken som helst epitop som er i stand til å bli gjenkjent av et antistoff eller T-celle som spesifikt binder til det startende PSCA-proteinet. Fagfolk på området forstår at antistoffer som gjenkjenner proteiner binder til epitoper av varierende størrelse og en gruppering i rekkefølgen av omtrent fire eller fem aminosyrer, påfølgende eller ikke, er betraktet som et typisk antall aminosyrer i en minimalepitop. Se *f.eks.* 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.

[0151] Andre klasser av PSCA-relaterte proteinvarianter deler 70%, 75%, 80%, 85% eller 90% eller mer similaritet med en aminosyresekvens fra figur 1 eller et fragment derav. En annen spesifikk klasse av PSCA-proteinvarianter eller analoger omfatter én eller flere av de PSCA-biologiske motivene beskrevet her eller for tiden kjent på området. Således er omfattet, ifølge foreliggende oppfinnelse, analoger til PSCA-framenter (nukleinsyre eller aminosyre) som har endret funksjonelle (*f.eks.* immunogene) egenskaper i forhold til det startende fragmentet. Det skal anerkjennes at motiver nå eller som blir del av området skal påføres på nukleinsyren eller aminosyresekvenser til figur 1.

[0152] Som beskrevet her omfatter utførelsesformer av den krevde oppfinnelsen polypeptider inneholdende mindre enn den fulle aminosyresekvensen til et PSCA-protein vist i figur 1. For eksempel omfatter representative utførelsesformer ifølge oppfinnelsen peptider/proteiner som har hvilken som helst 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 eller flere påfølgende aminosyrer fra et PSCA-protein vist i figur 1.

[0153] PSCA-beslektede proteiner er dannet ved anvendelse av standard peptidsynteseteknologi eller ved anvendelse av kjemisk spaltningsfremgangsmåter velkjente på området. Alternativt kan rekombinante fremgangsmåter anvendes for å danne nukleinsyremolekyler som koder for et PSCA-relatert protein. I én utførelsesform tilveiebringer nukleinsyremolekyler et middel for å danne definerte fragmenter av et PSCA-protein (eller varianter, homologer eller analoger derav).

III.A.) Motivbærende proteinutførelsesformer

[0154] Ytterligere illustrative utførelsesformer ifølge oppfinnelsen beskrevet her omfatter PSCA-polypeptider omfattende aminosyresidene til én eller flere av de biologiske motivene inneholdt innen en PSCA-polypeptidsekvens angitt i figur 1. Forskjellige motiver er kjent på området og et protein kan evalueres for tilstedeværelsen av slike motiver ved flere offentlig tilgjengelig internettsteder (se *f.eks.* URL-adresser: pfam.wustl.edu/; searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html; psort.ims.u-tokyo.ac.jp/; cbs.dtu.dk/; ebi.ac.uk/interpro/scan.html; expasy.ch/tools/scnpsit1.html; Epimatrix™ og Epimer™, Brown University, brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; og BIMAS, bimas.dcrn.nih.gov/).

[0155] Motivbærende subsekvenser av alle PSCA-variantproteiner er angitt og identifisert i tabeller V-XVIII og XXII-LI.

[0156] Tabell IV(h) angir mange ofte forekommende motiver basert på pfam-søk (se URL-adresse pfam.wustl.edu/). Kolonnene i tabell IV(h) lister (1) motivnavnforkortelse, (2) prosent identitet funnet blant de forskjellige medlemmer av motivfamilien, (3) motivnavn eller beskrivelse og (4) vanligste funksjon; lokalisasjonsinformasjon er omfattet hvis motivet er relevant for lokalisasjon.

[0157] Polypeptider omfattende én eller flere av PSCA-motivene beskrevet ovenfor er anvendelige i klargjøring av de spesifikke karakteristika til en ondartet fenotype i betraktning av observasjonen at PSCA-motivene beskrevet ovenfor er forbundet med vekstdysregulering og fordi PSCA er overuttrykt i visse kreft (se *f.eks.* tabell I). Kasein kinase II, cAMP og camp-avhengig proteinkinase og Proteinkinase C, for eksempel, er enzymer kjent for å være

forbundet med utviklingen av den ondartete fenotypen (se *f.eks.* Chen *et al.*, Lab Invest., 78(2): 165-174 (1998); Gaiddon *et al.*, Endocrinology 136(10): 4331-4338 (1995); Hall *et al.*, Nucleic Acids Research 24(6): 1119-1126 (1996); Peterziel *et al.*, Oncogene 18(46): 6322-6329 (1999) og O'Brian, Oncol. Rep. 5(2): 305-309 (1998)). Videre er både glykosylering og myristoylering proteinmodifikasjoner også forbundet med kreft og kreftprogresjon (se *f.eks.* Dennis *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1473(1):21-34 (1999); Raju *et al.*, Exp. Cell Res. 235(1): 145-154 (1997)). Amidering er en annen proteinmodifikasjon også forbundet med kreft og kreftprogresjon (se *f.eks.* Treston *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (13): 169-175 (1992)).

[0158] I en annen utførelsesform omfatter proteiner ifølge oppfinnelsen én eller flere av de immunoreaktive epitopene identifisert i henhold til artsaksepterte fremgangsmåter, slik som peptidene angitt i tabeller V-XVIII og XXII-LI. CTL-epitoper kan bestemmes ved anvendelse av spesifikke algoritmer for å identifisere peptider innen et PSCA-protein som optimalt kan binde til spesifiserte HLA-alleler (*f.eks.* tabell IV; Epimatrix™ og Epimer™, Brown University, URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; og BIMAS, URL bimas.dcrn.nih.gov/.) Videre er prosesser for å identifisere peptider som har tilstrekkelig bindingsaffinitet for HLA-molekyler og som er i samsvar med å være immunogene epitoper velkjente på området og blir utført uten unødvendig eksperimentering. I tillegg er prosesser for å identifisere peptider som er immunogene epitoper velkjente på området og blir utført uten unødvendig eksperimentering enten *in vitro* eller *in vivo*.

[0159] Også kjent på området er prinsipper for frembringning av analoger til slike epitoper for å modulere immunogenisitet. For eksempel begynner én med en epitop som bærer et CTL- eller HTL-motiv (se *f.eks.* HLA-klasse I- og HLA-klasse II-motivene/supermotivene i tabell IV). Epitopen er analogisert ved å substituere ut en aminosyre i én av de spesifiserte posisjonene og omplassering av det med en annen aminosyre spesifisert for den posisjonen. For eksempel på basisen av residuer definert i tabell IV kan én substituere ut en skadelig residu til fordel for hvilken som helst annen residu, slik som en foretrukket residu; substituere en mindre foretrukket residu med en foretrukket residu; eller substituere en opprinnelig forekommende foretrukket residu med en annen foretrukket residu. Substitusjoner kan forekomme ved primære ankerposisjoner eller ved andre posisjoner i et peptid; se *f.eks.* tabell IV.

[0160] En rekke referanser reflekterer området angående identifikasjonen og dannelsen av epitoper i et interessant protein så vel som analoger derav. Se for eksempel WO 97/33602 til

Chesnut *et al.*; Sette, Immunogenetics 1999 50(3-4): 201-212; Sette *et al.*, J. Immunol. 2001 166(2): 1389-1397; Sidney *et al.*, Hum. Immunol. 1997 58(1): 12-20; Kondo *et al.*, Immunogenetics 1997 45(4): 249-258; Sidney *et al.*, J. Immunol. 1996 157(8): 3480-90; og Falk *et al.*, Nature 351: 290-6 (1991); Hunt *et al.*, Science 255:1261-3 (1992); Parker *et al.*, J. Immunol. 149:3580-7 (1992); Parker *et al.*, J. Immunol. 152:163-75 (1994)); Kast *et al.*, 1994 152(8): 3904-12; Borrás-Cuesta *et al.*, Hum. Immunol. 2000 61(3): 266-278; Alexander *et al.*, J. Immunol. 2000 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan *et al.*, J. Immunol. 1991 147(8): 2663-2669; Alexander *et al.*, Immunity 1994 1(9): 751-761 og Alexander *et al.*, Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92.

[0161] Relaterte utførelsesformer ifølge oppfinnelsen omfatter polypeptider omfattende kombinasjoner av de forskjellige motivene angitt i tabell(er) IV(a), IV(b), IV(c), IV(d) og IV(h) og/eller, én eller flere av de antatte CTL-epitopene i tabeller V-XVIII og XXII-LI og/eller, én eller flere av de antatte HTL-epitopene i tabeller XLVIII-LI og/eller, én eller flere av T-celle bindingsmotivene kjent på området. Foretrukne utførelsesformer inneholder ingen innersjoner, delesjoner eller substitusjoner hverken innen motivene eller innen de mellomliggende sekvensene av polypeptidene. I tillegg kan utførelsesformer som omfatter flere av enten N-terminale og/eller C-terminale aminosyreresiduer på hvilken som helst side av disse motivene være ønskelig (til for eksempel å omfatte en større del av polypeptidarkitekturen hvor motivet er lokalisert). Typisk er antallet N-terminale og/eller C-terminale aminosyreresiduer på hvilken som helst side av et motiv mellom ca. 1 til ca. 100 aminosyreresiduer, fortrinnsvis 5 til ca. 50 aminosyreresiduer.

[0162] PSCA-beslektede proteiner er konkretisert i mange former, fortrinnsvis i isolert form. Et rensset PSCA-proteinmolekyl vil være hovedsakelig fritt for andre proteiner eller molekyler som svekker bindingen av PSCA til antistoff, T-celle eller annen ligand. Naturen og graden av isolering og rensning vil avhenge av den tilsiktede anvendelsen. Utførelsesformer av PSCA-beslektede proteiner omfatter rensede PSCA-beslektede proteiner og funksjonelle, oppløselige PSCA-beslektede proteiner. I én utførelsesform beholder et funksjonelt, oppløselig PSCA-protein eller fragment derav evnen til å være bundet til antistoff, T-celle eller annen ligand.

[0163] Oppfinnelsen tilveiebringer også PSCA-proteiner omfattende biologisk aktive fragmenter av en PSCA-aminosyresekvens vist i figur 1. Slike proteiner viser egenskaper til det startende PSCA-proteinet, slik som evnen for å fremkalle dannelsen av antistoffer som spesifikt binder en epitop forbundet med det startende PSCA-proteinet; for å være bundet av

slike antistoffer; for å fremkalle aktivering av HTL eller CTL; og/eller å være gjenkjent av HTL eller CTL som også spesifikt binder til det startende proteinet.

[0164] PSCA-relaterte polypeptider som inneholder spesielt interessante strukturer kan være forutsagte og/eller identifiserte ved anvendelse av forskjellige analytiske teknikker velkjente på området, omfattende for eksempel fremgangsmåtene til Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz eller Jameson-Wolf-analyse eller basert på immunogenisitet. Fragmenter som inneholder slike strukturer er spesielt anvendelige i dannelsen av subenhetspesifikke anti-PSCA-antistoffer eller T-celler eller i identifikasjon av cellulære faktorer som binder til PSCA. For eksempel kan hydrofilitetsprofiler dannes og immunogene peptidfragmenter identifiseres ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828.

Hydrofatisitetsprofiler kan dannes og immunogene peptidfragmenter identifiseres ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132. Prosent (%) tilgjengelige residueprofiler kan dannes og immunogene peptidfragmenter identifiseres ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Gjennomsnitts fleksibilitetsprofiler kan dannes og immunogene peptidfragmenter identifiseres ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Beta-turnprofiler kan dannes og immunogene peptidfragmenter identifiseres ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294.

[0165] CTL-epitoper kan bestemmes ved anvendelse av spesifikke algoritmer for å identifisere peptider innen et PSCA-protein som optimalt kan binde til spesifiserte HLA-alleler (*f.eks.* ved anvendelse av SYFPEITHI-stedet på "world wide web"-URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/; opplistingene i tabell IV(A)-(E); Epimatrix™ og Epimer™, Brown University, URL (brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); og BIMAS, URL bimas.dcrt.nih.gov/). For å illustrerer dette er peptidepitoper fra PSCA som presentert i sammenhengen med humane MHC-klasse I-molekyler, *f.eks.* ble HLA-A1, A2, A3, A11, A24, B7 og B35 forutsagte (se *f.eks.* tabeller V-XVIII, XXII-LI). Spesifikt ble den fullstendige aminosyresekvensen til PSCA-protein og relevante deler av andre varianter, *dvs.* for HLA-klasse I-forutsigelser 9 flankerende residuer på hvilken som helst side av en punktmutasjon eller eksonsammenføyning og for HLA-klasse II-forutsigelser 14 flankerende residuer på hvilken som helst side av en punktmutasjon eller eksonsammenføyning svarende til den varianten, entret inn i HLA-peptidmotivsøkealgoritmen funnet i "Bioinformatics and

Molecular Analysis Section” (BIMAS)-webstedet listet opp ovenfor; i tillegg til stedet SYFPEITHI på URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/.

[0166] HLA-peptidmotivsøkealgoritmen ble utviklet av Dr. Ken Parker basert på binding av spesifikke peptidsekvenser i gropen til HLA-klasse I-molekyler, spesielt HLA-A2 (se *f.eks.* 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)). Denne algoritmen tillater lokalisasjon og rangering av 8-mer, 9-mer og 10-mer peptider fra en fullstendig proteinsekvens for forutsagt binding til HLA-A2 så vel som en rekke andre HLA-klasse I-molekyler. Mange HLA-klasse I-bindingspeptider er 8-, 9-, 10 eller 11-mere. For eksempel for klasse I-HLA-A2 inneholder epitopenene fortrinnsvis en leucin (L) eller metionin (M) i posisjon 2 og en valin (V) eller leucin (L) ved C-terminus (se *f.eks.* Parker *et al.*, J. Immunol. 149:3580-7 (1992)). Valgte resultater fra PSCA-forutsagte bindingspeptider er vist i tabeller V-XVIII og XXII-LI her. I tabeller V-XVIII og XXII-XLVIII er valgte kandidater av 9-mere og 10-mere for hvert familiemedlem vist sammen med deres lokalisasjon, aminosyresekvensen til hvert spesifikt peptid og beregnet bindingsscore. I tabeller XLVIII-LI er valgte kandidater av 15-mere for hvert familiemedlem vist sammen med deres lokalisasjon, aminosyresekvensen til hvert spesifikt peptid og beregnet bindingsscore. Bindingsscoren svarer til den beregnede halveringstiden for dissosiering av komplekser inneholdende peptidet ved 37°C ved pH 6,5. Peptider med den høyeste bindingsscoren er forutsagte å være det stammest bundet til HLA-klasse I på celleoverflaten for den største tidsperioden og representerer således det beste immunogene målet for T-cellegjenkjennelse.

[0167] Aktuell binding av peptider til et HLA-allele kan evalueres ved stabilisering av HLA-ekspresjon på den antigenprosesseringsdefekte cellelinjen T2 (se *f.eks.* Xue *et al.*, Prostate 30:73-8 (1997) og Peshwa *et al.*, Prostate 36:129-38 (1998)). Immunogenisitet av spesifikke peptider kan evalueres *in vitro* ved stimulering av CD8+ cytotoxiske T-lymfocytter (CTL) i nærvær av antigenpresenterende celler slik som dendritiske celler.

[0168] Det skal anerkjennes at hver epitop forutsagt ved BIMAS-stedet, Epimer™- og Epimatrix™-steder eller spesifisert HLA-klasse I- eller klasse II-motivene tilgjengelige på området eller som blir del av området slik som angitt i tabell IV (eller bestemt ved anvendelse av “world wide web”-sted URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/ eller BIMAS, bimas.dcrn.nih.gov/) skal bli “anvendt” til et PSCA-protein i henhold til oppfinnelsen. Som anvendt i denne sammenhengen betyr “anvendt” at et PSCA-protein er evaluert, *f.eks.* visuelt

eller ved databaserte mønstertreffremgangsmåter, som anerkjent av fagfolk på det relevante området. Hver subsekvens av et PSCA-protein på 8, 9, 10 eller 11 aminosyreresiduer som bærer et HLA-klasse I-motiv eller en subsekvens på 9 eller flere aminosyreresiduer som bærer et HLA-klasse II-motiv er innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen.

III.B.) Ekspresjon av PSCA-beslektede proteiner

[0169] I en utførelsesform beskrevet i eksemplene som følger kan PSCA være hensiktsmessig uttrykt i celler (slik som 293T-celler) transfektert med en kommersielt tilgjengelig ekspresjonsvektor slik som en CMV-drevet ekspresjonsvektor som koder for PSCA med en C-terminal 6XHis- og MYC-tag (pcDNA3.1/mycHis, Invitrogen eller Tag5, GenHunter Corporation, Nashville TN). Tag5-vektoren tilveiebringer et IgGK-sekresjonssignal som kan anvendes for å lette fremstillingen av et utskilt PSCA-protein i transfekterte celler. Den utskilte HIS-merkete PSCA i dyrkningsmediene kan renses, *f.eks.* ved anvendelse av en nikkelskolonne ved anvendelse av standardteknikker.

III.C.) Modifikasjoner av PSCA-beslektede proteiner

[0170] Modifikasjoner av PSCA-beslektede proteiner slik som kovalente modifikasjoner omfattes av omfanget ifølge foreliggende oppfinnelse. Én type kovalent modifikasjon omfatter omsetning av målrettene aminosyreresiduer til et PSCA-polypeptid med et organisk derivatiseringsmiddel som kan omsettes med valgte sidekjeder eller de N- eller C-terminale residuene til et PSCA-protein. En annen type kovalent modifikasjon av et PSCA-polypeptid omfattet innenfor omfanget ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter endring av det naturlige glykosyleringsmønster til et protein ifølge oppfinnelsen. En annen type kovalent modifikasjon av PSCA omfatter kobling av et PSCA-polypeptid til én av en rekke ikke-proteinholdige polymerer, *f.eks.* polyetylenglykol (PEG), polypropylenglykol eller polyoksyalkylener, på måten angitt i US-patent nr. 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 eller 4.179.337.

[0171] De PSCA-beslektede proteinene ifølge foreliggende oppfinnelse kan også modifiseres for å danne et kimært molekyl omfattende PSCA kondensert til et annet, heterologt polypeptid eller aminosyresekvens. Slikt et kimært molekyl kan syntetiseres kjemisk eller rekombinant. Et kimært molekyl kan ha et protein ifølge oppfinnelsen kondensert til et annet tumorassosiert antigen eller fragment derav. Alternativt kan et protein i henhold til oppfinnelsen omfatte en fusjon av fragmenter av en PSCA-sekvens (amino- eller nukleinsyre) slik at et molekyl er dannet som ikke er, gjennom dens lengde, direkte homolog til amino- eller nukleinsyresekvensene vist i figur 1. Slikt et kimært molekyl kan omfatte

multipler til samme subsekvens av PSCA. Et kimært molekyl kan omfatte en fusjon av et PSCA-relatert protein med en polyhistidineepitoptag, som tilveiebringer en epitop til hvilken immobilisert nikkel kan binde selektivt med cytokiner eller med vekstfaktorer. Epitoptagen er generelt plassert ved amino- eller karboksylterminus til et PSCA-protein. I en alternativ utførelsesform kan det kimære molekylet omfatte en fusjon av et PSCA-relatert protein med en immunoglobulin eller en spesiell region til en immunoglobulin. For en bivalent form av det kimære molekylet (også referert til som et "immunoadhesin") kunne en slik fusjon være til Fc-regionen av et IgG-molekyl. Ig-fusjonene omfatter fortrinnsvis substitusjonen av en oppløselig (transmembrandomenedeletert eller -inaktivert) form av et PSCA-polypeptid istedenfor minst én variabel region innen et Ig-molekyl. I en foretrukket utførelsesform omfatter immunoglobulinfusjonen hengselet CH2 og CH3 eller hengselete CHI-, CH2- og CH3-regioner av et IgG-molekyl. For fremstillingen av immunoglobulinfusjoner se *f.eks.* US-patent nr. 5.428.130 publisert juni 27, 1995.

III.D.) Anvendelser av PSCA-beslektede proteiner

[0172] Proteinene ifølge oppfinnelsen har flere forskjellig spesifikke anvendelser. Da PSCA er høyt uttrykt i prostata og annen kreft blir PSCA-beslektede proteiner anvendt ved fremgangsmåter som fastsetter statusen til PSCA-genprodukter i normalt versus kancerøst vev, derved klargjøring av den ondartete fenotypen. Typisk blir polypeptider fra spesifikke regioner av et PSCA-protein anvendt for å bedømme tilstedeværelsen av foruroligheter (slik som delesjoner, insersjoner, punktmutasjoner etc.) i de regionene (slik som regioner inneholdende én eller flere motiver). Eksempler på forsøk som anvender antistoffer eller T-celler målrettede PSCA-beslektede proteiner omfattende aminosyreresiduene til én eller flere av de biologiske motivene inneholdt innen en PSCA-polypeptidsekvens for å evaluere karakteristika til denne regionen i normalt versus kancerøst vev eller for å fremkalle en immunrespons på epitopen. Alternativt blir PSCA-beslektede proteiner som inneholder aminosyreresiduene til én eller flere av de biologiske motivene i et PSCA-protein anvendt for å screene for faktorer som interagerer med den regionen til PSCA.

[0173] PSCA-proteinfragmenter/-subsekvenser er spesielt anvendelige i dannelsen og karakterisering av domenespesifikke antistoffer (*f.eks.* antistoffer som gjenkjenner en ekstracellulær eller intracellulær epitop til et PSCA-protein), for å identifisere midler eller cellulære faktorer som binder til PSCA eller en spesiell strukturell domene derav og i forskjellige terapeutiske og diagnostiske sammenhenger, omfattende men ikke begrenset til diagnostiske forsøk, kreftvaksiner og fremgangsmåter for fremstilling av slike vaksiner.

[0174] Proteiner kodet for av PSCA-genene eller av analoger, homologer eller fragmenter derav har en rekke anvendelser, omfattende men ikke begrenset til dannelsen av antistoffer og ved fremgangsmåter for å identifisere ligander og andre midler og cellulære bestanddeler som binder til et PSCA-genprodukt. Antistoffer indusert mot et PSCA-protein eller fragment derav er anvendelige i diagnostiske og prognostiske forsøk og avbildningsfremgangsmåter i behandlingen av human kreft karakterisert ved ekspresjon av PSCA-protein, slik som de listet opp i tabell I. Slike antistoffer kan uttrykkes intracellulært og anvendes ved fremgangsmåter for behandling av pasienter med slik kreft. PSCA-relaterte nukleinsyrer eller proteiner er også anvendt i dannelsen av HTL- eller CTL-responser.

[0175] Forskjellige immunologiske forsøk anvendelige for deteksjon av PSCA-proteiner blir anvendt, omfattende men ikke begrenset til forskjellige typer radioimmunoassays, enzyumbundet immunosorbent forsøk (ELISA), enzyumbundet immunofluorescent forsøk (ELIFA), immunocytokjemiske fremgangsmåter og lignende. Antistoffer kan være merket og anvendt som immunologiske avbildningsreagenser som er i stand til detektering av PSCA-uttrykkende celler (*f.eks.* i radioscintigrafiske avbildningsfremgangsmåter). PSCA-proteiner er også spesielt anvendelige i dannelsen av kreftvaksiner, som ytterligere beskrevet her.

IV.) PSCA-antistoffer

[0176] Et annet aspekt ved oppfinnelsen tilveiebringer antistoffer som binder til PSCA-beslektede proteiner. Foretrukne antistoffer binder spesifikt til et PSCA-relatert protein og binder ikke (eller binder svakt) til peptider eller proteiner som ikke er PSCA-beslektede proteiner under fysiologiske betingelser. I denne sammenhengen omfatter eksempler på fysiologiske betingelser: 1) fosfatbufret saltløsning; 2) Tris-bufret saltløsning inneholdende 25mM Tris og 150 mM NaCl; eller normal saltløsning (0,9% NaCl); 4) dyreserum slik som humant serum; eller 5) en kombinasjon av hvilken som helst av 1) til og med 4); disse reaksjoner tar fortrinnsvis plass ved pH 7,5, alternativt i et område på pH 7,0 til 8,0 eller alternativt i et område på pH 6,5 til 8,5; også disse reaksjoner tar plass ved en temperatur mellom 4°C og 37°C. For eksempel kan antistoffer som binder PSCA binde PSCA-beslektede proteiner slik som homologene eller analoger derav.

[0177] PSCA-antistoffer ifølge oppfinnelsen er spesielt anvendelige i kreft (se *f.eks.* tabell I) diagnostiske og prognostiske forsøk og avbildningsfremgangsmåter. Tilsvarende er slike antistoffer anvendelige i behandlingen, diagnosen og/eller prognosen av prostata- og annen kreft, til omfanget av PSCA er også uttrykt eller overuttrykt i disse andre kreftene. Videre er intracellulært uttrykte antistoffer (*f.eks.* enkeltkjede antistoffer) terapeutisk anvendelige for

behandling av kreft hvor ekspresjonen av PSCA er involvert, slik som langt fremskredet eller metastatisk prostatakreft eller andre langt fremskredne eller metastatiske krefter.

[0178] Det er også beskrevet forskjellige immunologiske forsøk anvendelige for deteksjonen og kvantifiseringen av PSCA og mutante PSCA-beslektede proteiner. Slike forsøk kan omfatte én eller flere PSCA-antistoffer som er i stand til gjenkjenning og binding av et PSCA-relatert protein, som passende. Disse forsøk blir utført innen forskjellige immunologiske forsøksformater velkjente på området, omfattende men ikke begrenset til forskjellige typer av radioimmunoassayer, enzyumbundet immunosorbent forsøk (ELISA), enzyumbundet immunofluorescent forsøk (ELIFA) og lignende.

[0179] Immunologiske ikke-antistoffforsøk som er beskrevet omfatter også T-celleimmunogenisitetforsøk (hemmende eller stimulerende) så vel som hovedvevsforlikelighetskompleks (MHC)-bindingsforsøk.

[0180] I tillegg er det beskrevet immunologiske avbildningsfremgangsmåter som er i stand til detektering av prostatakreft og annen kreft som uttrykker PSCA som kan omfatte radioscintigrafiske avbildningsfremgangsmåter ved anvendelse av merkete PSCA-antistoffer. Slike forsøk er klinisk anvendelige i deteksjonen, overvåkingen og prognosen av PSCA som uttrykker kreft slik som prostatakreft.

[0181] PSCA-antistoffer er også anvendt ved fremgangsmåter for rensning av et PSCA-relatert protein og for å isolere PSCA-homologer og relaterte molekyler. For eksempel omfatter en fremgangsmåte for rensning av et PSCA-relatert protein innkubering av et PSCA-antistoff, som er koblet til en fast matriks, med et lysat eller annen løsning inneholdende et PSCA-relatert protein ved betingelser som tillater PSCA-antistoffet til å binde til det PSCA-relaterte proteinet; vasking av den faste matriksen for å fjerne urenheter; og eluering av det PSCA-relaterte proteinet fra det koblede antistoffet. Andre anvendelser av PSCA-antistoffer i henhold til oppfinnelsen omfatter dannelse av antiidiotypiske antistoffer som etterligner et PSCA-protein.

[0182] Forskjellige fremgangsmåter for fremstilling av antistoffer er velkjente på området. For eksempel kan antistoffer fremstilles ved immunisering av en egnet pattedyrvert ved anvendelse av et PSCA-relatert protein, peptid eller fragment, i isolert eller immunokonjugert form (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow and Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). I tillegg kan fusjonsproteiner av PSCA også anvendes, slik som et PSCA-GST-fusjonsprotein. I en spesiell utførelsesform blir et GST-fusjonsprotein omfattende alle eller mesteparten av

aminosyresekvensen i figur 1 produsert, deretter anvendt som en immunogen for å danne passende antistoffer. I en annen utførelsesform blir et PSCA-relatert protein syntetisert og anvendt som en immunogen.

[0183] I tillegg blir nakent-DNA-immuniseringsteknikker kjent på området anvendt (med eller uten rensset PSCA-relatert protein eller PSCA-uttrykkende celler) for å danne en immunrespons på det kodede immunogen (for oversikt, se Donnelly *et al.*, 1997, Ann. Rev. Immunol. 15: 617-648).

[0184] Aminosyresekvensen til et PSCA-protein som vist i figur 1 kan analyseres til å velge spesifikke regioner av PSCA-proteinet for dannelselse av antistoffer. For eksempel blir hydrofobisitets- og hydrofilitetsanalyser av en PSCA-aminosyresekvens anvendt for å identifisere hydrofile regioner i PSCA-strukturen. Regioner av et PSCA-protein som viser immunogen struktur, så vel som andre regioner og domener, kan lett identifiseres ved anvendelse av forskjellige andre fremgangsmåter kjent på området, slik som Chou-Fasman-, Garnier-Robson-, Kyte-Doolittle-, Eisenberg-, Karplus-Schultz- eller Jameson-Wolf-analyse. Hydrofilitetsprofiler kan dannes ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Hopp, T.P. and Woods, K.R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828. Hydrofatisitetsprofiler kan dannes ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Kyte, J. and Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105-132. Prosent (%) tilgjengelige residueprofiler kan dannes ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Gjennomsnitts fleksibilitetsprofiler kan dannes ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255. Beta-turnprofiler kan dannes ved anvendelse av fremgangsmåten ifølge Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. Således er hver region identifisert ved hvilken som helst av disse programmene eller fremgangsmåtene innenfor omfanget ifølge foreliggende oppfinnelse. Foretrukne fremgangsmåter for dannelselse av PSCA-antistoffer er videre illustrert ved måter til eksemplene tilveiebrakt her. Fremgangsmåter for fremstilling av et protein eller polypeptid for anvendelse som en immunogen er velkjent på området. Også velkjent på området er fremgangsmåter for fremstilling av immunogene konjugater av et protein med en bærer, slik som BSA, KLH eller andre bærerprotein. I noen tilfeller blir direkte konjugering ved anvendelse av for eksempel karbodiimidreagenser anvendt; i andre tilfeller er linkingsreagenser slik som de levert av Pierce Chemical Co., Rockford, IL effektive. Administrering av en PSCA-immunogen er ofte utført ved injeksjon over en egnet tidsperiode og med anvendelse av en egnet adjuvans, som

er forstått på området. I løpet av immuniseringsprogrammet kan antistofftitere bli tatt for å bestemme adekvatheten til antistoffdannelse.

[0185] PSCA-monoklonale antistoffer kan produseres av forskjellige midler velkjent på området. For eksempel blir immortaliserte cellelinjer som utskiller et ønsket monoklonalt antistoff fremstilt ved anvendelse av standardhybridomteknologien ifølge Kohler og Milstein eller modifikasjoner som immortalisering av antistoffproduserende B-celler, som generelt er kjent. Immortaliserte cellelinjer som utskiller de ønskede antistoffer blir screenet ved immunoassay hvor antigenet er et PSCA-relatert protein. Når den passende immortalisert cellekulturen er identifisert kan cellene bli utvidet og antistoffer produsert enten fra *in vitro*-kulturer eller fra ascitesvæske.

[0186] Antistoffene eller fragmentene ifølge oppfinnelsen kan også produseres ved rekombinante midler. Regioner som spesifikt binder til de ønskede regionene av et PSCA-protein kan også produseres i sammenheng med kimær eller komplementær-bestemmende region (CDR)-transplanterte antistoffer av multippel arts opprinnelse. Humaniserte eller humane PSCA-antistoffer kan også produseres og er foretrukket for anvendelse i terapeutiske sammenhenger. Fremgangsmåter for humanisering av murine og andre ikke-humane antistoffer, ved substituering av én eller flere av de ikke-humant antistoff CDRene for tilsvarende humane antistoffsekvenser er velkjente (se for eksempel Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239: 1534-1536). Se også, Carter *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 og Sims *et al.*, 1993, J. Immunol. 151: 2296.

[0187] Fremgangsmåter for å produsere fullstendige humane monoklonale antistoffer omfatter fagdisplay og transgene fremgangsmåter (for oversikt se Vaughan *et al.*, 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539). Fullstendige humane PSCA-monoklonale antistoffer kan dannes ved anvendelse av kloningsteknologier ved anvendelse av store humane Ig-gen kombinatoriske biblioteker (*dvs.* fagdisplay) (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. (Ed.), Nottingham Academic, pp 45-64 (1993); Burton and Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. *Id.*, pp 65-82). Fullstendige humane PSCA-monoklonale antistoffer kan også produseres ved anvendelse av transgene mus konstruert til å inneholde humane immunoglobulingenloki som beskrevet i PCT-patentsøknad WO98/24893, Kucherlapati and Jakobovits *et al.*, publisert desember 3, 1997 (se også Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest.

Drugs 7(4): 607-614; US-patenter 6.162.963 publisert 19 desember 2000; 6.150.584 publisert 12 november 2000; og 6.114.598 publisert 5 september 2000). Denne fremgangsmåten unngår *in vitro*-manipuleringen nødvendig med fagdisplayteknologi og tilveiebringer effektivt høyaffinitets autentiske humane antistoffer.

[0188] Reaktivitet til PSCA-antistoffer for et PSCA-relatert protein kan etableres ved flere velkjente midler, omfattende Western-blott, immunopresipitering, ELISA og FACS-analyser ved anvendelse av, som passende, PSCA-beslektede proteiner, PSCA-uttrykkende celler eller ekstrakter derav. Et PSCA-antistoff eller fragment derav kan være merket med en detekterbar markør eller konjugert til et annet molekyl. Egnete detekterbare markører omfatter, men er ikke begrenset til, en radioisotop, en fluorescerende forbindelse, en bioluminescerende forbindelse, kjemiluminescerende forbindelse, en metallkjelator eller et enzym. Videre er bispesifikke antistoffer spesifikke for to eller flere PSCA-epitoper dannet ved anvendelse av fremgangsmåter generelt kjent på området. Homodimeriske antistoffer kan også dannes ved kryssbindingsteknikker kjent på området (*f.eks.* Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-2565).

[0189] Det er tilveiebragt monoklonale antistoffer identifisert som Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.20, Ha1-4.121, Ha1-4.37 som ble sent (via Federal Express) til "American Type Culture Collection" (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 04-mai-2005 og utpekte aksjonsnummere henholdsvis PTA-6698 og PTA-6703 og PTA-6699 og PTA-6700 og PTA-6701 og PTA-6702.

V.) PSCA-cellulære immunresponser

[0190] Mekanismen ved hvilken T-celler gjenkjenner antigener er tegnet konturene av. Effektive peptidpitopvaksinesammensetninger ifølge oppfinnelsen fremkaller terapeutiske eller profylaktiske immunresponser i meget brede segmenter av verdenspopulasjonen. For en forståelse av verdien og effektiviteten av sammensetninger ifølge oppfinnelsen som fremkaller cellulære immunresponser er en kort oversikt over immunologirelatert teknologi tilveiebrakt.

[0191] Et kompleks av et HLA-molekyl og et peptidisk antigen virker som liganden gjenkjent av HLA-begrensete T-celler (Buus, S. *et al.*, Cell 47:1071, 1986; Babbitt, B. P. *et al.*, Nature 317:359, 1985; Townsend, A. and Bodmer, H., Annu. Rev. Immunol. 7:601, 1989; Germain, R. N., Annu. Rev. Immunol. 11:403, 1993). Gjennom undersøkelse av enkle aminosyresubstituerte antigenanaloger og sekvenseringen av endogent bundne, naturlig prosesserte peptider er kritiske residuer som svarer til motiver nødvendige for spesifik

binding til HLA-antigenmolekyler identifisert og er angitt i tabell IV (se også *f.eks.* Southwood, *et al.*, J. Immunol. 160:3363, 1998; Rammensee, *et al.*, Immunogenetics 41:178, 1995; Rammensee *et al.*, SYFPEITHI, tilgang via "world wide web" på URL (134.2.96.221/scripts.hlaserver.dll/home.htm); Sette, A. and Sidney, J. Curr. Opin. Immunol. 10:478, 1998; Engelhard, V. H., Curr. Opin. Immunol. 6:13, 1994; Sette, A. and Grey, H. M., Curr. Opin. Immunol. 4:79, 1992; Sinigaglia, F. and Hammer, J. Curr. Biol. 6:52, 1994; Ruppert *et al.*, Cell 74:929-937, 1993; Kondo *et al.*, J. Immunol. 155:4307-4312, 1995; Sidney *et al.*, J. Immunol. 157:3480-3490, 1996; Sidney *et al.*, Human Immunol. 45:79-93, 1996; Sette, A. and Sidney, J. Immunogenetics 1999 Nov; 50(3-4):201-12, Review).

[0192] Videre har røntgenkrystallografiske analyser av HLA-peptidkomplekser avslørt lommer innen peptidbindingskløft/-gropen til HLA-molekyler som passer til, i en allelsesifikk modus, residuer med opphav i peptidligander; disse residuene på sin side bestemmer HLA-bindingskapasiteten til peptidene hvor de er til stede. (se *f.eks.* Madden, D.R. Annu. Rev. Immunol. 13:587, 1995; Smith, *et al.*, Immunity 4:203, 1996; Fremont *et al.*, Immunity 8:305, 1998; Stern *et al.*, Structure 2:245, 1994; Jones, E.Y. Curr. Opin. Immunol. 9:75, 1997; Brown, J. H. *et al.*, Nature 364:33, 1993; Guo, H. C. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8053, 1993; Guo, H. C. *et al.*, Nature 360:364, 1992; Silver, M. L. *et al.*, Nature 360:367, 1992; Matsumura, M. *et al.*, Science 257:927, 1992; Madden *et al.*, Cell 70:1035, 1992; Fremont, D. H. *et al.*, Science 257:919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. and Wiley, D. C., J. Mol. Biol. 219:277, 1991.)

[0193] Følgelig tillater definisjonen av klasse I- og klasse II-allelsesifikk HLA-bindingsmotiver eller klasse I- eller klasse II-supermotiver identifikasjon av regioner innen et protein som er i samsvar med binding til spesielt HLA-antigen(er).

[0194] Således er ved en fremgangsmåte for HLA-motiv identifikasjonskandidater for epitopbaserte vaksiner identifisert; slike kandidater kan videre være evaluert ved HLA-peptidbindingsforsøk for å bestemme bindingsaffinitet og/eller tidsperioden for assosiering av epitopen og dens tilsvarende HLA-molekyl. Ytterligere bekreftende arbeid kan utføres for å velge, blant disse vaksinekandidater, epitoper med foretrukne karakteristika når det gjelder populasjonsdekning og/eller immunogenisitet.

[0195] Forskjellige strategier kan anvendes for å bedømme cellulær immunogenisitet omfattende:

1) Evaluering av primære T-cellekulturer fra normale individer (se *f.eks.*

Wentworth, P. A. *et al.*, Mol. Immunol. 32:603, 1995; Celis, E. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 91:2105, 1994; Tsai, V. et al., J. Immunol. 158:1796, 1997; Kawashima, I. et al., Human Immunol. 59:1, 1998). Denne prosedyren involverer stimulering av perifere blodlymfocytter (PBL) fra normale pasienter med et testpeptid i nærværet av antigenpresenterende celler in vitro over en periode på mange uker. T-celler spesifikke for peptidet blir aktivert i løpet av denne tiden og blir detektert ved anvendelse av f.eks. et lymfokin- eller 51Cr-frigjøringsforsøk som involverer peptidsensibiliserte målceller.

2) Immunisering av HLA-transgene mus (se f.eks. Wentworth, P. A. et al., J. Immunol. 26:97, 1996; Wentworth, P. A. et al., Int. Immunol. 8:651, 1996; Alexander, J. et al., J. Immunol. 159:4753, 1997). For eksempel i slike fremgangsmåter blir peptider i ufullstendig Freund's adjuvans administrert subkutant til HLA-transgene mus. Mange uker etter immunisering fjernes miltceller og dyrkes in vitro i nærværet av testpeptid i omtrent én uke. Peptidspesifikke T-celler blir detektert ved anvendelse av f.eks. et 51Cr-frigjøringsforsøk som involverer peptidsensibiliserte målceller og målceller som uttrykker endogent dannet antigen.

3) Demonstrasjon av gjenoppvekkede T-celleresponser fra immune individer som enten er effektivt vaksinerte og/eller fra kroniske syke pasienter (se f.eks. Rehmann, B. et al., J. Exp. Med. 181:1047, 1995; Doolan, D. L. et al., Immunity 7:97, 1997; Bertoni, R. et al., J. Clin. Invest. 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. et al., J. Immunol. 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. et al., J. Virol. 71:6011, 1997). Følgelig blir gjenoppvekkede responser detekterte ved dyrking av PBL fra pasienter som er eksponert for antigenet på grunn av sykdom og således har dannet en immunrespons "naturlig" eller fra pasienter som ble vaksinerte mot antigenet. PBL fra pasienter blir dyrket in vitro i 1-2 uker i nærværet av testpeptid pluss antigenpresenterende celler (APC) for å tillate aktivisering av "hukommelse" T-celler, sammenlignet med "naturlige" T-celler. På slutten av dyrkningsperioden blir T-celleaktivitet detektert ved anvendelse av forsøk omfattende 51Cr-frigjøring som involverer peptidsensibiliserte mål, T-celleproliferasjon eller lymfokinfrigjøring.

VI.) PSCA-transgene dyr

[0196] Nukleinsyrer som koder for et PSCA-relatert protein kan også anvendes for å danne enten transgene dyr eller "knock out"-dyr som på sin side er anvendelige i utviklingen og screeningen av terapeutisk anvendelige reagenser. I henhold til etablerte teknikker kan cDNA som koder for PSCA anvendes for å klonere genomisk DNA som koder for PSCA. De klonerte genomiske sekvensene kan deretter anvendes for å danne transgene dyr inneholdende celler som uttrykker DNA som koder for PSCA. Fremgangsmåter for dannelse av transgene

dyr, spesielt dyr slik som mus eller rotter, har blitt konvensjonelle på området og er beskrevet for eksempel i US-patent nr. 4.736.866 publisert 12 April 1988 og 4.870.009 publisert 26 september 1989. Typisk ville spesielle celler være målrettete for PSCA-transgeninnføring med vevsspesifikk enhancere.

[0197] Transgene dyr som omfatter en kopi av et transgen som koder for PSCA kan anvendes for å undersøke effekten til øket ekspresjon av DNA som koder for PSCA. Slike dyr kan anvendes som testdyr for reagenser antatt å tildele beskyttelse fra for eksempel patologiske lidelser forbundet med dens overekspressjon. I henhold til dette aspektet ifølge oppfinnelsen blir et dyr behandlet med et reagens, og en redusert forekomst av en patologisk lidelse, sammenlignet med ubehandlede dyr som bærer transgenet, ville indikerer et potensiale for terapeutisk intervensjon av det patologiske forholdet.

[0198] Alternativt kan ikke-humane homologer av PSCA anvendes for å konstruere et PSCA “knock out”-dyr som har et defekt eller endret gen som koder for PSCA som et resultat av homolog rekombinering mellom det endogene genet som koder for PSCA og endret genomisk DNA som koder for PSCA innført i en embryonisk celle til dyret. For eksempel kan cDNA som koder for PSCA anvendes for å klonе genomisk DNA som koder for PSCA i henhold til etablerte teknikker. En del av det genomiske DNAet som koder for PSCA kan deleteres eller erstattes med en annen gen, slik som et gen som koder for en selekterbar markør som kan anvendes for å overvåke integrering. Typisk er mange kilobaser av uendret flankerende DNA (både ved 5'- og 3'-endene) omfattet i vektoren (se *f.eks.* Thomas and Capecchi, Cell, 51:503 (1987) for en beskrivelse av homologe rekombineringsvektorer). Vektoren blir innført i en embryonisk stamcellelinje (*f.eks.* ved elektroporering) og celler hvor det innførte DNAet har homologt rekombinert med det endogene DNAet er valgt (se *f.eks.* Li *et al.*, Cell, 69:915 (1992)). De valgte cellene blir deretter injisert i en blastocyst til et dyr (*f.eks.* en mus eller rotte) for å danne aggregeringskimærer (se *f.eks.* Bradley, in Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152). Et kimært embryo kan deretter bli implantert inn i en egnet pseudogavid kvinnelig fosterdyr og embryoet brakt til termin for å skape et “knock out”-dyr. Avkom som bærer det homologt rekombinerte DNAet i deres germ celler kan identifiseres ved standardteknikker og anvendes til å ale opp dyr hvor alle celler til dyret inneholder det homologt rekombinerte DNAet. “Knock out”-dyr kan karakteriseres for eksempel for deres evne til å forsvare mot visse patologiske tilstander eller for deres utvikling av patologiske tilstander på grunn av fravær av et PSCA-polypeptid.

VII.) Fremgangsmåter for deteksjonen av PSCA

[0199] Det er mulig å detektere PSCA-polynukleotider og PSCA-beslektede proteiner, så vel som fremgangsmåter for å identifisere en celle som uttrykker PSCA. Ekspresjonsprofilen av PSCA gjør det til en diagnostisk markør for metastasert sykdom. Følgelig tilveiebringer statusen til PSCA-genprodukter informasjon anvendelige for å forutsi en rekke faktorer omfattende mottagelighet for langt fremskredet trinns sykdom, progresjonshastighet og/eller tumoraggressivitet. Som beskrevet i detalj her kan statusen til PSCA-genprodukter i pasientprøver analyseres ved et mangfold av protokoller som er velkjente på området omfattende immunohistokjemisk analyse, mangfoldet av Northern-blottingsteknikker omfattende in situ-hybridisering, RT-PCR-analyse (for eksempel på laserfangete mikrodisekerte prøver), Western-blott-analyse og vevsarray-analyse.

[0200] Det er følgelig mulig med deteksjonen av PSCA-polynukleotider i en biologisk prøve, slik som serum, ben, prostata og andre vev, urin, sædvæske, cellefremstillinger og lignende. Detekterbare PSCA-polynukleotider omfatter for eksempel et PSCA-gen eller fragment derav, PSCA-mRNA, alternativ spleisevariant av PSCA-mRNAer og rekombinante DNA- eller RNA-molekyler som inneholder et PSCA-polynukleotid. Flere fremgangsmåter for å amplifisere og/eller detektere tilstedeværelsen av PSCA-polynukleotider er velkjente på området og kan anvendes i praksisen av dette aspektet ifølge oppfinnelsen.

[0201] Fremgangsmåten for detektering av en PSCA-mRNA i en biologisk prøve kan omfatte å produsere cDNA fra prøven ved reverstranskripsjon ved anvendelse av minst én primer; amplifisere cDNAet så produsert ved anvendelse av PSCA-polynukleotider som sense- og antisenseprimere til å amplifisere PSCA-cDNAer deri; og detektering av tilstedeværelsen av det amplifiserte PSCA-cDNAet. Eventuelt kan sekvensen av det amplifiserte PSCA-cDNAet bestemmes.

[0202] Fremgangsmåten for detektering av et PSCA-gen i en biologisk prøve kan omfatte først isolering av genomisk DNA fra prøven; amplifisering av det isolerte genomiske DNAet ved anvendelse av PSCA-polynukleotider som sense- og antisenseprimere; og detektering av tilstedeværelsen av det amplifiserte PSCA-genet. Hvilket som helst antall av passende sense- og antisenseprobekombinasjoner kan utformes fra en PSCA-nukleotidsekvens (se *f.eks.* figur 1) og anvendes for dette formålet.

[0203] Forsøk for detektering av tilstedeværelsen til et PSCA-protein i en vevs- eller annen biologisk prøve slik som serum, sædvæske, ben, prostata, urin, cellefremstillinger og lignende kan utføres. Fremgangsmåter for å detektere et PSCA-relatert protein er også

velkjente og omfatter for eksempel immunopresipitering, immunohistokjemisk analyse, Western-blott-analyse, molekylære bindingsforsøk, ELISA, ELIFA og lignende. For eksempel omfatter en fremgangsmåte for detektering av tilstedeværelsen av et PSCA-relatert protein i en biologisk prøve først å bringe prøven i kontakt med et PSCA-antistoff, et PSCA-reaktivt fragment derav eller et rekombinant protein inneholdende en antigenbindende region til et PSCA-antistoff, og deretter detektering av bindingen til PSCA-relatert protein i prøven.

[0204] Fremgangsmåter for å identifisere en celle som uttrykker PSCA er også beskrevet. I én utførelsesform omfatter et forsøk for å identifisere en celle som uttrykker et PSCA-gen detektering av tilstedeværelsen av PSCA-mRNA i cellen. Fremgangsmåter for deteksjon av spesielle mRNAer i celler er velkjente og omfatter for eksempel hybridiseringsforsøk ved anvendelse av komplementære DNA-prober (slik som in situ-hybridisering ved anvendelse av merkete PSCA-riboprober, Northern-blott og relaterte teknikker) og forskjellige nukleinsyreamplifiseringsforsøk (slik som RT-PCR ved anvendelse av komplementære primere spesifikke for PSCA og andre amplifiseringstype deteksjonsfremgangsmåter, slik som for eksempel forgrenet DNA, SISBA, TMA og lignende). Alternativt omfatter et forsøk for å identifisere en celle som uttrykker et PSCA-gen detektering av tilstedeværelsen av PSCA-relatert protein i cellen eller utskilt fra cellen. Forskjellige fremgangsmåter for deteksjonen av proteiner er velkjente på området og blir anvendt for deteksjonen av PSCA-beslektede proteiner og celler som uttrykker PSCA-beslektede proteiner.

[0205] PSCA-ekspresjonsanalyse er også anvendelige som et verktøy for å identifisere og evaluere midler som modulerer PSCA-genekspresjon. For eksempel er PSCA-ekspresjon betydelig oppregulert i prostatakreft og er uttrykt i kreft i vevet listet opp i tabell I. Identifikasjon av et molekyl eller biologisk middel som hemmer PSCA-ekspresjon eller overekspresjon i kreftceller er av terapeutisk verdi. For eksempel kan et slikt middel identifiseres ved anvendelse av en screening som kvantifiserer PSCA-ekspresjon ved RT-PCR, nukleinsyrehybridisering eller antistoffbinding.

VIII.) Fremgangsmåter for overvåkning av statusen til PSCA-relaterte gener og deres produkter

[0206] Onkogenese er kjent for å være en flertrinnsprosess hvor cellulær vekst progressivt blir dysregulert og celler utvikler seg fra en normal fysiologisk tilstand til prekanserøse og deretter kanserøse tilstander (se *f.eks.* Alers *et al.*, Lab Invest. 77(5): 437-438 (1997) og Isaacs *et al.*, Cancer Surv. 23: 19-32 (1995)). I denne sammenhengen tillater undersøkelse av en biologisk prøve for bevis på dysregulert cellevekst (slik som avvikende PSCA-ekspresjon i

kreft) tidlig deteksjon av slik avvikende fysiologi, før en patologisk tilstand slik som kreft har utviklet seg til et trinn hvor terapeutiske alternativer er mer begrensede og eller prognosen er verre. I slike undersøkelser kan statusen til PSCA i en interessant biologisk prøve sammenlignes for eksempel med statusen til PSCA i en tilsvarende normal prøve (*f.eks.* en prøve fra det individet eller alternativt et annet individ som ikke blir påvirket av en patologi). En endring i statusen til PSCA i den biologiske prøven (sammenlignet med den normale prøven) tilveiebringer bevis på dysregulert cellulær vekst. I tillegg til å anvende en biologisk prøve som ikke blir påvirket av en patologi som en normal prøve kan én også anvende en forutbestemt normativ verdi slik som et forutbestemt normalnivå av mRNA-ekspressjon (se *f.eks.* Grever *et al.*, J. Comp. Neurol. 1996 Dec 9; 376(2): 306-14 og US-patent nr. 5.837.501) for å sammenligne PSCA-status i en prøve.

[0207] Betegnelsen "status" i denne sammenhengen blir anvendt i henhold til dens områdeaksepterte betydning og angir forholdet eller tilstanden til et gen og dens produkter. Typisk anvender fagfolk flere parametere for å bedømme forholdet eller tilstanden til et gen og dens produkter. Disse omfatter, men er ikke begrenset til, lokalisasjonen av uttrykte genprodukter (omfattende lokalisasjonen av PSCA-uttrykkende celler) så vel som nivået og biologisk aktiviteten til uttrykte genprodukter (slik som PSCA-mRNA, polynukleotider og polypeptider). Typisk omfatter en endring i statusen til PSCA en forandring i lokalisasjonen til PSCA og/eller PSCA-uttrykkende celler og/eller en økning i PSCA-mRNA og/eller proteinekspressjon.

[0208] PSCA-status i en prøve kan analyseres ved flere midler velkjente på området, omfattende uten begrensning immunohistokjemisk analyse, in situ-hybridisering, RT-PCR-analyse på laserfangete mikrodisekerte prøver, Western-blott-analyse og vevsarrayanalyse. Typisk er protokoller for evaluering av statusen til et PSCA-gen og genprodukter funnet for eksempel i Ausubel *et al.* eds., 1995, Current Protocols in Molecular Biology, Units 2 (Northern-blotting), 4 (Southern-blotting), 15 (immunoblotting) og 18 (PCR-analyse). Således er statusen til PSCA i en biologisk prøve evaluert ved forskjellige fremgangsmåter anvendt av fagfolk omfattende, men ikke begrenset til genomisk Southern-analyse (for å eksaminere for eksempel forurenligheter i et PSCA-gen), Northern-analyse og/eller PCR-analyse av PSCA-mRNA (for å eksaminere for eksempel endringer i polynukleotidsekvensene eller ekspressionsnivåene til PSCA-mRNAer) og Western- og/eller immunohistokjemisk analyse (for å eksaminere for eksempel endringer i polypeptidsekvenser, endringer i polypeptidlokalisering innen en prøve, endringer i ekspressionsnivåer til PSCA-proteiner

og/eller assosiasjoner av PSCA-proteiner med polypeptidbindingspartnere). Detekterbare PSCA-polynukleotider omfatter for eksempel et PSCA-gen eller fragment derav, PSCA-mRNA, alternative spleisevarianter, PSCA-mRNAer og rekombinant DNA- eller RNA-molekyler inneholdende et PSCA-polynukleotid.

[0209] Ekspresjonsprofilen av PSCA gjør det til en diagnostisk markør for lokal og/eller metastasert sykdom og tilveiebringer informasjon på veksten eller onkogeniske potensiale til en biologisk prøve. Spesielt tilveiebringer statusen til PSCA informasjon anvendelig for å forutsi mottagelighet for spesielle sykdomsstadier, progresjon og/eller tumoraggressivitet. Oppfinnelsen tilveiebringer fremgangsmåter og forsøk for å bestemme PSCA-status og diagnoser av kreft som uttrykker PSCA, slik som kreft i vevet listet opp i tabell I. For eksempel fordi PSCA-mRNA er så høyt uttrykt i prostata og annen kreft i forhold til normalt prostatavev kan forsøk som evaluerer nivåene av PSCA-mRNA-transkripter eller proteiner i en biologisk prøve anvendes for å diagnostisere en sykdom forbundet med PSCA-dysregulering og kan tilveiebringe prognostisk informasjon anvendelig i definering av passende terapeutiske alternativer.

[0210] Uttrykket status til PSCA tilveiebringer informasjon omfattende tilstedeværelsen, trinnet og lokalisasjonen av dysplastiske, prekanserøse og kanserøse celler, å forutsi mottagelighet for forskjellige trinn av sykdom og/eller for måling av tumoraggressivitet. Videre gjør ekspresjonsprofilen det anvendelig som en avbildningsreagens for metastasert sykdom. Følgelig angår et aspekt ifølge oppfinnelsen de forskjellige molekyllære prognostiske og diagnostiske fremgangsmåter for undersøkelse av statusen til PSCA i biologiske prøver slik som de fra individer som lider av eller mistenkt for å lide av en patologi karakterisert ved dysregulert cellulær vekst, slik som kreft.

[0211] Som beskrevet ovenfor kan statusen til PSCA i en biologisk prøve bli undersøkt ved flere velkjente prosedyrer på området. For eksempel kan statusen til PSCA i en biologisk prøve tatt fra en spesifikk lokalisasjon i kroppen bli undersøkt ved evaluering av prøven for nærværet eller fraværet av PSCA-uttrykkende celler (*f.eks.* de som uttrykker PSCA-mRNAer eller proteiner). Denne undersøkelsen kan tilveiebringe bevis på dysregulert cellulær vekst, for eksempel når PSCA-uttrykkende celler er funnet i en biologisk prøve som ikke normalt inneholder slike celler (slik som en lymfeknute), fordi slike endringer i statusen til PSCA i en biologisk prøve ofte er forbundet med dysregulert cellulær vekst. Spesifikt er én indikator for dysregulert cellulær vekst metastasene til kreftceller fra et opprinnelsesorgan (slik som prostata) til et forskjellig område i kroppen (slik som en lymfeknute). I denne sammenhengen

er bevis på dysregulert cellulær vekst viktig for eksempel fordi okkulte lymfeknutemetastaser kan detekteres i en vesentlig del av pasienter med prostatakreft og slike metastaser er forbundet med kjente prediktorer for sykdomsprogresjon (se *f.eks.* Murphy *et al.*, Prostate 42(4): 315-317 (2000); Su *et al.*, Semin. Surg. Oncol. 18(1): 17-28 (2000) og Freeman *et al.*, J Urol 1995 Aug 154(2 Pt 1):474-8).

[0212] Det er mulig å overvåke PSCA-genprodukter ved å bestemme statusen til PSCA-genprodukter uttrykt av celler fra et individ mistenkt for å ha en sykdom forbundet med dysregulert cellevekst (slik som hyperplasi eller kreft) og deretter sammenligning av statusen så bestemt mot statusen til PSCA-genprodukter i en tilsvarende normal prøve. Tilstedeværelsen av avvikende PSCA-genprodukter i testprøven i forhold til den normale prøven tilveiebringer en indikasjon på tilstedeværelsen av dysregulert cellevekst i cellene til individet.

[0213] Det er beskrevet forsøk anvendelige for bestemmelse av tilstedeværelsen av kreft i et individ, omfattende detektering av en betydelig økning i PSCA-mRNA eller proteinekspresjon i en testcelle eller vevsprøve i forhold til ekspresjonsnivåer i den tilsvarende normale cellen eller vevet. Tilstedeværelsen av PSCA-mRNA kan for eksempel være evaluert i vev omfattende men ikke begrenset til de listet opp i tabell I. Tilstedeværelsen av betydelig PSCA-ekspresjon i hvilket som helst av disse vevene er anvendelig for å indikere fremkomsten, tilstedeværelsen og/eller alvorlighetsgraden av en kreft, siden de tilsvarende normale vevene ikke uttrykker PSCA-mRNA eller uttrykker det ved lavere nivåer.

[0214] I en relatert utførelsesform blir PSCA-status bestemt på proteinnivået heller enn på nukleinsyrenivået. For eksempel omfatter en slik fremgangsmåte bestemmelse av nivået til PSCA-protein uttrykt av celler i en testvevsprøve og sammenligning av nivået så bestemt til nivået av PSCA uttrykt i en tilsvarende normal prøve. I én utførelsesform er tilstedeværelsen av PSCA-protein evaluert for eksempel ved anvendelse av immunohistokjemiske fremgangsmåter. PSCA-antistoffer eller bindingspartnere som er i stand til detektering av PSCA-proteinekspresjon blir anvendt i en rekke forsøksformater velkjente på området for dette formålet.

[0215] I en ytterligere utførelsesform kan én evaluere statusen til PSCA-nukleotid og aminosyresekvenser i en biologisk prøve for å identifisere foruroligheter i strukturen av disse molekylene. Disse forurolighetene kan omfatte insersjoner, delesjoner, substitusjoner og lignende. Slike evalueringer er anvendelige fordi foruroligheter i nukleotid- og aminosyresekvensene er observert i et stort antall proteiner forbundet med en vekstdysregulert

fenotype (se *f.eks.* Marrogi *et al.*, 1999, J. Cutan. Pathol. 26(8):369-378). For eksempel kan en mutasjon i sekvensen av PSCA være indikativ for tilstedeværelsen eller fremmingen av en tumor. Slike forsøk har derfor diagnostisk og forutsagt verdi hvor en mutasjon i PSCA indikerer et potensielt tap av funksjon eller økning i tumorvekst.

[0216] En rekke forsøk for observering av foruroligheter i nukleotid- og aminosyresekvenser er velkjente på området. For eksempel er størrelsen og strukturen av nukleinsyre- eller aminosyresekvenser til PSCA-genprodukter observert ved Northern-, Southern-, Western-, PCR- og DNA-sekvenseringsprotokoller beskrevet her. I tillegg er andre fremgangsmåter for observering av foruroligheter i nukleotid- og aminosyresekvenser slik som enkeltrådet konformasjonspolymorfismeanalyse velkjent på området (se *f.eks.* US-patent nr. 5.382.510 publisert 7 september 1999 og 5.952.170 publisert 17 januar 1995).

[0217] I tillegg kan én eksaminere metyleringsstatusen til et PSCA-gen i en biologisk prøve. Avvikende demetylering og/eller hypermetylering av CpG-øyer i gen-5'-regulatoriske regioner forekommer ofte i immortaliserte og transformerte celler og kan resultere i endret ekspresjon av forskjellige gener. For eksempel promoterhypermetylering av pi-klassen av glutathion-S-transferase (et protein uttrykt i normal prostata, men ikke uttrykt i >90% av prostatakarsinomer) synes å permanent gjøre transkripsjon av dette genet stum og er den oftest detektert genomisk endringen i prostatakarsinomer (De Marzo *et al.*, Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)). I tillegg er denne endringen til stede i minst 70% av tilfeller av høygrads prostatisk intraepiteliell neoplasie (PIN) (Brooks *et al.*, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7:531-536). I et annet eksempel er ekspresjon av det LAGE-I-tumorspesifikke genet (som ikke er uttrykt i normal prostata men er uttrykt i 25-50% av prostatakrefte) induisert ved deoksyazacytidin i lymfoblastoide celler, hvilket indikerer at tumoral ekspresjon skyldes demetylering (Lethe *et al.*, Int. J. Cancer 76(6): 903-908 (1998)). En rekke forsøk på undersøkelse av metyleringsstatus til et gen er velkjente på området. For eksempel kan én anvende, i Southern-hybridiseringsangrepmåter, metyleringssensitive restriksjonsenzymmer som ikke kan spalte sekvenser som inneholder metylerte CpG-seter for å bedømme metyleringsstatusen til CpG-øyer. I tillegg kan MSP (metyleringsspesifikk-PCR) raskt profilere metyleringsstatusen til alle CpG-setene til stede i en CpG-øy for et gitt gen. Denne prosedyren involverer innledende modifikasjon av DNA med natriumbisulfitt (som vil omdanne alle umetylerte cytosiner til uracil) fulgt av amplifisering ved anvendelse av primere spesifikke for metylert versus umetylert DNA. Protokoller som involverer

metyleringsinterferens kan også bli funnet for eksempel i *Current Protocols in Molecular Biology*, Unit 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995.

[0218] Genamplifisering er en ytterligere fremgangsmåte for å fastsette statusen til PSCA. Genamplifisering blir målt i en prøve direkte, for eksempel ved konvensjonell Southern-blotting eller Northern-blotting for å kvantifisere transkripsjonen av mRNA (Thomas, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:5201-5205), dotblotting (DNA-analyse) eller in situ-hybridisering, ved anvendelse av en passende merket probe, basert på sekvensene tilveiebrakt her. Alternativt blir antistoffer anvendt som gjenkjenner spesifikke duplekser, omfattende DNA-duplekser, RNA-duplekser og DNA-RNA-hybridduplekser eller DNA-proteinduplekser. Antistoffene på sin side er merket og forsøket utført hvor duplekseren er bundet til en overflate, slik at ved dannelsen av dupleks på overflaten kan tilstedeværelsen av antistoff bundet til duplekseren detekteres.

[0219] Biopsivev eller perifert blod kan bli hensiktsmessig undersøkt for tilstedeværelsen av kreftceller ved anvendelse av for eksempel Northern-, dotblott- eller RT-PCR-analyse for å detektere PSCA-ekspresjon. Tilstedeværelsen av RT-PCR-amplifiserbart PSCA-mRNA tilveiebringer en indikasjon på tilstedeværelsen av kreft. RT-PCR-forsøk er velkjente på området. RT-PCR-deteksjonsforsøk for tumorceller i perifert blod er for tiden blitt evaluert for anvendelse i diagnosen og behandlingen av flere humane faste tumorer. På prostatakreftefeltet omfatter disse RT-PCR-forsøksdeteksjon av celler som uttrykker PSA og PSM (Verkaik *et al.*, 1997, *Urol. Res.* 25:373-384; Ghossein *et al.*, 1995, *J. Clin. Oncol.* 13:1195-2000; Heston *et al.*, 1995, *Clin. Chem.* 41:1687-1688).

[0220] Det er mulig å vurdere mottageligheten som et individ har for å utvikle kreft. I én utførelsesform omfatter en fremgangsmåte for å forutsi mottagelighet for kreft detektering av PSCA-mRNA eller PSCA-protein i en vevsprøve, dens tilstedeværelse som indikerer mottagelighet for kreft, hvor graden av PSCA-mRNA-ekspresjon korrelerer med graden av mottagelighet. I en spesifikk utførelsesform er tilstedeværelsen av PSCA i prostata eller andre vev undersøkt, med tilstedeværelsen av PSCA i prøven som tilveiebringer en indikasjon på prostatakreftmottagelighet (eller fremkomsten eller eksistensen av en prostatatumor). Tilsvarende kan én evaluere integriteten av PSCA-nukleotid og aminosyresekvenser i en biologisk prøve for å identifisere foruroligheter i strukturen til disse molekylerne slik som insersjoner, delesjoner, substitusjoner og lignende. Tilstedeværelsen av én eller flere foruroligheter i PSCA-genprodukter i prøven er en indikasjon på kreftmottagelighet (eller fremkomsten eller eksistensen av en tumor).

[0221] Fremgangsmåter for måling av tumoraggressivitet er videre mulig. I én utførelsesform omfatter en fremgangsmåte for måling av aggressivitet av en tumor bestemmelse av nivået til PSCA-mRNA eller PSCA-protein uttrykt av tumorceller, sammenligning av nivået så bestemt til nivået av PSCA-mRNA eller PSCA-protein uttrykt i et tilsvarende normalt vev tatt fra samme individ eller en normal vevsreferanseprøve, hvor graden av PSCA-mRNA- eller PSCA-proteinekspresjon i tumorprøven i forhold til den normale prøven indikerer graden av aggressivitet. I en spesifikk utførelsesform er aggressivitet av en tumor evaluert ved å bestemme omfanget til hvilken PSCA som er uttrykt i tumorcellene, med høyere ekspresjonsnivåer indikerende mer aggressive tumorer. En annen utførelsesform er evalueringen av integriteten til PSCA-nukleotid og aminosyresekvenser i en biologisk prøve, for å identifisere foruroligheter i strukturen av disse molekylene slik som insersjoner, delesjoner, substitusjoner og lignende. Tilstedeværelsen av én eller flere foruroligheter indikerer mer aggressive tumorer.

[0222] En annen utførelsesform angår fremgangsmåter for observering av progresjonen av en ondartet sykdom i et individ over tid. I én utførelsesform omfatter fremgangsmåter for observering av progresjonen av en ondartet sykdom i et individ over tid bestemmelse av nivået til PSCA-mRNA eller PSCA-protein uttrykt av celler i en prøve av tumoren, sammenligning av nivået så bestemt til nivået av PSCA-mRNA eller PSCA-protein uttrykt i en ekvivalent vevsprøve tatt fra samme individ på en ulik tid, hvor graden av PSCA-mRNA- eller PSCA-proteinekspresjon i tumorprøven over tid tilveiebringer informasjon om kreftprogresjonen. I en spesifikk utførelsesform er kreftprogresjonen evaluert ved å bestemme PSCA-ekspresjon i tumorcellene over tid, hvor øket ekspresjon over tid indikerer en progresjon av kreften. En kan også evaluere integriteten av PSCA-nukleotid og aminosyresekvenser i en biologisk prøve for å identifisere foruroligheter i strukturen av disse molekylene slik som insersjoner, delesjoner, substitusjoner og lignende, hvor tilstedeværelsen av én eller flere foruroligheter indikerer en progresjon av kreften.

[0223] De ovenfor diagnostiske angrepmåtene kan kombineres med hvilken som helst éne av en rekke prognostiske og diagnostiske protokoller kjent på området. For eksempel angår en annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen fremgangsmåter for observering av en koincidens mellom ekspresjonen av PSCA-gen og PSCA-genprodukter (eller foruroligheter i PSCA-gen og PSCA-genprodukter) og en faktor som er forbundet med ondartet sykdom, som et middel for diagnoser og prognostisering av statusen til en vevsprøve. En rekke faktorer forbundet med ondartet sykdom kan anvendes, slik som genekspresjon forbundet med

ondartet sykdom (*f.eks.* PSA-, PSCA- og PSM-ekspresjon for prostatakreft etc.) så vel som grove cytologiske observasjoner (se *f.eks.* 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). Fremgangsmåter for observering av en koinsidens mellom ekspresjon av PSCA-gen og PSCA-genprodukter (eller foruroligheter i PSCA-gen og PSCA-genprodukter) og en annen faktor som er forbundet med ondartet sykdom er anvendelige, for eksempel fordi tilstedeværelsen av et sett av spesifikke faktorer som faller sammen med sykdom som tilveiebringer viktig informasjon for diagnoser og prognostisering av statusen til en vevsprøve.

[0224] I én utførelsesform medfører fremgangsmåter for observering av en koinsidens mellom ekspresjonen av PSCA-gen og PSCA-genprodukter (eller foruroligheter i PSCA-gen og PSCA-genprodukter) og en annen faktor forbundet med ondartet sykdom detektering av overekspresjonen av PSCA-mRNA eller protein i en vevsprøve, detektering av overekspresjonen av PSA-mRNA eller protein i en vevsprøve (eller PSCA- eller PSM-ekspresjon) og observering av en koinsidens av PSCA-mRNA eller protein og PSA-mRNA eller proteinoverekspresjon (eller PSCA- eller PSM-ekspresjon). I en spesifikk utførelsesform er ekspresjonen av PSCA- og PSA-mRNA i prostatavev undersøkt, hvor koinsidensen av PSCA- og PSA-mRNA-overekspresjon i prøven indikerer eksistensen av prostatakreft, prostatakreftmottagelighet eller fremkomsten eller statusen av en prostatatumor.

[0225] Fremgangsmåter for å detektere og kvantifisere ekspresjonen av PSCA-mRNA eller protein er beskrevet her og standard nukleinsyre- og proteindeteksjon og kvantifiseringsteknologier er velkjente på området. Standardfremgangsmåter for deteksjonen og kvantifiseringen av PSCA-mRNA omfatter in situ-hybridisering ved anvendelse av merket PSCA-riboprober, Northern-blott og relaterte teknikker ved anvendelse av PSCA-polynukleotidprober, RT-PCR-analyse ved anvendelse av primere spesifikke for PSCA og andre amplifiseringstype deteksjonsfremgangsmåter, slik som for eksempel forgrenet DNA, SISBA, TMA og lignende. I en spesifikk utførelsesform blir semikvantitativ RT-PCR anvendt for å detektere og kvantifisere PSCA-mRNA-ekspresjon. Hvilket som helst antall av primere som er i stand til å amplifisere PSCA kan anvendes for dette formålet, omfattende men ikke begrenset til, de forskjellige primersettene spesifikt beskrevet her. I en spesifikk utførelsesform kan polyklonale eller monoklonale antistoffer spesifikt reaktive med villtype PSCA-proteinet anvendes i et immunohistokjemisk forsøk av biopsivev.

IX.) Identifikasjon av molekyler som interagerer med PSCA

[0226] PSCA-proteinet og nukleinsyresekvensene beskrevet her tillater en fagmann å identifisere proteiner, små molekyler og andre midler som interagerer med PSCA, så vel som reaksjonsveier aktivert av PSCA via hvilken som helst éne av en rekke områdeaksepterte protokoller. For eksempel kan én anvende én av de såkalte interaksjonfellingssystemene (også referert til som “tohybridforsøket”). I slike systemer interagerer molekyler og rekonstituerer en transkripsjonsfaktor som dirigerer ekspresjon av et rapportørgen, hvorefter ekspresjonen av rapportørgenet er undersøkt. Andre systemer identifiserer protein-proteininteraksjoner *in vivo* gjennom rekonstituering av en eukaryot transkripsjonell aktivator, se *f.eks.* US-patent nr. 5.955.280 publisert 21 september 1999, 5.925.523 publisert 20 juli 1999, 5.846.722 publisert 8 desember 1998 og 6.004.746 publisert 21 desember 1999. Algoritmer er også tilgjengelige på området for genombaserte forutsigelser av proteinfunksjon (se *f.eks.* Marcotte, *et al.*, Nature 402: 4 november 1999, 83-86).

[0227] Alternativt kan én screene peptidbiblioteker for å identifisere molekyler som interagerer med PSCA-proteinsekvenser. I slike fremgangsmåter er peptider som binder til PSCA identifisert fra screeningsbiblioteker som koder for en tilfeldig eller kontrollert samling av aminosyrer. Peptider kodet for av bibliotekene er uttrykt som fusjonsproteiner til bakteriofagkappeproteiner, bakteriofagpartiklene blir deretter screenet mot PSCA-proteinet(er).

[0228] Følgelig er peptider som har en rekke anvendelser, slik som terapeutiske, prognostiske eller diagnostiske reagenser, således identifisert uten noen tidligere informasjon om strukturen til den forventete liganden eller reseptormolekylet. Typiske peptidbiblioteker og screeningsfremgangsmåter som kan anvendes for å identifisere molekyler som interagerer med PSCA-proteinsekvenser er beskrevet for eksempel i US-patent nr. 5.723.286 publisert 3 mars 1998 og 5.733.731 publisert 31 mars 1998.

[0229] Alternativt blir cellelinjer som uttrykker PSCA anvendt for å identifisere protein-proteininteraksjoner mediert av PSCA. Slike interaksjoner kan bli undersøkt ved anvendelse av immunopresipiteringsteknikker (se *f.eks.* Hamilton B.J., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261:646-51). PSCA-protein kan bli immunopresipitert fra PSCA-uttrykkende cellelinjer ved anvendelse av anti-PSCA-antistoffer. Alternativt kan antistoffer mot His-tag anvendes i en cellelinje konstruert til å uttrykke fusjoner av PSCA og en His-tag (vektorer nevnt ovenfor). Det immunopresipiterte komplekset kan bli undersøkt for proteinassosiering

ved prosedyrer slik som Western-blotting, ^{35}S -metioninmerking av proteiner, proteinmikrosekvensiering, sølvmerking og todimensjonal gelelektroforese.

[0230] Små molekyler og ligander som interagerer med PSCA kan identifiseres gjennom relaterte utførelsesformer av slike screeningsforsøk. For eksempel kan små molekyler identifiseres som interfererer med proteinfunksjon, omfattende molekyler som interfererer med PSCAs evne til å mediere fosforylering og defosforylering, interaksjon med DNA- eller RNA-molekyler som en indikasjon på regulering av cellykluser, "second messenger"-signalering eller tumorigenesis. Tilsvarende er små molekyler som modulerer PSCA-relatert ionekanal-, proteinpumpe- eller cellekommunikasjonsfunksjoner identifisert og anvendt for å behandle pasienter som har kreft som uttrykker PSCA (se *f.eks.* Hille, B., *Ionic Channels of Excitable Membranes* 2nd Ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992). Videre kan ligander som regulerer PSCA-funksjon identifiseres basert på deres evne til å binde PSCA og aktivere en rapportørkonstruksjon. Typiske fremgangsmåter er beskrevet for eksempel i US-patent nr. 5.928.868 publisert 27 juli 1999 og omfatter fremgangsmåter for å danne hybridligander hvor minst én ligand er et lite molekyl. I en illustrativ utførelsesform blir celler konstruert for å uttrykke et fusjonsprotein av PSCA og et DNA-bindingsprotein anvendt til å ko-uttrykke et fusjonsprotein til en hybridligand/lite molekyl og et cDNA-bibliotek transkripsjonelt aktivatorprotein. Cellene inneholder videre et rapportørgen, ekspresjonen av hvilket som er kondisjonert i nærheten av de første og andre fusjonsproteinene til hverandre, en hendelse som forekommer bare hvis hybridliganden binder til målseter på begge hybridproteiner. De cellene som uttrykker rapportørgenet er valgt og det ukjente lille molekylet eller den ukjente liganden er identifisert. Denne fremgangsmåten tilveiebringer et middel for identifikasjon av modulatorer som aktiverer eller hemmer PSCA.

[0231] Det er beskrevet en fremgangsmåte for screening for et molekyl som interagerer med en PSCA-aminosyresekvens vist i figur 1, omfattende trinnene av å sette en populasjon av molekyler i kontakt med en PSCA-aminosyresekvens, å tillate populasjonen av molekyler og PSCA-aminosyresekvensen å interagere ved betingelser som letter en interaksjon, bestemmelse av tilstedeværelsen av et molekyl som interagerer med PSCA-aminosyresekvensen og deretter separering av molekyler som ikke interagerer med PSCA-aminosyresekvensen fra molekyler som gjør. I en spesifikk utførelsesform omfatter fremgangsmåten videre rensning, karakterisering og identifikasjon av et molekyl som interagerer med PSCA-aminosyresekvensen. Det identifiserte molekylet kan anvendes til å

modulere en funksjon utført av PSCA. I en foretrukket utførelsesform blir PSCA-aminosyresekvensen brakt i kontakt med et bibliotek av peptider.

X.) Terapeutiske fremgangsmåter og sammensetninger

[0232] Identifikasjon av PSCA som et protein som normalt er uttrykt i et begrenset sett av vev, men som også er uttrykt i kreft slik som de listet opp i tabell I, åpner flere terapeutiske angrepsmåter til behandling av slike krefter.

[0233] Verd å legge merke til, målrettet antitumorterapier er anvendelige selv når måletrettet protein er uttrykt i normalt vev, selv i vitalt normalt organvev. Et vitalt organ er ett som er nødvendig for å opprettholde liv, slik som hjertet eller kolon. Et ikke-vital organ er ett som kan fjernes hvoretter individet fortsatt er i stand til å overlever. Eksempler på ikke-vitale organer er eggstokk, bryst og prostata.

[0234] For eksempel er Herceptin® et FDA-godkjent farmasøytisk middel som består av et antistoff som er immunoreaktivt med proteinet forskjellig kjent som HER2, HER2/neu og erb-b-2. Det er markedsført av Genentech og er et kommersielt vellykket antitumormiddel. Herceptin®-salg nådde nesten \$400 million i 2002. Herceptin® er en behandling for HER2-positiv metastatisk brystkreft. Imidlertid er ekspresjonen av HER2 ikke begrenset til slike tumorer. Samme proteinet er uttrykt i flere normale vev. Spesielt er det kjent at HER2/neu er til stede i normal nyre og hjerte, således er disse vev til stede i alle humane mottagere av Herceptin. Tilstedeværelsen av HER2/neu i normal nyre er også bekreftet av Latif, Z., *et al.*, B.J.U. International (2002) 89:5-9. Som vist i denne artikkelen (som evaluerte hvorvidt nyrecellekarsinom skulle være en foretrukket indikasjon for anti-HER2-antistoffer slik som Herceptin) blir både protein og mRNA produsert i godartet nyrevev. Spesielt ble HER2/neu-protein sterkt overuttrykt i godartet nyrevev.

[0235] Til tross for det faktumet at HER2/neu er uttrykt i slikt vitalt vev som hjerte og nyre er Herceptin et meget anvendelig, FDA-godkjent og kommersielt vellykket medikament. Effekten av Herceptin på hjertevev, *dvs.* "kardiotoksisitet," har bare vært en bivirkning til behandling. Når pasienter ble behandlet med Herceptin alene skjedde betydelig kardiotoksisitet i en meget lav prosentdel av pasienter. For å minimalisere kardiotoksisiteten er det et mer stringent inntredelseskrev for behandlingen med HER2/neu. Faktorer slik som predisponering for hjerteforhold er evaluert før behandling kan forekomme.

[0236] Legg spesielt merke til at selv om nyrevev er angitt å vise normal ekspresjon, muligens selv høyere ekspresjon enn hjertevev, har nyre ingen merkbar Herceptinbivirkning overhodet. Videre fra det ulike arrayet fra normalt vev hvor HER2 er uttrykt er det meget liten

forekomst av hvilken som helst bivirkning. Bare hjertevev har manifestert hvilken som helst merkbart bivirkning i det hele tatt. Et vev slik som nyre, hvor HER2/neu-ekspresjon er spesielt bemerkelsesverdig, er ikke basisen for noen bivirkning.

[0237] Videre er fordelaktige terapeutiske effekter funnet for antitumorterapier som mål for epidermal vekstfaktor reseptor (EGFR); Erbitux (ImClone). EGFR er også uttrykt i en rekke normale vev. Der er meget begrensede bivirkninger i normale vev etter anvendelse av anti-EGFR terapeutiske midler. En generell bivirkning som forekommer med EGFR-behandlingen er et alvorlig hudutslett observert i 100% av pasientene som gjennomgår behandling.

[0238] Således overvinnes ekspresjon av et målprotein i normalt vev, selv vitalt normalt vev, ikke nytten av et målrettet middel for proteinet som et terapeutisk middel for visse tumorer hvor proteinet også er overuttrykt. For eksempel er ekspresjon i vitale organer ikke i og for seg skadelig. I tillegg kan organer betraktet som unnværlige, slik som prostata og eggstokk, fjernes uten å påvirke dødelighet. Til slutt er noen vitale organer ikke påvirket av normal organekspresjon på grunn av et immunprivilegium. Immunprivilegerede organer er organer som er beskyttet fra blod ved en blodorganbarriere og således ikke tilgjengelig for immunoterapi. Eksempler på immunprivilegerede organer er hjernen og testikkelen.

[0239] Følgelig er terapeutiske angrepsmåter som hemmer aktiviteten til et PSCA-protein anvendelige for pasienter som lider av kreft som uttrykker PSCA. Disse terapeutiske angrepsmåter faller generelt inn i tre klasser. Den første klassen modulerer PSCA-funksjon da den angår tumorcellevekst hvilket fører til hemning eller retardasjon av tumorcellevekst eller som fremkaller dens død. Den andre klassen omfatter forskjellige fremgangsmåter for å hemme bindingen eller assosieringen til et PSCA-protein med dens bindingspartner eller med andre proteiner. Den tredje klassen omfatter en rekke fremgangsmåter for å hemme transkripsjonen av et PSCA-gen eller translasjon av PSCA-mRNA.

X.A.) Antikreftvaksiner

[0240] Kreftvaksiner kan dannes omfattende et PSCA-relatert protein eller PSCA-relatert nukleinsyre. I betraktning av ekspresjon av PSCA forhindrer kreftvaksiner og/eller behandler PSCA-uttrykkende kreft med minimale eller ingen effekter på ikke-målvev. Anvendelsen av et tumorantigen i en vaksine som genererer celledmedierte humorale immunresponser som antikreftterapi er velkjente på området og har vært anvendt i prostatakreft ved anvendelse av humane PSMA- og gnager PAP-immunogener (Hodge *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 63:231-237; Fong *et al.*, 1997, *J. Immunol.* 159:3113-3117).

[0241] Slike fremgangsmåter kan lett bli praktisert ved anvendelse av et PSCA-relatert protein eller et PSCA-kodende nukleinsyremolekyl og rekombinante vektorer som er i stand til å uttrykke og presentere PSCA-immunogenet (som typisk omfatter flere T-celleepitoper eller antistoff). Fagfolk forstår at en rekke vaksinesystemer for levering av immunoreaktive epitoper er kjent på området (se *f.eks.* Heryln *et al.*, *Ann Med* 1999 Feb 31(1):66-78; Maruyama *et al.*, *Cancer Immunol Immunother* 2000 Jun 49(3):123-32) Kort omfatter slike fremgangsmåter for dannelsen av en immunrespons (*f.eks.* cellemediert og/eller humoral) hos et pattedyr trinnene: eksponering av pattedyrets immunsystem til en immunoreaktiv epitop (*f.eks.* en epitop til stede i et PSCA-protein vist i figur 1 eller analog eller homolog deriv) slik at pattedyret genererer en immunrespons som er spesifikk for den epitopen (*f.eks.* genererer antistoffer som spesifikt gjenkjenner den epitopen).

[0242] Hele PSCA-proteinet, immunogene regioner eller epitoper derav, kan kombineres og leveres ved forskjellige midler. Slike vaksinesammensetninger kan for eksempel omfatte lipopeptider (*f.eks.* Vitiello, A. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:341, 1995), peptidsammensetninger innkapslet i poly(DL-laktid-koglykolid) ("PLG")-mikrokuler (se *f.eks.* Eldridge, *et al.*, *Molec. Immunol.* 28:287-294, 1991; Alonso *et al.*, *Vaccine* 12:299-306, 1994; Jones *et al.*, *Vaccine* 13:675-681, 1995), peptidsammensetninger inneholdt i immunstimulerende komplekser (ISCOMS) (se *f.eks.* Takahashi *et al.*, *Nature* 344:873-875, 1990; Hu *et al.*, *Clin Exp Immunol.* 113:235-243, 1998), multiple antigenpeptidsystemer (MAPer) (se *f.eks.* Tam, J. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5409-5413, 1988; Tam, J.P., *J. Immunol. Methods* 196:17-32, 1996), peptider formulert som multivalente peptider; peptider for anvendelse i ballistiske leveringsystemer, typisk krystalliserte peptider, virale leveringsvektorer (Perkus, M. E. *et al.*, *I: Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 379, 1996; Chakrabarti, S. *et al.*, *Nature* 320:535, 1986; Hu, S. L. *et al.*, *Nature* 320:537, 1986; Kieny, M.-P. *et al.*, *AIDS Bio/Technology* 4:790, 1986; Top, F. H. *et al.*, *J. Infect. Dis.* 124:148, 1971; Chanda, P. K. *et al.*, *Virology* 175:535, 1990), partikler av viral eller syntetisk opprinnelse (*f.eks.* Kofler, N. *et al.*, *J. Immunol. Methods.* 192:25, 1996; Eldridge, J. H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993; Falo, L. D., Jr. *et al.*, *Nature Med.* 7:649, 1995), adjuvantia (Warren, H. S., Vogel, F. R. and Chedid, L. A. *Annu. Rev. Immunol.* 4:369, 1986; Gupta, R. K. *et al.*, *Vaccine* 11:293, 1993), liposomer (Reddy, R. *et al.*, *J. Immunol.* 148:1585, 1992; Rock, K. L., *Immunol. Today* 17:131, 1996), eller nakent eller partikkelabsorbert cDNA (Ulmer, J. B. *et al.*, *Science* 259:1745, 1993; Robinson, H. L., Hunt, L. A. and Webster, R. G., *Vaccine* 11:957, 1993; Shiver, J. W. *et al.*, *In: Concepts in vaccine development*, Kaufmann, S. H. E., ed., p. 423,

1996; Cease, K. B. and Berzofsky, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* 12:923, 1994 og Eldridge, J. H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993). Toksinmåltrettede leveringsteknologier også kjent som reseptormedierte målrettede, slik som de fra Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts) kan også anvendes.

[0243] Hos pasienter med PSCA-assosiert kreft kan vaksinesammensetningene ifølge oppfinnelsen også anvendes sammen med andre behandlinger anvendt for kreft, *f.eks.* kirurgi, kjemoterapi, medikamentterapi, strålingsterapi, etc. omfattende anvendelse i kombinasjon med immune adjuvantia slik som IL-2, IL-12, GM-CSF og lignende.

Cellulære vaksiner:

[0244] CTL-epitoper kan bestemmes ved anvendelse av spesifikke algoritmer for å identifisere peptider innen PSCA-protein som binder tilsvarende HLA-alleler (se *f.eks.* tabell IV; Epimer™ og Epimatrix™, Brown University (URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); og BIMAS (URL bimas.dcrt.nih.gov/; SYFPEITHI ved URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/). I en foretrukket utførelsesform inneholder en PSCA-immunogen én eller flere aminosyresekvenser identifisert ved anvendelse av teknikker velkjente på området, slik som sekvensene vist i tabeller V-XVIII og XXII-LI eller et peptid på 8, 9, 10 eller 11 aminosyrer spesifisert ved et HLA-klasse I-motiv/supermotiv (*f.eks.* tabell IV (A), tabell IV (D) eller tabell IV (E)) og/eller et peptid på minst 9 aminosyrer som omfatter et HLA-klasse II-motiv/supermotiv (*f.eks.* tabell IV (B) eller tabell IV (C)). Som er anerkjent på området er HLA-klasse I-bindingsgropen i det vesentlige lukket avsluttet slik at peptider av bare et spesielt størrelsesområde kan passe inn i gropen og bli bundet, generelt er HLA-klasse I-epitoper 8, 9, 10 eller 11 aminosyrer lange. I motsetning er HLA-klasse II-bindingsgropen i det vesentlige åpen avsluttet; derfor kan et peptid på ca. 9 eller flere aminosyrer være bundet av et HLA-klasse II-molekyl. På grunn av bindingsgropforskjellene mellom HLA-klasse I og II, er HLA-klasse I-motiver lengdespesifikke, *dvs.* posisjon to av et klasse I-motiv er den andre aminosyre i en amino- til karboksylretning av peptidet. Aminosyrenposisjoner i et klasse II-motiv er relative bare til hverandre, ikke det totale peptidet, *dvs.* ytterligere aminosyrer kan være bundet til amino- og/eller karboksylterminalen til en motivbærende sekvens. HLA-klasse II-epitoper er ofte 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 eller 25 aminosyrer lang eller lenger enn 25 aminosyrer.

[0245] En rekke fremgangsmåter for dannelsen av en immunrespons hos et pattedyr er kjent på området (for eksempel som det første trinnet i dannelsen av hybridomer). Fremgangsmåter for dannelsen av en immunrespons hos et pattedyr omfatter eksponering av

pattedyrets immunsystem til en immunogen epitop på et protein (*f.eks.* et PSCA-protein) slik at en immunrespons er dannet. En typisk utførelsesform består av en fremgangsmåte for dannelsen av en immunrespons på PSCA i en vert, ved å sette i kontakt verten med en tilstrekkelig mengde av minst én PSCA-B-celle eller cytotoxisk T-celleepitop eller analog derav; og ved minst ett periodisk interval deretter igjen å sette i kontakt verten med PSCA-B-cellen eller cytotoxisk T-celleepitopen eller analog derav. En spesifikk utførelsesform består av en fremgangsmåte for dannelsen av en immunrespons mot et PSCA-relatert protein eller et menneskelaget multiepitopisk peptid omfattende: administrering av PSCA-immunogen (*f.eks.* et PSCA-protein eller et peptidfragment derav, et PSCA-fusjonsprotein eller analog etc.) i en vaksinefremstilling til et menneske eller et annet pattedyr. Typisk inneholder slike vaksinefremstillinger videre en egnet adjuvans (se *f.eks.* US-patent nr. 6.146.635) eller en universell hjelpeepitop slik som et PADRETM-peptid (Epimmune Inc., San Diego, CA; se *f.eks.* Alexander *et al.*, J. Immunol. 2000 164(3); 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, Immunity 1994 1(9): 751-761 og Alexander *et al.*, Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92). En alternativ fremgangsmåte omfatter dannelsen av en immunrespons i et individ mot en PSCA-immunogen ved: administrering *in vivo* til muskel eller hud av individets kropp et DNA-molekyl som omfatter en DNA-sekvens som koder for et PSCA-immunogen, DNA-sekvensen operativt bundet for å regulerende sekvenser som kontrollerer ekspresjonen av DNA-sekvensen; hvor DNA-molekylet er tatt opp av celler, DNA-sekvensen er uttrykt i cellene og en immunrespons er dannet mot immunogenet (se *f.eks.* US-patent nr. 5.962.428). Eventuelt er en genetisk vaksinefasilitator slik som anioniske lipider; saponiner; lektiner; østrogene forbindelser; hydroksylert lavere alkyl; dimetylsulfoksyd; og urinstoff også administrert. I tillegg kan et antiidiotypisk antistoff administreres som etterligner PSCA, for å generere en respons på målantigenet.

Nukleinsyrevaksiner:

[0246] Vaksinesammensetningene omfatter nukleinsyremediert modaliteter. DNA eller RNA som koder for protein(er) ifølge oppfinnelsen kan administreres til en pasient. Genetiske immuniseringsfremgangsmåter kan anvendes for å danne profylaktiske eller terapeutiske humorale og cellulære immunresponser rettet mot kreftceller som uttrykker PSCA. Konstrukt omfattere DNA som koder for et PSCA-relatert protein/immunogen og passende regulerende sekvenser kan injiseres direkte inn i muskel eller hud til et individ, slik at cellene til muskelen eller huden tar opp konstruksjonen og uttrykker det kodede PSCA-proteinet/immunogenet. Alternativt omfatter en vaksine et PSCA-relatert protein. Ekspresjon

av det PSCA-relaterte proteinimmunogenet resulterer i dannelsen av profylaktisk eller terapeutisk humoral og cellulær immunitet mot celler som bærer et PSCA-protein. Forskjellige profylaktiske og terapeutiske genetiske immuniseringsteknikker kjent på området kan anvendes (for oversikt se informasjon og referanser publisert på internettadressen genweb.com). Nukleinsyrebasert levering er beskrevet for eksempel i Wolff *et. al.*, *Science* 247:1465 (1990) så vel som US-patent nr. 5.580.859; 5.589.466; 5.804.566; 5.739.118; 5.736.524; 5.679.647; WO 98/04720. Eksempler på DNA-baserte leveringsteknologier omfatter “nakent DNA”, forenklet (bupivacain, polymerer, peptidmediert) levering, kationiske lipidkomplekser og partikkelmediert (“genpistol”) eller trykkmediert levering (se *f.eks.* US-patent nr. 5.922.687).

[0247] For terapeutisk eller profylaktisk immuniseringsformål kan proteiner ifølge oppfinnelsen uttrykkes via virale eller bakterielle vektorer. Forskjellige virale genleveringssystemer som kan anvendes i praksisen ifølge oppfinnelsen omfatter, men er ikke begrenset til, vaccinia-, fowlpox-, canarypox-, adenovirus, influensa-, poliovirus, adenoassosiert virus, lentivirus og sindbisvirus (se *f.eks.* Restifo, 1996, *Curr. Opin. Immunol.* 8:658-663; Tsang *et al.* *J. Natl. Cancer Inst.* 87:982-990 (1995)). Ikke-virale leveringssystemer kan også anvendes ved innføring av nakent DNA som koder for et PSCA-relatert protein inn i pasienten (*f.eks.* intramuskulært eller intradermalt) for å fremkalle en antitumorrespons.

[0248] Vacciniavirus blir anvendt for eksempel som en vektor for å uttrykke nukleotidsekvenser som koder for peptidene ifølge oppfinnelsen. Ved innføring inn i en vert den rekombinante vacciniavirusen uttrykkes det proteinimmunogeniske peptidet og derved fremkalles en vertimmunrespons. Vacciniavektorer og fremgangsmåter anvendelige i immuniseringsprotokoller er beskrevet i *f.eks.* US-patent nr. 4.722.848. En annen vektor er BCG (Bacille Calmette Guerin). BCG-vektorer er beskrevet i Stover *et al.*, *Nature* 351:456-460 (1991). En rekke andre vektorer anvendelige for terapeutisk administrering eller immunisering av peptidene ifølge oppfinnelsen, *f.eks.* adeno- og adenoassosierte virusvektorer, retrovirale vektorer, *Salmonella typhi*-vektorer, detoksifiserte antraxtoksinvektorer og lignende, vil være klare for fagfolk på området fra beskrivelsen her.

[0249] Således blir genleveringssystemer anvendt for å levere et PSCA-relatert nukleinsyremolekyl. I én utførelsesform blir det fullengde humane PSCA-cDNAet anvendt. I en annen utførelsesform blir PSCA-nukleinsyremolekyler som koder for spesifikke cytotoksisk T-lymfocyt- (CTL) og/eller antistoffepitoper anvendt.

Ex vivo-vaksiner

[0250] Forskjellige *ex vivo*-strategier kan også anvendes for å danne en immunrespons. Én angrepmåte involverer anvendelsen av antigenpresenterende celler (APC'er) slik som dendritiske celler (DC) for å presentere PSCA-antigen til en pasients immunsystem. Dendritiske celler uttrykker MHC-klasse I- og II-molekyler, B7 ko-stimulator og IL-12 og er således meget spesialiserte antigenpresenterende celler. I prostatakreft er autologt dendritiske celler pulserte med peptider fra prostataspesifikt membranantigen (PSMA) som anvendes i et fase I klinisk forsøk til å stimulere prostatakreftpasienters immunsystemer (Tjoa *et al.*, 1996, Prostate 28:65-69; Murphy *et al.*, 1996, Prostate 29:371-380). Således kan dendritiske celler anvendes til å presentere PSCA-peptider til T-celler i sammenhengen med MHC-klasse I- eller II-molekyler. I én utførelsesform er autologt dendritiske celler pulserte med PSCA-peptider i stand til å binde til MHC-klasse I- og/eller klasse II-molekyler. I en annen utførelsesform er dendritiske celler pulserte med det fullstendige PSCA-proteinet. Ennå en annen utførelsesform involverer konstruksjon av overekspresjonen av et PSCA-gen i dendritiske celler ved anvendelse av forskjellige implementingsvektorer kjent på området, slik som adenovirus (Arthur *et al.*, 1997, Cancer Gen Ther. 4:17-25), retrovirus (Henderson *et al.*, 1996, Cancer Res. 56:3763-3770), lentivirus, adenoassosiert virus, DNA-transfeksjon (Ribas *et al.*, 1997, Cancer Res. 57:2865-2869) eller tumoravledet RNA-transfeksjon (Ashley *et al.*, 1997, J. Exp. Med. 186:1177-1182). Celler som uttrykker PSCA kan også konstrueres til å uttrykke immune modulatorer, slik som GM-CSF og anvendes som immuniserende midler.

X.B.) PSCA som et mål for antistoffbasert terapi

[0251] PSCA er et attraktivt mål for antistoffbaserte terapeutiske strategier. Flere antistoffstrategier er kjente på området for målretting av både ekstracellulære og intracellulære molekyler (se *f.eks.* komplement- og ADCC-mediert drap så vel som anvendelse av intrabodier ("intrabodies")). Fordi PSCA er uttrykt av kreftceller av forskjellige avstamninger i forhold til tilsvarende normale celler blir systemisk administrering av PSCA-immunoreaktive sammensetninger fremstilt som viser utmerket sensitivitet uten toksisk, uspesifikk og/eller ikke-måleffekter forårsaket av binding av den immunoreaktive sammensetningen til ikke-målorganer og vev. Antistoffer spesifikt reaktive med domener til PSCA er anvendelige for å behandle PSCA-uttrykkende kreft systemisk, enten som konjugater med et toksin eller terapeutisk middel eller som nakne antistoffer som er i stand til å hemme celleproliferasjon eller funksjon.

[0252] PSCA-antistoffer kan innføres til en pasient slik at antistoffet binder til PSCA og modulerer en funksjon, slik som en interaksjon med en bindingspartner, og følgelig medierer destruksjon av tumorcellene og/eller hemmer veksten av tumorcellene. Mekanismer ved hvilke sådanne antistoffer utøver en terapeutisk effekt kan omfatte komplementmediert cytolyse, antistoffavhengig cellulær cytotoxiskitet, modulering av den fysiologiske funksjonen til PSCA, hemning av ligandbindende eller signaltransduksjons reaksjonsveier, modulering av tumorcelledifferensiering, endring av tumorangiogenesefaktorprofiler og/eller apoptose. Eksempler omfatter Rituxan® for Ikke-Hodgkins Lymfom, Herceptin® for metastatisk brystkreft og Erbitux® for kolorektal kreft.

[0253] Fagfolk på området forstår at antistoffer kan anvendes til å spesifikt måle og binde immunogene molekyler slik som en immunogen region til en PSCA-sekvens vist i figur 1. I tillegg forstår fagfolk at det er rutine å konjugere antistoffer til cytotoxiske midler (se *f.eks.* Slevens *et al.* Blood 93:11 3678-3684 (June 1, 1999)). Når cytotoxiske og/eller terapeutiske midler blir levert direkte til celler, slik som ved konjugering av dem til antistoffer spesifikke for et molekyl uttrykt av den cellen (*f.eks.* PSCA), vil det cytotoxiske midlet utøve dens kjente biologisk effekt (*dvs.* cytotoxiskitet) på de cellene.

[0254] En rekke sammensetninger og fremgangsmåter for anvendelse av antistoffcytotoxisk middel-konjugater til å drepe celler er kjent på området. I sammenheng med kreft medfører typiske fremgangsmåter administrering til et dyr som har en tumor en biologisk effektiv mengde av et konjugat omfattende et valgt cytotoxisk og/eller terapeutisk middel bundet til et målrettet middel (*f.eks.* et anti-PSCA-antistoff) som binder til en markør (*f.eks.* PSCA) uttrykt, tilgjengelig for binding eller lokalisert på celleoverflatene. En typisk utførelsesform er en fremgangsmåte for levering av et cytotoxisk og/eller terapeutisk middel til en celle som uttrykker PSCA, omfattende konjugering av det cytotoxiske midlet til et antistoff som immunospesifikt binder til en PSCA-epitop og eksponering av cellen til antistoff-middel-konjugatet. En annen illustrativ utførelsesform er en fremgangsmåte for behandling av et individ mistenkt for å lide av metastasert kreft, omfattende et trinn av administrering parenteralt til nevnte individ en farmasøytisk sammensetning omfattende en terapeutisk effektiv mengde av et antistoff konjugert til et cytotoxisk og/eller terapeutisk middel.

[0255] Kreftimmunoterapi ved anvendelse av anti-PSCA-antistoffer kan utføres i henhold til forskjellige angrepmåter som med hell er anvendt ved behandlingen av andre krefttyper, omfattende men ikke begrenset til kolonkreft (Arlen *et al.*, 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-

138), multipelt myelom (Ozaki *et al.*, 1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari *et al.*, 1997, Blood 90:2437-2444), gastrisk kreft (Kasprzyk *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), B-celle lymfom (Funakoshi *et al.*, 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), leukemi (Zhong *et al.*, 1996, Leuk. Res. 20:581-589), kolorektal kreft (Moun *et al.*, 1994, Cancer Res. 54:6160-6166; Velders *et al.*, 1995, Cancer Res. 55:4398-4403) og brystkreft (Shepard *et al.*, 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127). Noen terapeutiske angrepmåter involverer konjugering av nakent antistoff til et toksin eller radioisotop, slik som konjugeringen av henholdsvis Y⁹¹ eller I¹³¹ til anti-CD20-antistoffer (*f.eks.* ZevalinTM, IDEC Pharmaceuticals Corp. eller BexxarTM, Coulter Pharmaceuticals), mens andre involverer samadministrering av antistoffer og andre terapeutiske midler, slik som HerceptinTM (trastuzumAb) med paclitaxel (Genentech, Inc.). Antistoffene kan være konjugert til et terapeutisk middel. For å behandle prostatakreft kan for eksempel PSCA-antistoffer administreres sammen med stråling, kjemoterapi eller hormon ablasjon. Antistoffer kan også være konjugert til et toksin slik som calicheamicin (*f.eks.* MylotargTM, Wyeth-Ayerst, Madison, NJ, et rekombinant humanisert IgG₄ kappa-antistoff konjugert til antitumor antibiotisk calicheamicin) eller et maytansinoid (*f.eks.* taxanbasert tumoraktivert prodrug, TAP, platform, ImmunoGen, Cambridge, MA se også *f.eks.* US-patent 5.416.064) eller Auristatin E (Nat Biotechnol. 2003 Jul; 21(7):778-84. (Seattle Genetics)).

[0256] Selv om PSCA-antistoffterapi er anvendelig for alle trinn av kreft kan antistoffterapi være spesielt passende langt fremskredene eller metastasisk kreft. Behandling med antistoffterapien ifølge oppfinnelsen er angitt for pasienter som har mottatt én eller flere runder av kjemoterapi. Alternativt er antistoffterapi kombinert med et kjemoterapeutisk middel eller strålingsregime for pasienter som ikke har mottatt kjemoterapeutisk behandling. I tillegg kan antistoffterapi sette i stand til anvendelse av reduserte doser av ledsagende kjemoterapi, spesielt for pasienter som ikke tolererer toksisiteten til det kjemoterapeutiske midlet meget godt. Fan *et al.* (Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Prewett *et al.* (International J. av Onco. 9:217-224, 1996) og Hancock *et al.* (Cancer Res. 51:4575-4580, 1991) beskriver anvendelsen av forskjellige antistoffer sammen med kjemoterapeutiske midler.

[0257] Selv om PSCA-antistoffterapi er anvendelig for alle trinn i kreft kan antistoffterapi være spesielt passende på langt fremskredet eller metastasisk kreft. Behandling med antistoffterapien er angitt for pasienter som har mottatt én eller flere runder av kjemoterapi. Alternativt er antistoffterapi kombinert med et kjemoterapeutisk middel eller strålingsregime for pasienter som ikke har mottatt kjemoterapeutisk behandling. I tillegg kan antistoffterapi

sette i stand til anvendelse av reduserte doser av ledsagende kjemoterapi, spesielt for pasienter som ikke tolererer toksisiteten til det kjemoterapeutiske midlet meget godt.

[0258] Kreftpasienter kan evalueres for tilstedeværelsen og nivå av PSCA-ekspresjon, fortrinnsvis ved anvendelse av immunohistokjemiske vurderinger av tumorvev, kvantitativ PSCA-avbildning eller andre teknikker som pålitelig indikerer tilstedeværelsen og graden av PSCA-ekspresjon. Immunohistokjemisk analyse av tumorbiopsier eller kirurgiske prøver er foretrukket for dette formålet. Fremgangsmåter for immunohistokjemisk analyse av tumorvev er velkjente på området.

[0259] Anti-PSCA monoklonale antistoffer som behandler prostata og annen kreft omfatter de som initierer en kraftig immunrespons mot tumoren eller de som er direkte cytotoksisk. I dette henseende kan anti-PSCA monoklonale antistoffer (MAbs) fremkalle tumorcellelyse ved enten komplementmediert eller antistoffavhengig cellulære cytotoxicitet (ADCC)-mekanismer, som begge krever en intakt Fc-del av immunoglobulinmolekylet for interaksjon med effektorcelle-Fc-reseptorseter på komplementære proteiner. I tillegg er anti-PSCA-MAbs som utøve en direkte biologisk effekt på tumorvekst anvendelige for å behandle kreft som uttrykker PSCA. Mekanismer ved hvilke direkte cytotoksisk MAbs virker omfatter: hemning av cellevekst, modulering av cellulær differensiering, modulering av tumorangiogenesefaktorprofiler og induksjon av apoptose. Mekanisme(n) ved hvilken en spesiell anti-PSCA-MAb utøver en antitumoreffekt er evaluert ved anvendelse av hvilket som helst antall av *in vitro*-forsøk som evaluerer celledød slik som ADCC, ADMMC, komplementmediert cellelyse og så frem, som generelt er kjent på området.

[0260] Hos noen pasienter kan anvendelsen av murine eller andre ikke-humane monoklonale antistoffer eller human/mus kimære MAbs fremkalle moderate til sterke immunresponser mot det ikke-humane antistoffet. Dette kan resultere i utskilling av antistoffet fra sirkulasjon og redusert effektivitet. I de alvorligste tilfellene kan en slik immunrespons føre til den omfattende dannelsen av immunkomplekser som potensielt kan forårsake nyresvikt. Følgelig er foretrukne monoklonale antistoffer anvendt i de terapeutiske fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen de som er enten fullstendig humane eller humaniserte og som binder spesifikt til mål-PSCA-antigenet med høy affinitet men viser lav eller ingen antigenisitet hos pasienten.

[0261] Terapeutiske fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen betrakter administreringen av enkle anti-PSCA-MAbs så vel som kombinasjoner eller kocktailer av forskjellige MAbs. Slike MAb-kocktailer kan ha visse fordeler da som de inneholder MAbs som mål for

forskjellige epitoper, utnytter forskjellige effektormekanismer eller kombinerer direkte cytotoxisk MAb med MAb som setter sin lit til immune effektorfunksjonalitet. Slike MAbs i kombinasjon kan vise synergistiske terapeutiske effekter. I tillegg kan anti-PSCA-MAbs administreres samtidig med andre terapeutiske modaliteter, omfattende men ikke begrenset til forskjellige kjemoterapeutiske midler, androgen-blokkere, immune modulatorer (*f.eks.* IL-2, GM-CSF), kirurgi eller stråling. Anti-PSCA-MABene blir administrert i deres “nakne” eller ukonjugerte form eller kan ha et terapeutisk middel (midler) konjugert til dem.

[0262] Anti-PSCA-antistoffformuleringer blir administrert via hvilken som helst vei som er i stand til levering av antistoffene til en tumorcelle. Administreringsfremgangsmåter omfatter, men er ikke begrenset til, intravenøs, intraperitoneal, intramuskulær, intratumor, intradermal og lignende. Behandling involverer generelt gjentatt administrering av anti-PSCA-antistoffremstillingen, via en akseptabel administreringsvei slik som intravenøs injeksjon (IV), i en typisk dose i området ca. 0,1, ,2, ,3, ,4, ,5, ,6, ,7, ,8, ,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20 eller 25 mg/kg kroppsvekt. Generelt er doser i området 10-1000 mg MAb pr. uke effektive og godt tolerert.

[0263] Basert på klinisk erfaring med Herceptin™-MAb ved behandling av metastatisk brystkreft representerer en innledende belastningsdose omtrent 4 mg/kg pasientkroppsvekt IV, fulgt av ukentlige doser på ca. 2 mg/kg IV av anti-PSCA-MAb-fremstillingen et akseptabelt doseringsregime. Fortrinnsvis blir den innledende “loading dosen” administrert som en 90-minutts eller lenger infusjon. Den periodiske opprettholdelsesdosen blir administrert som en 30-minutts eller lenger infusjon, tilveiebrakt den innledende dosen ble godt tolerert. Som anerkjent av fagfolk på området kan forskjellige faktorer innvirke på det ideelle doseregimet i et spesielt tilfelle. Slike faktorer omfatter for eksempel bindingsaffiniteten og halveringstid til Ab eller MAbs anvendt, graden av PSCA-ekspresjon hos pasienten, omfanget av sirkulerende felt PSCA-antigen, det ønskede likevekts antistoffkonsentrasjonsnivået, behandlingsfrekvens og innvirken på kjemoterapeutiske eller andre midler anvendt i kombinasjon med behandlingens fremgangsmåte ifølge oppfinnelsen, så vel som helsestatusen til en spesiell pasient.

[0264] Eventuelt skulle pasienter bli evaluert for nivåene av PSCA i en gitt prøve (*f.eks.* nivåene av sirkulerende PSCA-antigen og/eller PSCA-uttrykkende celler) for å assistere i bestemmelsen av det mest effektive doseringsregimet, etc. Slike evalueringer er også anvendt for overvåkning av formål gjennom hele terapi og er anvendelige til å måle terapeutisk suksess i kombinasjon med evalueringen av andre parametere (for eksempel urincytologi

og/eller ImmunoCyt-nivåer i blærekreftterapi eller analogt, serum PSA-nivåer i prostatakreftterapi).

[0265] Antiidiotypiske anti-PSCA-antistoffer kan også anvendes i antikreftterapi som en vaksine for å fremkalle en immunrespons på celler som uttrykker et PSCA-relatert protein. Spesielt er dannelsen av antiidiotypiske antistoffer velkjente på området; denne metodologien kan lett bli adaptert for å danne antiidiotypiske anti-PSCA-antistoffer som etterligner en epitop på et PSCA-relatert protein (se for eksempel 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). Et slikt antiidiotypisk antistoff kan anvendes i kreftvaksinestrategier.

[0266] Et formål med foreliggende oppfinnelse er å tilveiebringe PSCA-antistoffer, som hemmer eller retarderer veksten av tumorceller som uttrykker PSCA og derved tilveiebringe fremgangsmåter for å hemme angiogenese og andre biologiske funksjoner og derved redusere tumorvekst hos pattedyr, fortrinnsvis mennesker, ved anvendelse av slike PSCA-antistoffer og spesielt ved anvendelse av slike PSCA-antistoffer kombinert med stråling og kjemoterapi eller begge.

[0267] I én utførelsesform er det synergi når tumorer, omfattende humane tumorer, behandles med PSCA-antistoffer sammen med kjemoterapeutiske midler eller stråling eller kombinasjoner derav. Med andre ord er hemningen av tumorvekst med et PSCA-antistoff forbedret mer enn forventet når kombinert med kjemoterapeutiske midler eller stråling eller kombinasjoner derav. Synergi kan bli vist for eksempel ved større hemning av tumorvekst ved kombinert behandling enn ville være forventet fra en behandling av bare PSCA-antistoffer eller den additive effekten av behandling med et PSCA-antistoff og et kjemoterapeutisk middel eller stråling. Fortrinnsvis er synergi demonstrert ved remisjon av kreften hvor remisjon ikke er forventet fra behandling hverken fra et nakent PSCA-antistoff eller med behandling ved anvendelse av en additiv kombinasjon av et PSCA-antistoff og et kjemoterapeutisk middel eller stråling.

[0268] Fremgangsmåten for veksthemming av tumorceller ved anvendelse av et PSCA-antistoff og en kombinasjon av kjemoterapi eller stråling eller begge omfatter administrering av PSCA-antistoffet før, under eller etter begynnende kjemoterapi eller strålingsterapi, så vel som hvilken som helst kombinasjon derav (*dvs.* før og under, før og etter, under og etter eller før, under og etter begynnende kjemoterapien og/eller strålingsterapi). For eksempel er PSCA-antistoffet typisk administrert mellom 1 og 60 dager, fortrinnsvis mellom 3 og 40 dager, mer foretrukket mellom 5 og 12 dager før begynnende strålingsterapi og/eller

kjemoterapi. Imidlertid, avhengig av behandlingsprotokollen og den spesifikke pasientens behov, blir fremgangsmåten utført på en måte som vil tilveiebringe den mest effektive behandlingen og til slutt forlenge livet til pasienten.

[0269] Administreringen av kjemoterapeutiske midler kan gjennomføres på en rekke måter omfattende systemisk ved de parenterale og enterale veiene. I én utførelsesform blir PSCA-antistoffet og det kjemoterapeutiske midlet administrert som separate molekyler. I en annen utførelsesform er PSCA-antistoffet tilknyttet, for eksempel ved konjugering, til et kjemoterapeutisk middel. (Se eksemplet betegnet “Humane kliniske forsøk for behandlingen og diagnosen av humane karsinomer gjennom anvendelse av humane anti-PSCA-antistoffer *in vivo*”) og (Se avsnitt betegnet “PSCA som et mål for antistoffbasert terapi”). Spesielle eksempler på kjemoterapeutiske midler eller kjemoterapi omfatter cisplatin, dakarbazin (DTIC), dactinomycin, mekloretoamin (nitrogen mustard), streptozocin, cyklofosamid, carmustin (BCNU), lomustin (CCNU), doxorubicin (adriamycin), daunorubicin, prokarbazin, mitomycin, cytarabin, etoposid, metotrexat, 5-fluoruracil, vinblastin, vincristin, bleomycin, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukin, asparaginase, busulfan, karboplatin, cladribin, dakarbazin, floxuridin, fludarabin, hydroksyurea, ifosfamid, interferon-alfa, leuprolid, megestrol, melphalan, merkaptopurin, plicamycin, mitotan, pegaspargase, pentostatin, pipobroman, plicamycin, streptozocin, tamoxifen, teniposid, testolakton, tioguanin, tiotepa, uracilsennep, vinorelbin, klorambucil, taxol og kombinasjoner derav.

[0270] Kilden for stråling, anvendt i kombinasjon med et PSCA-antistoff, kan enten være ekstern eller intern til pasienten som behandles. Når kilden er ekstern for pasienten er terapien kjent som ekstern strålingsterapi (“external beam radiation therapy”, EBRT). Når kilden for stråling er intern for pasienten er behandlingen betegnet brachyterapi (BT).

[0271] Strålingen blir administrert i henhold til velkjente standardteknikker ved anvendelse av standardutstyr fremstilt for dette formålet, slik som AECL Theratron og Varian Clinac. Strålingsdosen avhenger av en rekke faktorer som er velkjente på området. Slike faktorer omfatter organet som behandles, de friske organene i strålingsbanen som utilsiktet kan bli negativt påvirket, toleransen til pasienten for strålingsterapi og området av kroppen med behov for behandling. Dosen vil typisk være mellom 1 og 100 Gy og mer spesielt mellom 2 og 80 Gy. Noen doser som er rapportert omfatter 35 Gy til ryggmargen, 15 Gy til nyrene, 20 Gy til leveren og 65-80 Gy til prostata. Det skal imidlertid bli fremhevet som oppfinnelsen ikke er begrenset til noen spesiell dose. Dosen vil bestemmes av behandlingen

til legen i henhold til de spesielle faktorene i en gitt situasjon, omfattende faktorene nevnt ovenfor.

[0272] Distansen mellom kilden for den eksterne strålingen og punktet for inntredelsen inn i pasienten kan være hvilken som helst distanse som representerer en akseptabel balanse mellom drap av målceller og minimalisering av bivirkninger. Kilden for den eksterne strålingen er typisk mellom 70 og 100 cm fra punktet av inntredelsen inn i pasienten.

[0273] Brachyterapi blir generelt utført ved å plasere kilden for stråling i pasienten. Typisk blir kilden for stråling plassert omtrent 0-3 cm fra vevet som behandles. Kjente teknikker omfatter interstitiell, indre hulrom ("intercavitary") og overflate brachyterapi. De radioaktive opprinnelsene kan være implantert permanent eller midlertidig. Noen typiske radioaktive atomer som har vært anvendt i permanente implantater omfatter jod-125 og radon. Noen typiske radioaktive atomer som har vært anvendt i midlertidige implantater omfatter radium, cesium-137 og iridium-192. Noen ytterligere radioaktive atomer som har vært anvendt i brachyterapi omfatter americium-241 og gull-198. Strålingsdosen for brachyterapi kan være den samme som nevnt ovenfor for ekstern strålingsterapi. I tillegg til faktorene nevnt ovenfor for å bestemme dosen av ekstern strålingsterapi er typen av det radioaktive atomet anvendt også tatt i betraktning for bestemmelse av brachyterapidosen.

X.C.) PSCA som et mål for cellulære immunresponser

[0274] Vaksiner og fremgangsmåter for fremstilling av vaksiner som inneholder en immunogenisk effektiv mengde av én eller flere HLA-bindingspeptider er beskrevet her. Videre omfatter vaksiner sammensetninger av én eller flere av de krevde peptidene. Et peptid kan være til stede i en vaksine individuelt. Alternativt kan peptidet eksistere som et homopolymer omfattende multiple kopier av samme peptid eller som et heteropolymer av forskjellige peptider. Polymerer har fordelen av øket immunologisk reaksjon og, hvor forskjellige peptidepitoper blir anvendt for å fremstille polymeren, den ytterligere evnen for å fremkalle antistoffer og/eller CTLer som reagerer med forskjellige antigendeterminanter til den patogene organismen eller tumorrelatert peptid målrettet for en immunrespons. Sammensetningen kan være en naturlig forekommende region av et antigen eller kan fremstilles, *f.eks.* rekombinant eller ved kjemisk syntese.

[0275] Bærere som kan anvendes med vaksinene er velkjente på området og omfatter *f.eks.* tyroglobulin, albuminer slik som humant serum albumin, tetanustoksoid, polyamino-syrer slik som poly-L-lysin, poly-L-glutaminsyre, influensa-, hepatitt B-virus kjerneprotein og lignende. Vaksinene kan inneholde et fysiologisk tolererbart (*dvs.*

akseptabelt) fortynningsmiddel slik som vann eller saltløsning, fortrinnsvis fosfatbufret saltløsning. Vaksinene omfatter også typisk en adjuvans. Adjuvantia slik som ufullstendig Freund's adjuvans, aluminiumfosfat, aluminiumhydroksyd eller alun er eksempler på materialer velkjente på området. I tillegg, som beskrevet her, kan CTL-responser være primet ved konjugering av peptider ifølge oppfinnelsen til lipider, slik som tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserin (P₃CSS). Videre er en adjuvans slik som syntetisk cytosinfosforotiolert guanininnholdende (CpG)-oligonukleotider funnet å øke CTL-responser 10- til 100-ganger (se *f.eks.* Davila and Celis, J. Immunol. 165:539-547 (2000)).

[0276] Ved immunisering med en peptidsammensetning i henhold til oppfinnelsen, via injeksjon, aerosol, oral, transdermal, transmukosal, intrapleural, intratekal eller andre egnete veier responderer immunsystemet til verten på vaksinen ved å produsere store mengder av CTLer og/eller HTLer spesifikke for de ønskede antigen. Følgelig blir verten minst delvis immun til senere utvikling av celler som uttrykker eller overuttrykker PSCA-antigen eller avleder minst noen terapeutiske fordeler når antigenet ble tumorassosiert.

[0277] I noen utførelsesformer kan det være ønskelig å kombinere klassen I-peptidkomponenter med komponenter som fremkaller eller letter nøytralisering av antistoff og eller hjelpe-T-celleresponser rettet mot målantigenet. En foretrukket utførelsesform av en slik sammensetning omfatter klasse I- og klasse II-epitoper i henhold til oppfinnelsen. En alternativ utførelsesform av en slik sammensetning omfatter en klasse I- og/eller klasse II-epitop i henhold til oppfinnelsen, sammen med en kryssreaktiv HTL-epitop slik som PADRE™ (Epimmune, San Diego, CA)-molekyl (beskrevet *f.eks.* i US-patent nummer 5.736.142).

[0278] En vaksine kan også omfatte antigenpresenterende celler (APC), slik som dendritiske celler (DC), som en konstituent for å presentere peptider ifølge oppfinnelsen. Vaksinesammensetninger kan dannes *in vitro*, etter dendritisk cellemobilisering og -høsting, hvorved lading av dendritiske celler forekommer *in vitro*. For eksempel er dendritiske celler transfektert, *f.eks.* med et minigen i henhold til oppfinnelsen eller er pulserte med peptider. Den dendritiske cellen kan deretter administreres til en pasient for å fremkalle immunresponser *in vivo*. Vaksinesammensetninger, enten DNA- eller peptidbaserte, kan også administreres *in vivo* i kombinasjon med dendritisk cellemobilisering hvorved lading av dendritiske celler forekommer *in vivo*.

[0279] Fortrinnsvis er de følgende prinsipper anvendt når selektering av et array av epitoper for inklusjon i en polyepitopisk sammensetning for anvendelse i en vaksine eller for

selektering av atskilte epitoper til å være omfattet i en vaksine og/eller å være kodet for av nukleinsyrer slik som et minigen. Det er foretrukket at hver av de følgende prinsipper blir balansert for å fremstille seleksjonen. De multiple epitopene som blir innkorporert i en gitt vaksinesammensetning kan være, men trenger ikke være, påfølgende i sekvens i det naturlige antigenet fra hvilken epitopenene er avledet.

1.) Epitoper er valgt som, ved administrering, etterligner immunresponser som er observert å være i samsvar med tumorutskilling. For HLA-klasse I omfatter dette 3-4 epitoper som kommer fra minst ett tumorassosiert antigen (TAA). For HLA-klasse II blir et lignende rationale anvendt; igjen er 3-4 epitoper valgt fra minst ett TAA (se f.eks. Rosenberg et al., Science 278:1447-1450). Epitoper fra ett TAA kan anvendes i kombinasjon med epitoper fra én eller flere ytterligere TAAer for å produsere en vaksine som målsøker tumorer med varierende ekspresjonsmønstre av ofte uttrykte TAAer.

2.) Epitoper er valgt som har den ønskede bindingsaffiniteten etablert for å være i samsvar med immunogenisitet: for HLA-klasse I en IC₅₀ på 500 nM eller mindre, ofte 200 nM eller mindre; og for klasse II en IC₅₀ på 1000 nM eller mindre.

3.) Tilstrekkelige supermotivbærende peptider eller et tilstrekkelig array av allelspesifikke motivbærende peptider er valgt, hvilket tilveiebringer bred populasjonsdekning. For eksempel er det foretrukket å ha minst 80% populasjonsdekning. En Monte Carlo-analyse, en statistisk evaluering kjent på området, kan anvendes for å bedømme bredden eller overskuddet av populasjonsdekning.

4.) Ved selektering av epitoper fra kreftrelatert antigener er det ofte anvendelig å velge analoger fordi pasienten kan ha utviklet toleranse til den naturlige epitopen.

5.) Av spesiell relevanse er epitoper referert til som "pakquete epitoper" ("nested epitopes"). Pakquete epitoper forekommer hvor minst to epitoper overlapper i en gitt peptidsekvens. En pakket peptidsekvens kan omfatte B-celle, HLA-klasse I- og/eller HLA-klasse II-epitoper. Når tilveiebringning pakquete epitoper er et generelt formål å tilveiebringe det største antall av epitoper per sekvens. Således er et aspekt å unngå å tilveiebringe et peptid som er hvilket som helst lenger enn aminoterminusen av den aminoternale epitopen og karboksyl terminusen av den karboksylterminale epitopen i peptidet. Når tilveiebringning av en multi-epitopisk sekvens, slik som en sekvens omfattende pakquete epitoper, er det generelt viktig å screene sekvensen for å forsikre at det ikke har patologisk eller andre skadelige biologiske egenskaper.

6.) Hvis et polyepitopisk protein er dannet, eller når frembringning av et minigen, et formål er å danne det minste peptidet som omfatter de interessante epitopene. Dette prinsippet er lignende hvis ikke det samme som det anvendt når selektering av et peptid omfattende pakkete epitoper. Imidlertid, med et kunstig polyepitopisk peptid, er størrelsesminimalisering av formål balansert mot behovet til å integrere hvilke som helst spacersekvenser mellom epitoper i det polyepitopisk proteinet. Spaceraminosyreresiduer kan for eksempel være innført for å unngå sammenføyningsepitoper (en epitop gjenkjent av immunsystemet, ikke til stede i målantigenet og bare dannet ved den menneskelagete juxtaposisjonen av epitoper) eller for å lette spaltning mellom epitoper og derved forsterke epitoppresentasjon. Sammenføyningsepitoper er generelt som er unngått fordi mottageren kan generere en immunrespons på den ikke-naturlige epitopen. Av spesiell betydning er en sammenføyningsepitop som er en "dominant epitop." En dominant epitop kan føre til slik en nidkjær respons at immunresponser til andre epitoper er redusert eller undertrykket.

7.) Hvor sekvensene av multiple varianter av samme målprotein er til stede kan potensielle peptidepitoper også bli valgt på basisen av deres vern. For eksempel kan et kriterium for vern defineres som at hele sekvensen av et HLA-klasse I-bindingspeptid eller hele 9-mer kjernen av et klasse II-bindingspeptid blir konserveret i en betegnet prosentdel av sekvensene evaluert for et spesifikt proteinantigen.

X.C.1. Minigenvaksiner

[0280] Flere forskjellige angrepsmåter er tilgjengelige som tillater samtidig levering av multiple epitoper. Nukleinsyrer som koder for peptidene ifølge oppfinnelsen er en spesielt anvendelig utførelsesform ifølge oppfinnelsen. Epitoper for inklusjon i et minigen er fortrinnsvis valgt i henhold til retningslinjene angitt i det tidligere avsnittet. Et foretrukket middel for administrering av nukleinsyrer som koder for peptidene ifølge oppfinnelsen anvender minigenkonstruksjoner som koder for et peptid omfattende én eller multiple epitoper ifølge oppfinnelsen.

[0281] Anvendelse av multi-epitopminigener er beskrevet nedenfor og i Ishioka *et al.*, J. Immunol. 162:3915-3925, 1999; An, L. and Whitton, J. L., J. Virol. 71:2292, 1997; Thomson, S. A. *et al.*, J. Immunol. 157:822, 1996; Whitton, J. L. *et al.*, J. Virol. 67:348, 1993; Hanke, R. *et al.*, Vaccine 16:426, 1998. For eksempel kan et multi-epitop-DNA-plasmid som koder for supermotiv- og/eller motivbærende epitoper avledet PSCA, den PADRE™-universelle hjelpe-T-celleepitopen eller multiple HTL-epitoper fra PSCA (se *f.eks.* tabeller V-XVIII og XXII til

LI) og en endoplasmatisk retikulum-translokaliseringssignalsekvens konstrueres. En vaksine kan også omfatte epitoper som er avledet fra andre TAAer.

[0282] Immunogenisiteten av et multi-epitopisk minigen kan bekreftes i transgene mus for å bedømme størrelsen av CTL-induksjonsresponsen mot testete epitoper. Videre kan immunogenisiteten av DNA-kodete epitoper *in vivo* være i samsvar med *in vitro*-responsene av spesifikke CTL-linjer mot målceller transfektert med DNA-plasmidet. Således kan disse forsøkene vise at minigenet tjener til både: 1.) å generere en CTL-respons og 2.) som de induerte CTLene gjenkjente celler som uttrykker de kodede epitopene.

[0283] For eksempel for å skape en DNA-sekvens som koder for de valgte epitoper (minigen) for ekspresjon i humane celler kan aminosyresekvensene av epitopener være revers translatert. En human kodonanvendelsestabell kan anvendes til å guide kodonvalget for hver aminosyre. Disse epitopkodende DNA-sekvensene kan være direkte tilgrenset, slik at når translatert, en kontinuerlig polypeptidsekvens er dannet. For å optimalisere ekspresjon og/eller immunogenisitet kan ytterligere elementer innføres i minigendesignen. Eksempler på aminosyresekvenser som kan bli revers translatert og omfattet i minigensekvensen omfatter: HLA-klasse I-epitoper, HLA-klasse II-epitoper, antistoffepitoper, en ubiquitineringsignalsekvens og/eller et endoplasmatisk retikulum-målrettet signal. I tillegg kan HLA-presentasjon av CTL- og HTL-epitoper forbedres ved å omfatte syntetisk (*f.eks.* poly-alanin) eller naturlig forekommende flankesekvenser i naboposisjon til CTL- eller HTL-epitopene; disse større peptidene omfattende epitopen(e) er innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen.

[0284] Minigensekvensen kan omdannes til DNA ved sammling av oligonukleotider som koder for pluss og minus trådene til minigenet. Overlappende oligonukleotider (30-100 baser lange) kan syntetiseres, fosforyleres, renses og hybridiseres under passende betingelser ved anvendelse av velkjente teknikker. Endene av oligonukleotidene kan være bundet for eksempel ved anvendelse av T4 DNA-ligase. Dette syntetiske minigenet, som koder for epitoppolypeptidet, kan deretter bli klonet inn i en ønsket ekspresjonsvektor.

[0285] Standard regulatorsekvenser velkjente for fagfolk på området er fortrinnsvis omfattet i vektoren for å sikre ekspresjon i målcellene. Mange vektorelementer er ønskelig: en promotor med et nedstrøms kloningssete for minigeninsersjon; et polyadenyleringssignal for effektiv transkripsjonsterminering; en *E. coli*-replikasjonsorigo; og en *E. coli*-selektierbar markør (*f.eks.* ampicillin- eller kanamycinresistens). En rekke promotere kan anvendes for

dette formålet, *f.eks.* den humane cytomegalovirus (hCMV)-promoteren. Se *f.eks.* US-patent nr. 5.580.859 og 5.589.466 for andre egnete promotersekvenser.

[0286] Ytterligere vektormodifikasjoner kan være ønsket for å optimalisere minigenekspresjon og immunogenisitet. I noen tilfeller er introner nødvendige for effektiv genekspresjon og én eller flere syntetiske eller naturlig forekommende introner kunne bli innført i den transkriberte regionen av minigenet. Inklusjonen av mRNA-stabiliseringssekvenser og sekvenser for replikasjon i mammalske celler kan også bli betraktet for økning av minigenekspresjon.

[0287] Med én gang en ekspresjonsvektor er valgt er minigenet klonet inn i polylinkerregionen nedstrøms for promoteren. Dette plasmidet blir transformert inn i en passende *E. coli*-stamme og DNA blir fremstilt ved anvendelse av standardteknikker. Orienteringen og DNA-sekvensen av minigenet, så vel som alle andre elementer omfattet i vektoren, er bekreftet ved anvendelse av restriksjonskartlegging og DNA-sekvensanalyse. Bakterieceller som bærer det korrekte plasmidet kan lagres som en hovedcellebank og en arbeidscellebank.

[0288] I tillegg ser immunostimulerende sekvenser (ISSer eller CpGer) ut til å spille en rolle i immunogenisiteten av DNA-vaksiner. Disse sekvensene kan omfattes i vektoren, utenfor den minigenkodende sekvensen, om ønsket for å forbedre immunogenisitet.

[0289] I noen utførelsesformer kan en bisistronisk ("bicistronic") ekspresjonsvektor som tillater produksjon av både de minigenkodete epitopene og et annet protein (omfattet for å forbedre eller redusere immunogenisitet) anvendes. Eksempler på proteiner eller polypeptider som fordelaktig kunne forsterke immunresponsen hvis ko-uttrykt omfatter cytokiner (*f.eks.* IL-2, IL-12, GM-CSF), cytokininduserende molekyler (*f.eks.* LeIF), kostimulatoriske molekyler eller for HTL-responser, pan-DR-bindingsproteiner (PADRE™, Epimmune, San Diego, CA). Hjelpe-(HTL)-epitoper kan være bundet til intracellulære målrettede signaler og uttrykt separat fra uttrykte CTL-epitoper; dette tillater retning av HTL-epitopene til et cellekammer forskjellig enn det til CTL-epitopene. Hvis nødvendig kunne dette fasilere mer effektiv inntreden av HTL-epitoper inn i HLA-klasse II-reaksjonsveien, derved forbedring av HTL-induksjon. I motsetning til HTL- eller CTL-induksjon kan spesifikk minking av immunresponsen ved koekspresjon av immunosuppressive molekyler (*f.eks.* TGF- β) være fordelaktig i visse sykdommer.

[0290] Terapeutiske mengder av plasmid-DNA kan produseres for eksempel ved fermentering i *E. coli*, fulgt av rensning. Alikvoter fra arbeidscellebanken blir anvendt til å

inokulere vekstmedium og dyrket til metning i ristekolber eller en bioreaktor i henhold til velkjente teknikker. Plasmid-DNA kan renses ved anvendelse av standard biosepareringsteknologier slik som fastfase-anionbytterresiner levert av QIAGEN, Inc. (Valencia, California). Hvis nødvendig kan supertvunnet DNA isoleres fra de åpne sirkulære og lineære formene ved anvendelse av gelelektroforese eller andre fremgangsmåter.

[0291] Renset plasmid-DNA kan fremstilles for injeksjon ved anvendelse av en rekke formuleringer. Den enkleste av disse er rekonstituering av frysetørket DNA i sterile fosfatbufret saltløsning (PBS). Denne angrepmåten, kjent som "nakent DNA," er for tiden blitt anvendt for intramuskulær (IM)-administrering i kliniske forsøk. For å maksimere de immunoterapeutiske effektene av minigen-DNA-vaksinene kan en alternativ fremgangsmåte for formulering av rensed plasmid-DNA være ønskelig. En rekke fremgangsmåter er beskrevet og nye teknikker kan bli tilgjengelige. Kationiske lipider, glykolipider og fusogeniske liposomer kan også anvendes i formuleringen (se *f.eks.* som beskrevet av WO 93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6(7): 682 (1988); US-pat nr. 5.279.833; WO 91/06309; og Felgner, *et al.*, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 84:7413 (1987). I tillegg kunne peptider og forbindelser referert til kollektivt som beskyttende, interaktive, ikke-kondenserende forbindelser (PINC) også være kompleksert til rensed plasmid-DNA for å innvirke på variabler slik som stabilitet, intramuskulær dispersjon eller trafikkerings til spesifikke organer eller celletyper.

[0292] Målcelsesensibilisering kan anvendes som et funksjonelt forsøk for ekspresjon og HLA-klasse I-presentasjon av minigenkodete CTL-epitoper. For eksempel blir plasmid-DNAet innført i en mammalske cellelinje som er egnet som et mål for standard CTL-kromfrigjøringsforsøk. Transfeksjonsfremgangsmåten anvendt vil være avhengig av den endelige formuleringen. Elektroporering kan anvendes for "nakent" DNA, mens kationiske lipider tillater direkte *in vitro*-transfeksjon. Et plasmid som uttrykker grønt fluorescerende protein (GFP) kan være kotransfektet for å tillate anrikning av transfektete celler ved anvendelse av fluorescensaktivert celledatering (FACS). Disse cellene blir deretter krom-51 (⁵¹Cr)-merket og anvendt som målceller for epitopspesifikke CTL-linjer; cytolyse, detektert ved ⁵¹Cr-frigjøring, indikerer både produksjon og HLA-presentasjon av minigenkodete CTL-epitoper. Ekspresjon av HTL-epitoper kan evalueres på analog måte ved anvendelse av forsøk for å bedømme HTL-aktivitet.

[0293] *In vivo*-immunogenisitet er en annen angrepmåte for funksjonell testing av minigen-DNA-formuleringer. Transgene mus som uttrykker passende humane HLA-proteiner

er immunisert med DNA-produktet. Dosen og administreringsveien er formuleringsavhengig (*f.eks.* IM DNA i PBS, intraperitoneal (i.p.) for lipid-kompleksert DNA). Tjueen dager etter immunisering blir miltceller høstet og restimulert i én uke i nærværet av peptider som koder for hver testede epitop. Deretter, for CTL-effektorceller, blir forsøk utført for cytolyse av peptidladete, ^{51}Cr -merkete målceller ved anvendelse av standardteknikker. Lyse av målceller som ble sensibilisert ved HLA-ladet med peptidepitoper, svarende til minigenkodete epitoper, demonstrerer DNA-vaksinefunksjon for *in vivo*-induksjon av CTLer. Immunogenisitet av HTL-epitoper er bekreftet i transgene mus på analog måte.

[0294] Alternativt kan nukleinsyrene administreres ved anvendelse av ballistisk levering som beskrevet for eksempel i US-patent nr. 5.204.253. Ved anvendelse av denne teknikken blir partikler omfattet utelukkende DNA administrert. I en ytterligere alternativ utførelsesform kan DNA være adherert til partikler slik som gullpartikler.

[0295] Minigener kan også leveres ved anvendelse av andre bakterielle eller virale leveringssystemer velkjente på området, *f.eks.* kan en ekspresjonskonstruksjon som koder for epitoper ifølge oppfinnelsen innføres i en viral vektor slik som vaccinia.

X.C.2. Kombinasjoner av CTL-peptider med hjelpepeptider

[0296] Vaksinesammensetninger omfattende CTL-peptider ifølge oppfinnelsen kan modifiseres, *f.eks.* analoges, for å tilveiebringe ønskete kjennetegn, slik som forbedret serumhalveringstid, utvidet populasjonsdekning eller forbedret immunogenisitet.

[0297] For eksempel kan evnen til et peptid for å fremkalle CTL-aktivitet forbedres ved kobling av peptidet til en sekvens som inneholder minst én epitop som kan fremkalle en T-hjelpecellerespons. Selv om et CTL-peptid kan være direkte bundet til et T-hjelpepeptid er ofte CTL-epitop-/HTL-epitopkonjugater bundet av et spacermolekyl. Spaceren er typisk omfattet av relativt små, nøytrale molekyler, slik som aminosyrer eller aminosyremimetika, som hovedsakelig er uladete under fysiologiske betingelser. Spacerene er typisk valgt fra *f.eks.* Ala, Gly eller andre nøytrale spacere av ikke-polare aminosyrer eller nøytral polare aminosyrer. Det vil forstås at den eventuelt til stede spaceren ikke trenger være omfattet av samme residuer og kan således være en hetero- eller homo-oligomer. Når til stede vil spaceren vanligvis være minst én eller to residuer, mer vanlig tre til seks residuer og noen ganger 10 eller flere residuer. CTL-peptidepitopen kan være bundet til T-hjelpepeptidepitopen enten direkte eller via en spacer enten ved amino- eller karboksyterminusen av CTL-peptidet. Aminotermi- nusen av enten det immunogene peptidet eller T-hjelpepeptidet kan acyleres.

[0298] HTL-peptidepitoper kan også modifiseres for å endre deres biologiske egenskaper. For eksempel kan de modifiseres til å omfatte D-aminosyrer for å øke deres resistens mot proteaser og således forlenge deres serumhalveringstid, eller de kan bli konjugert til andre molekyler slik som lipider, proteiner, karbohydrater og lignende for å øke deres biologiske aktivitet. For eksempel kan et T-hjelpepeptid være konjugert til én eller flere palmitinsyrekjeder på enten amino- eller karboksylterminalen.

X.C.3. Kombinasjoner av CTL-peptider med T-celle-primingsmidler

[0299] I noen utførelsesformer kan det være ønskelig å inkludere i de farmasøytiske sammensetningene ifølge oppfinnelsen minst én komponent som primer B-lymfocytter eller T-lymfocytter. Lipider er identifisert som midler som er i stand til priming av CTL *in vivo*. For eksempel kan palmitinsyresiduer være bundet til ϵ - og α -aminogrupper til en lysinresidue og deretter bundet, f.eks. via én eller flere linkingresiduer, slik som Gly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser eller lignende, til et immunogent peptid. Det lipiderte peptidet kan deretter administreres enten direkte i en micelle eller partikkel, innført i en liposom eller emulgert i en adjuvans, f.eks. ufullstendig Freund's adjuvans. I en foretrukket utførelsesform omfatter en spesielt effektiv immunogensammensetning palmitinsyre bundet til ϵ - og α -aminogrupper til Lys, som er tilknyttet via binding, f.eks. Ser-Ser, til aminoterminusen til det immunogene peptidet.

[0300] Som et annet eksempel på lipidpriming av CTL-responser kan *E. coli*-lipoproteiner, slik som tripalmitoyl-S-glycerylcysteinylserin (P₃CSS) anvendes til å prime virusspesifikk CTL når kovalent bundet til et passende peptid (se f.eks. Deres, *et al.*, Nature 342:561, 1989). Peptider ifølge oppfinnelsen kan kobles til for eksempel P₃CSS, og lipopeptidet administreres til et individ for å prime spesifikt en immunrespons på målantigenet. Videre, fordi induksjon av nøytraliserende antistoffer også kan være primet med P₃CSS-konjugerte epitoper, kan to slike sammensetninger kombineres til mer effektivt å fremkalle både humorale og cellemederte responser.

X.C.4. Vaksinesammensetninger omfattende DC pulserte med CTL- og/eller HTL-peptider

[0301] En utførelsesform av en vaksinesammensetning omfatter *ex vivo*-administrering av en cocktail av epitopbærende peptider til PBMC, eller isolert DC derfra, fra pasientens blod. Et farmasøytisk middel for å lette høsting av DC kan anvendes slik som Progenipoietin™ (Pharmacia-Monsanto, St. Louis, MO) eller GM-CSF/IL-4. Etter pulsering av DCen med peptider og før reinfusjon i pasienter blir DCen vasket for å fjerne ubundne peptider. I denne

utførelsesformen omfatter en vaksine peptidpulserte DCer som presenterer de pulserte peptidepitopene kompleksert med HLA-molekyler på deres overflater.

[0302] DCen kan bli pulsert *ex vivo* med en kocktail av peptider, noen av hvilke som stimulerer CTL-responser til PSCA. Eventuelt kan et hjelpe-T-celle (HTL)-peptid, slik som et naturlig eller kunstig løst begrenset HLA-klasse II-peptid, omfattes for å lette CTL-responsen. Således blir en vaksine i henhold til oppfinnelsen anvendt for å behandle kreft som uttrykker eller overuttrykker PSCA.

X.D.) Adoptiv immunoterapi

[0303] Antigene PSCA-relaterte peptider blir dessuten anvendt for å fremkalle en CTL- og/eller HTL-respons *ex vivo*. De resulterende CTL- eller HTL-cellene kan anvendes for å behandle tumorer hos pasienter som ikke responderer til andre konvensjonelle former for terapi eller ikke vil respondere på et terapeutisk vaksinepeptid eller -nukleinsyre i henhold til oppfinnelsen. *Ex vivo* CTL- eller HTL-responser på et spesielt antigen er indusert ved innkubering i vevkultur pasientens, eller genetisk kompatible, CTL- eller HTL-forløperceller sammen med en kilde for antigenpresenterende celler (APC), slik som dendritiske celler, og det passende immunogene peptidet. Etter en passende innkuberingstid (typisk ca. 7-28 dager), hvor forløpercellene er aktivert og utvidet til effektorceller, blir cellene infusert tilbake i pasienten, hvor de vil destruere (CTL) eller lette destruksjon (HTL) av deres spesifikke målcelle (*f.eks.* en tumorcelle). Transfektete dendritiske celler kan også anvendes som antigenpresenterende celler.

X.E.) Administrering av vaksiner for terapeutiske eller profylaktiske formål

[0304] Farmasøytiske midler og vaksinesammensetninger blir typisk anvendt for å behandle og/eller forhindre kreft som uttrykker eller overuttrykker PSCA. I terapeutiske applikasjoner blir peptid- og/eller nukleinsyresammensetninger administrert til en pasient i en mengde tilstrekkelig for å fremkalle en effektiv B-celle-, CTL- og/eller HTL-respons på antigenet og til å kurere eller minst delvis stanse eller sakne symptomer og/eller komplikasjoner. En mengde tilstrekkelig til å gjennomføre dette er definert som "terapeutisk effektive dose." Mengder effektive for denne anvendelsen vil avhenge av *f.eks.* den spesielle sammensetningen administrert, administreringsfremgangsmåten, trinnet og alvorlighetsgraden av sykdommen som behandles, vekten og generelle helsetilstanden til pasienten og bedømmelsen til den foreskrivende legen.

[0305] For farmasøytiske sammensetninger blir de immunogene peptidene ifølge oppfinnelsen, eller DNA som koder for dem, generelt administrert til et individ som allerede

bærer en tumor som uttrykker PSCA. Peptidene eller DNA som koder for dem kan administreres individuelt eller som fusjoner av én eller flere peptidsekvenser. Pasienter kan som passende behandles med de immunogene peptidene separat eller sammen med andre behandlinger slik som kirurgi.

[0306] For terapeutisk anvendelse skulle administrering generelt begynne ved den første diagnosen av PSCA-assosiert kreft. Dette er fulgt av forsterkningsdoser ("boosting doser") inntil minst symptomer er hovedsakelig dempet og for en periode deretter. Utførelsesformen av vaksinesammensetningen (dvs. omfattende, men ikke begrenset til utførelsesformer slik som peptidcocktailer, polyepitopiske polypeptider, minigener eller TAA-spesifikke CTLer eller pulserte dendritiske celler) levert til pasienten kan variere i henhold til trinnet av sykdommen eller pasientens helsestatus. For eksempel hos en pasient med en tumor som uttrykker PSCA kan en vaksine omfattende PSCA-spesifikk CTL være mer effektiv i drap av tumorceller i pasient med langt fremskredet sykdom enn alternative utførelsesformer.

[0307] Det er generelt viktig for å tilveiebringe en mengde av peptidepitopen levert ved en administreringsfremgangsmåte tilstrekkelig til å stimulere effektivt en cytotoxisk T-cellerespons; sammensetninger som stimulerer hjelpe-T-celleresponser kan også være tilveiebrakt i henhold til denne utførelsesformen ifølge oppfinnelsen.

[0308] Dosen for en innledende terapeutisk immunisering forekommer generelt i et enhetsdoseområde hvor den lavere verdien er ca. 1, 5, 50, 500 eller 1.000 µg og den høyere verdien er ca. 10.000; 20.000; 30.000; eller 50.000 µg. Doseverdier for et menneske varierer typisk fra ca. 500 µg til ca. 50.000 µg pr. 70 kg. pasient. Forsterkningsdoser på mellom ca. 1,0 µg til ca. 50.000 µg peptid i samsvar med et forsterkningsregime over uker til måneder kan administreres avhengig av pasientens respons og forhold som bestemt ved å måle den spesifikke aktiviteten til CTL og HTL oppnådd fra pasientens blod. Administrering skal fortsette inntil minst kliniske symptomer eller laboratorietester indikerer at neoplasien blir fjernet eller redusert og for en periode deretter. Dosene, administreringsfremgangsmåtene og doseregimene blir regulert i henhold til fremgangsmåter kjent på området.

[0309] I visse utførelsesformer blir peptidene og sammensetningene ifølge foreliggende oppfinnelse anvendt i alvorlig sykdomstilstander, dvs. livstruende eller potensielt livstruende situasjoner. I slike tilfeller, som et resultat av de minimale mengdene av ytre substanser og den relativt ikke-toksiske naturen til peptidene i foretrukne sammensetninger ifølge oppfinnelsen, er det mulig og kan være følt ønskelig ved behandlingen av lege å administrere vesentlige overskudd av disse peptidsammensetninger i forhold til disse angitt dosemengder.

[0310] Vaksinesammensetningene kan også anvendes utelukkende som profylaktiske midler. Generelt dosen for en innledende profylaktisk immunisering forekommer generelt i et enhetsdoseområde hvor den lavere verdien er ca. 1, 5, 50, 500 eller 1000 µg og den høyere verdien er ca. 10.000; 20.000; 30.000; eller 50.000 µg. Doseverdier for et menneske varierer typisk fra ca. 500 µg til ca. 50.000 µg pr. 70 kg. pasient. Dette er fulgt av forsterkningsdoser på mellom ca. 1,0 µg til ca. 50.000 µg av peptid administrert ved definerte intervaller fra omtrent fire uker til seks måneder etter den innledende administreringen av vaksine. Immunogenisiteten av vaksinen kan bedømmes ved å måle den spesifikke aktiviteten til CTL og HTL oppnådd fra en prøve av pasientens blod.

[0311] De farmasøytiske sammensetningene for terapeutisk behandling er ment for parenteral, topisk, oral, nasal, intratekal eller lokal (*f.eks.* som en krem eller topisk salve) administrering. Fortrinnsvis blir de farmasøytiske sammensetningene administrert parentalt, *f.eks.* intravenøst, subkuttant, intradermalt eller intramuskulært. Således beskrives sammensetninger for parenteral administrering som omfatter en løsning av de immunogene peptidene oppløst eller suspendert i en akseptabel bærer, fortrinnsvis en vandig bærer.

[0312] En rekke vandig bærere kan anvendes, *f.eks.* vann, bufret vann, 0,8% saltløsning, 0,3% glycin, hyaluronsyre og lignende. Disse sammensetningene kan steriliseres ved konvensjonelle, velkjente steriliseringsteknikker eller kan bli steriltfiltrert. De resulterende vandige løsningene kan pakkes for anvendelse som de er eller frysetørket, den frysetørkede fremstillingen blir kombinert med en steril løsning før administrering.

[0313] Sammensetningene kan inneholde farmasøytisk akseptable hjelpesubstanser som nødvendig til omtrentlige fysiologiske betingelser, slik som pH-regulering og buffermidler, tonisitsregulerende midler, fuktamidler, konserveringsmidler og lignende, for eksempel natriumacetat, natriumlaktat, natriumklorid, kaliumklorid, kalsiumklorid, sorbitanmonolaurat, trietanolamin oleat, etc.

[0314] Konsentrasjonen av peptider ifølge oppfinnelsen i de farmasøytiske formuleringene kan variere sterkt, *dvs.* fra mindre enn ca. 0,1%, vanligvis på eller minst ca. 2% til så meget som 20% til 50% eller mer etter vekt og vil velges primært ved væskevolumer, viskositeter, etc., i henhold til den valgte spesielle administreringsfremgangsmåten.

[0315] En human enhetsdoseform av en sammensetning er typisk omfattet i en farmasøytisk sammensetning som omfatter en human enhetsdose av en akseptabel bærer, i én utførelsesform en vandig bærer, og blir administrert i et volum/mengde som er kjent av

fagfolk på området som skal anvendes for administrering av slike sammensetninger til mennesker (se *f.eks.* Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, A. Gennaro, Editor, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985). For eksempel kan en peptiddose for innledende immunisering være fra ca. 1 til ca. 50.000 µg, generelt 100-5.000 µg, for en 70 kg pasient. For eksempel for nukleinsyrer kan en innledende immunisering utføres ved anvendelse av en ekspresjonsvektor i form av nakent nukleinsyre administrert IM (eller SC eller ID) i mengdene av 0,5-5 mg på multiple steder. Nukleinsyren (0,1 til 1000 µg) kan også administreres ved anvendelse av en genpistol. Etter en innkuberingsperiode på 3-4 uker blir en forsterkningsdose deretter administrert. Forsterkeren kan være rekombinant fowlpoxvirus administrert i en dose på $5 \cdot 10^7$ til $5 \cdot 10^9$ pfu.

[0316] For antistoffer involverer en behandling generelt gjentatt administrering av anti-PSCA-antistoffremstillingen, via en akseptabel administreringsvei slik som intravenøs injeksjon (IV), typisk i en dose i området ca. 0,1 til ca. 10 mg/kg kroppsvekt. Generelt er doser i området 10-500 mg MAb pr. uke effektive og godt tolererte. Videre representerer en innledende "loading dose" på omtrent 4 mg/kg pasientkroppsvekt IV, fulgt av ukentlige doser på ca. 2 mg/kg IV av anti-PSCA-MAb-fremstillingen et akseptabel doseringsregime. Som anerkjent av fagfolk på området kan forskjellige faktorer innvirke på den ideelle dosen i et spesielt tilfelle. Slike faktorer omfatter for eksempel halveringstid av en sammensetning, bindingsaffiniteten til en Ab, immunogenisiteten til en substans, graden av PSCA-ekspresjon hos pasienten, omfanget av sirkulerende felt PSCA-antigen, det ønskede likevektskonsentrasjonsnivået, behandlingsfrekvens og innvirkningen av kjemoterapeutisk midler eller andre midler anvendt i kombinasjon med behandlingsfremgangsmåten beskrevet heri, så vel som helsestatusen til en spesiell pasient. Ikke-begrensede foretrukne humane enhetsdoser er for eksempel 500µg - 1 mg, 1 mg - 50 mg, 50 mg - 100 mg, 100 mg - 200 mg, 200 mg - 300 mg, 400 mg - 500 mg, 500 mg - 600 mg, 600 mg - 700 mg, 700 mg - 800 mg, 800 mg - 900 mg, 900 mg - 1 g eller 1 mg - 700 mg. I visse utførelsesformer er dosen i et område på 2-5 mg/kg kroppsvekt, *f.eks.* fulgt av ukentlige doser på 1-3 mg/kg; 0,5 mg, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mg/kg kroppsvekt fulgt, *f.eks.* i to, tre eller fire uker av ukentlige doser; 0,5 - 10 mg/kg kroppsvekt, *f.eks.* fulgt i to, tre eller fire uker av ukentlige doser; 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 mg m² av kroppsoverflate ukentlig; 1-600 mg m² av kroppsoverflate ukentlig; 225-400 mg m² av kroppsoverflate ukentlig; disse doser kan følges av ukentlige doser i 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19, 11, 12 eller flere uker.

[0317] I én utførelsesform omfatter humane enhetsdoseformer av polynukleotider et egnet doseområde eller effektiv mengde som tilveiebringer hvilken som helst terapeutisk effekt. Som anerkjent av en fagmann på området avhenger en terapeutisk effekt av flere faktorer, omfattende sekvensen av polynukleotidet, molekylvekt av polynukleotidet og administreringsvei. Doser er generelt valgt av legen eller annet profesjonelt helsepersonell i henhold til en rekke parametere kjent på området, slik som alvorlighetsgrad av symptomer, pasienthistorie og lignende. Generelt, for et polynukleotid på ca. 20 baser, kan et doseområde velges fra for eksempel en uavhengig valgt lavere grense slik som ca. 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 eller 500 mg/kg opptil en uavhengig valgt øvre grense, større enn den nedre grensen, på ca. 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 eller 10.000 mg/kg. For eksempel en dose kan være omtrent hvilken som helst av de følgende: 0,1 til 100 mg/kg, 0,1 til 50 mg/kg, 0,1 til 25 mg/kg, 0,1 til 10 mg/kg, 1 til 500 mg/kg, 100 til 400 mg/kg, 200 til 300 mg/kg, 1 til 100 mg/kg, 100 til 200 mg/kg, 300 til 400 mg/kg, 400 til 500 mg/kg, 500 til 1000 mg/kg, 500 til 5000 mg/kg eller 500 til 10.000 mg/kg. Generelt kan parenterale administreringsfremgangsmåter kreve høyere doser av polynukleotid sammenlignet med mer direkte anvendelse av nukleotidet til sykdomsvev, som gjør polynukleotider av økende lengde.

[0318] I én utførelsesform omfatter humane enhetsdoseformer av T-celler et egnet doseområde eller effektiv mengde som tilveiebringer hvilken som helst terapeutisk effekt. Som anerkjent av en fagmann på området avhenger en terapeutisk effekt av flere faktorer. Doser er generelt valgt av legen eller annet profesjonelt helsepersonell i henhold til en rekke parametere kjent på området, slik som alvorlighetsgrad av symptomer, pasienthistorie og lignende. En dose kan være ca. 10^4 celler til ca. 10^6 celler, ca. 10^6 celler til ca. 10^8 celler, ca. 10^8 til ca. 10^{11} celler eller ca. 10^8 til ca. 5×10^{10} celler. En dose kan også være ca. 10^6 celler/m² til ca. 10^{10} celler/m² eller ca. 10^6 celler/m² til ca. 108 celler/m².

[0319] Proteiner(-ene) ifølge oppfinnelsen og/eller nukleinsyrer som koder for proteinet(ene), kan også administreres via liposomer, som også kan tjene til: 1) å måle proteinet(ene) til et spesielt vev, slik som lymfoidvev; 2) å måle selektivitet til sykdomsceller; eller 3) å øke halveringstiden til peptidsammensetningen. Liposomer omfatter emulsjoner, skum, miceller, uoppløselige monolag, flytende krystaller, fosfolipiddispersjoner, lamellag ("lamellar layer") og lignende. I disse fremstillingene er peptidet som blir levert innkorporert som del av et liposom, alene eller sammen med et molekyl som binder til en reseptor utbredt

blant lymfoide celler, slik som monoklonale antistoffer som binder til CD45-antigenet eller med andre terapeutiske eller immunogene sammensetninger. Således kan liposomer enten fylt eller dekorert med et ønsket peptid ifølge oppfinnelsen være rettet mot setet til lymfoide celler, hvor liposomene deretter leverer peptidsammensetningene. Liposomer for anvendelse i henhold til oppfinnelsen blir dannet fra standard blæredannende lipider, som generelt omfatter nøytrale og negativt ladete fosfolipider og en sterol slik som kolesterol. Seleksjonen av lipider er generelt guidet ved betraktning av *f.eks.* liposomstørrelse, syrelabilitet og stabilitet av liposomene i blodstrømmen. En rekke fremgangsmåter er tilgjengelige for fremstilling av liposomer, som beskrevet i *f.eks.* Szoka, *et al.*, Ann. Rev. Biophys. Bioeng. 9:467 (1980) og US-patent nr. 4.235.871, 4.501.728, 4.837.028 og 5.019.369.

[0320] For målrettede celler i immunsystemet kan en ligand som blir innført i liposomet omfatte *f.eks.* antistoffer eller fragmenter derav spesifikke for celleoverflatedeterminanter av de ønskede immunsystemceller. En liposomsuspensjon inneholdende et peptid kan administreres intravenøst, lokalt, topisk, etc. i en dose som varierer i henhold til, bl.a. administreringsfremgangsmåten, peptidet som blir levert og trinnet av sykdommen som behandles.

[0321] For faste sammensetninger kan konvensjonelle ikke toksiske faste bærere anvendes som omfatter for eksempel farmasøytiske kvaliteter av mannitol, laktose, stivelse, magnesiumstearat, natriumsakkarin, talk, cellulose, glukose, sukrose, magnesiumkarbonat og lignende. For oral administrering blir en farmasøytisk akseptabel ikke-toksisk sammensetning dannet ved innkorporering av hvilken som helst av de normalt anvendte tilsetningsmidlene, slik som de bærerne tidligere listet opp og generelt 10-95% av aktiv bestanddel, dvs. ett eller flere peptider ifølge oppfinnelsen og mer foretrukket i en konsentrasjon på 25%-75%.

[0322] For aerosoladministrering er immunogene peptider fortrinnsvis tilført i findelt form sammen med et overflateaktivt middel og drivmiddel. Typiske prosentdelene av peptider er ca. 0,01%-20 vekt%, fortrinnsvis ca. 1%-10%. Det overflateaktive midlet må selvfølgelig være ikke-toksisk og fortrinnsvis oppløselig i drivmiddelet. Representative for slike midler er esterne eller partielle estere av fettsyrer inneholdende fra ca. 6 til 22 karbonatomer, slik som kapron-, oktan-, laurin-, palmitin-, stearin-, linol-, linolen-, olesterin- ("olestERIC") og oleinsyrer med en alifatisk polyhydriks alkohol eller dens sykliske anhydrid. Blandete estere slik som blandete eller naturlige glycerider kan anvendes. Det overflateaktive midlet kan utgjøre ca. 0,1%-20 vekt% av sammensetningen, fortrinnsvis ca. 0,25-5%. Balansen av

sammensetningen er vanligvis drivmiddel. En bærer kan også være omfattet hvis ønsket som med *f.eks.* lecitin for intranasal levering.

XI.) Diagnostiske og prognostiske utførelsesformer av PSCA.

[0323] Som beskrevet her blir PSCA-polynukleotider, polypeptider, reaktive cytotoksisk T-celler (CTL), reaktive hjelpe-T-celler (HTL) og antipolypeptidantistoffer anvendt i velkjente diagnostiske, prognostiske og terapeutiske forsøk som eksaminer lidelser forbundet med dysregulert cellevekst slik som kreft, spesielt kreften listet opp i tabell I (se *f.eks.* både dens spesifikke mønster av vevsekspresjon så vel som dens overekspresjon i visse kreft som beskrevet for eksempel i eksemplet betegnet “Ekspresjonsanalyse av PSCA i normalt vev og pasientprøver”).

[0324] PSCA kan bli analogisert til et prostata assosiert antigen PSA, den arketypiske markøren som har vært anvendt av medisinske praktiserende leger for år for å identifisere og monitorere tilstedeværelsen av prostatakreft (se *f.eks.* Merrill *et al.*, J. Urol. 163(2): 503-5120 (2000); Polascik *et al.*, J. Urol. Aug; 162(2):293-306 (1999) og Fortier *et al.*, J. Nat. Cancer Inst. 91(19): 1635-1640(1999)). En rekke andre diagnostisk markører er også anvendt i lignende sammenhenger omfattende p53 og K-ras (se *f.eks.* Tulchinsky *et al.*, Int J Mol Med 1999 Jul 4(1):99-102 og Minimoto *et al.*, Cancer Detect Prev 2000;24(1):1-12). Derfor tillater denne beskrivelsen av PSCA-polynukleotider og polypeptider (så vel som PSCA-polynukleotidprober og anti-PSCA-antistoffer anvendt for å identifisere tilstedeværelsen av disse molekylerne) og deres egenskaper fagfolk til å anvende disse molekylerne ved fremgangsmåter som er analoge med de anvendte, for eksempel i en rekke diagnostiske forsøk rettet mot undersøkelse av lidelser forbundet med kreft.

[0325] Typiske utførelsesformer av diagnostiske fremgangsmåter som anvender PSCA-polynukleotidene, polypeptidene, reaktive T-cellene og antistoffene er analoge med de fremgangsmåtene fra veletablerte diagnostiske forsøk, som å anvende *f.eks.* PSA-polynukleotider, polypeptider, reaktive T-celler og antistoffer. For eksempel liksom PSA-polynukleotider blir anvendt som prober (for eksempel i Northern-analyse, se *f.eks.* Sharief *et al.*, Biochem. Mol. Biol. Int. 33(3):567-74(1994)) og primere (for eksempel i PCR-analyse, se *f.eks.* Okegawa *et al.*, J. Urol. 163(4): 1189-1190 (2000)) for å observere tilstedeværelsen og/eller nivået av PSA-mRNAer ved fremgangsmåter for overvåkning av PSA-overekspresjon eller metastasen av prostatakreft, PSCA-polynukleotidene beskrevet her kan anvendes på samme måte for å detektere PSCA-overekspresjon eller metastasen av prostata og annen kreft som uttrykker dette genet. Alternativt, liksom PSA-polypeptider blir anvendt for å danne

antistoffer spesifikke for PSA som deretter kan anvendes for å observere tilstedeværelsen og/eller nivået av PSA-proteiner ved fremgangsmåter for å overvåke PSA-proteinoverekspresjon (se *f.eks.* Stephan *et al.*, Urology 55(4):560-3 (2000)) eller metastasen til prostataceller (se *f.eks.* Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3):233-7 (1996)), kan PSCA-polypeptidene beskrevet her anvendes for å danne antistoffer for anvendelse i detektering av PSCA-overekspresjon eller metastasen av prostataceller og celler av annen kreft som uttrykker dette genet.

[0326] Spesifikt, fordi metastaser involverer bevegelsen av kreftceller fra et opprinnelsesorgan (slik som lungen eller prostatakjertel etc.) til et forskjellig område av kroppen (slik som en lymfeknute), kan forsøk som eksaminerer en biologisk prøve for tilstedeværelsen av celler som uttrykker PSCA-polynukleotider og/eller polypeptider anvendes for å tilveiebringe bevis på metastase. For eksempel når en biologisk prøve fra vev som ikke normalt inneholder PSCA-uttrykkende celler (lymfeknute) er funnet å inneholde PSCA-uttrykkende celler slik som PSCA-ekspresjonen sett i LAPC4 og LAPC9, xenografter isolert fra henholdsvis lymfeknute og benmetastase, er dette funnet indikativt for metastase.

[0327] Alternativt PSCA-polynukleotider og/eller polypeptider kan anvendes for å tilveiebringe bevis på kreft, for eksempel når celler i en biologisk prøve som ikke normalt uttrykker PSCA eller uttrykker PSCA på et ulikt nivå er funnet å uttrykke PSCA eller ha en øket ekspresjon av PSCA (se *f.eks.* PSCA-ekspresjonen i kreftene listet opp i tabell I og i pasientprøver etc. vist i de ledsagende figurene). I slike forsøk kan fagfolk videre ønske å danne supplerende bevis på metastase ved testing av den biologiske prøven for tilstedeværelsen av en annet vevsbegrenset markør (i tillegg til PSCA) slik som PSA, PSCA etc. (se *f.eks.* Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-237 (1996)).

[0328] Anvendelse av immunohistokjemi for å identifisere tilstedeværelsen av et PSCA-polypeptid innen et vevssnitt kan indikere en endret tilstand av visse celler innen det vevet. Det er godt forstått på området at evnen for et antistoff til å lokalisere til et polypeptid som er uttrykt i kreftceller er en måte for diagnostisering av tilstedeværelsen av sykdom, sykdomstrinn, progresjon og/eller tumoraggressivitet. Et slikt antistoff kan også detektere en endret fordeling av polypeptidet innen kreftcellene sammenlignet med tilsvarende ikke-ondartet vev.

[0329] PSCA-polypeptidet og immunogene sammensetninger er også anvendelige i betraktning av fenomenene av endret subcellulær proteinlokalisering i sykdomstilstander. Endring av celler fra normal til sykdomstilstand forårsaker endringer i cellulær morfologi og er ofte forbundet med endringer i subcellulær proteinlokalisering/-fordeling. For eksempel

kan cellemembranproteiner som er uttrykt på en polarisert måte i normale celler endres i sykdom, hvilket resulterer i fordeling av proteinet på en ikke-polar måte over hele celleoverflaten.

[0330] Fenomenet endret subcellulær proteinlokalisering i en sykdomstilstand er demonstrert med MUC1- og Her2-proteinekspresjon ved anvendelse av immunohistokjemiske midler. Normale epitelceller har en typisk apikal fordeling av MUC1, i tillegg til noe supranukleær lokalisering av glykoproteinet, mens ondartet lesjoner ofte demonstrerer et apolart merkingsmønster (Diaz et al, *Breast Journal*, 7; 40-45 (2001); Zhang et al, *Clinical Cancer Research*, 4; 2669-2676 (1998); Cao, et al, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 45: 1547-1557 (1997)). I tillegg er normalt brystepitel enten negativ for Her2-protein eller oppviser bare en basolateral fordeling mens ondartede celler kan uttrykke proteinet over hele celleoverflaten (De Potter, et al, *International Journal of Cancer*, 44; 969-974 (1989); McCormick, et al, 117; 935-943 (2002)). Alternativt kan fordeling av proteinet endres fra en kun overflatelokalisering til å omfatte diffus cytoplasmatiske ekspresjon i sykdomstilstanden. Et slikt eksempel kan sees med MUC1 (Diaz, et al, *The Breast Journal*, 7: 40-45 (2001)).

[0331] Endring i lokaliseringen/fordelingen av et protein i cellen, som detektert ved immunohistokjemiske fremgangsmåter, kan også tilveiebringe verdifull informasjon angående gunstigheten av visse behandlingsmodaliteter. Dette siste punktet er illustrert ved en situasjon hvor et protein kan være intracellulær i normalt vev, men celleoverflate i ondartede celler; celleoverflatelokalisasjonen gjør cellene fordelaktig mottagelig for antistoffbasert diagnostikk og behandlingsregimer. Når en slik endring av proteinlokalisering forekommer for PSCA, er PSCA-proteinet og immunresponser relatert dertil meget anvendelige. Følgelig fremstiller evnen til å bestemme hvorvidt endring av subcellulær proteinlokalisering skjedde i 24P4C12-PSCA-proteinet og immunresponser relatert dertil meget anvendelige. Anvendelse av PSCA-sammensetningene tillater fagfolk på området å fremstille viktig diagnostisk og terapeutisk beslutninger.

[0332] Immunohistokjemiske reagenser spesifikke for PSCA er også anvendelige for å detektere metastaser av tumorer som uttrykker PSCA når polypeptidet synes i vev hvor PSCA ikke normalt er produsert.

[0333] Således er PSCA-polypeptider og antistoffer som er et resultat av immunresponser dertil anvendelige i en rekke viktige sammenhenger slik som diagnostiske, prognostiske, preventive og/eller terapeutiske formål kjent for fagfolk på området.

[0334] Liksom PSA-polynukleotidfragmenter og polynukleotidvarianter blir anvendt av fagfolk for anvendelse ved fremgangsmåter for overvåkning av PSA, blir PSCA-polynukleotidfragmenter og polynukleotidvarianter anvendt på analog måte. Spesielt er typiske PSA-polynukleotider anvendt ved fremgangsmåter for overvåkning av PSA prober eller primere som består av fragmenter av PSA-cDNA-sekvensen. For å illustrere dette må primere anvendt til å PCR-amplifisere et PSA-polynukleotid omfatte mindre enn hele PSA-sekvensen for å fungere i polymerasekjedereaksjonen. I sammenheng med slike PCR-reaksjoner frembringer fagfolk generelt en rekke forskjellige polynukleotidfragmenter som kan anvendes som primere for å amplifisere forskjellige deler av et interessant polynukleotid eller til å optimalisere amplifiseringsreaksjoner (se *f.eks.* Caetano-Anolles, G. *Biotechniques* 25(3): 472-476, 478-480 (1998); Robertson *et al.*, *Methodes Mol. Biol.* 98:121-154 (1998)). En ytterligere illustrasjon av anvendelsen av slike fragmenter er tilveiebrakt i eksemplet betegnet "Ekspresjonsanalyse av PSCA i normalt vev og pasientprøver," hvor et PSCA-polynukleotidfragment blir anvendt som en probe for å vise ekspresjon av PSCA-RNAer i kreftceller. I tillegg er variant av polynukleotidsekvenser typisk anvendt som primere og prober for de tilsvarende mRNAene i PCR- og Northern-analyser (se *f.eks.* Sawai *et al.*, *Fetal Diagn. Ther.* 1996 Nov-Dec 11(6):407-13 og *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unit 2, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995)). Polynukleotidfragmenter og varianter er anvendelige i denne sammenhengen hvor de er i stand til å binde til en målpolynukleotidsekvens (*f.eks.* et PSCA-polynukleotid vist i figur 1 eller variant derav) ved betingelser av høy stringens.

[0335] Videre kan PSA-polypeptider som inneholder en epitop som gjenkjennes av et antistoff eller T-celle som spesifikt binder til den epitopen bli anvendt ved fremgangsmåter for overvåkning av PSA. PSCA-polypeptidfragmenter og polypeptidanaloger eller varianter kan også anvendes på analog måte. Denne praksisen av anvendelse av polypeptidfragmenter eller polypeptidvarianter for å danne antistoffer (slik som anti-PSA-antistoffer eller T-celler) er typisk på området med en rekke systemer slik som fusjonsproteiner som anvendes av praktiserende leger (se *f.eks.* *Current Protocols In Molecular Biology*, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995). I denne sammenhengen funksjoner hver epitop(er) for å tilveiebringe arkitekturen med hvilken et antistoff eller T-celle er reaktiv. Fagfolk frembringe typisk en rekke forskjellige polypeptidfragmenter som kan anvendes for å generere immunresponser spesifikke for forskjellig deler av et interessant polypeptid (se *f.eks.* US-patent nr. 5.840.501 og US-patent nr. 5.939.533). For eksempel kan det være foretrukket å

anvende et polypeptid omfattende én av de PSCA-biologiske motivene beskrevet her eller en motivbærende subsekvens som er lett identifisert av fagfolk på området basert på motiver tilgjengelig på området. Polypeptidfragmenter, varianter eller analoger er typisk anvendelige i denne sammenhengen så lenge de omfatter en epitop som er i stand til dannelsen av et antistoff eller T-celle spesifikk for en målpolypeptidsekvens (*f.eks.* et PSCA-polypeptid vist i figur 1).

[0336] Som vist her viser PSCA-polynukleotidene og polypeptidene (så vel som PSCA-polynukleotidprobene og anti-PSCA-antistoffene eller T-celler anvendt for å identifisere tilstedeværelsen av disse molekylene) spesifikke egenskaper som gjør dem anvendelige i diagnoser av kreft slik som de listet opp i tabell I. Diagnostiske forsøk som måler tilstedeværelsen av PSCA-genprodukter, for å evaluere tilstedeværelsen eller begynnelsen av en sykdomstilstand beskrevet her, slik som prostatakreft, blir anvendt for å identifisere pasienter for preventive målinger eller videre overvåkning, som blir utført så med hell med PSA. Videre tilfredsstiller disse materialene et behov på området for molekyler som har lignende eller komplementær karakteristika til PSA i situasjoner hvor for eksempel en definitiv diagnose av metastase av prostatisk opprinnelse ikke kan bli gjort på basisen av en test for PSA alene (se *f.eks.* Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3): 233-237 (1996)) og følgelig trenger materialer slik som PSCA-polynukleotider og polypeptider (så vel som PSCA-polynukleotidprobene og anti-PSCA-antistoffene anvendt for å identifisere tilstedeværelsen av disse molekylene) å bli anvendt for å bekrefte en metastaser av prostatisk opprinnelse.

[0337] Til slutt, i tillegg til anvendelse av dem i diagnostiske forsøk, har PSCA-polynukleotidene beskrevet her flere andre praktiske nytter slik som anvendelse av dem i identifikasjon av onkogenetisk assosierte kromosomale anormaliteter i den kromosomale regionen til hvilken PSCA-genet kartlegger (se eksemplet betegnet "Kromosomal kartlegging av PSCA" nedenfor). Videre, i tillegg til anvendelse av dem i diagnostiske forsøk, har de PSCA-beslektede proteinene og polynukleotidene beskrevet her andre praktiske nytter slik som anvendelse av dem i forensisk-analysen av vev av ukjent opprinnelse (se *f.eks.* Takahama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28;80(1-2): 63-9).

[0338] I tillegg kan PSCA-beslektede proteiner eller polynukleotider ifølge oppfinnelsen anvendes for å behandle et patologisk forhold karakterisert ved overekspresjonen av PSCA. For eksempel aminosyren eller nukleinsyresekvensen i figur 1, eller fragmenter av hvilken som helst, kan anvendes for å danne en immunrespons på et PSCA-antigen. Antistoffer eller

andre molekyler som reagerer med PSCA kan anvendes til å modulere funksjonen av dette molekylet og derved tilveiebringes en terapeutisk fordel.

XII.) Hemning av PSCA-proteinfunksjon

[0339] Det er beskrevet forskjellige fremgangsmåter og sammensetninger for å hemme bindingen av PSCA til dens bindingspartner eller dens assosiering med andre protein(er) så vel som fremgangsmåter for å hemme PSCA-funksjon.

XII.A.) Hemning av PSCA med intracellulære antistoffer

[0340] I én angrepmåte blir en rekombinant vektor som koder for enkeltkjede antistoffer som spesifikt binder til PSCA innført i PSCA-uttrykkende celler via genoverføringsteknologier. Følgelig er det kodede enkeltkjede anti-PSCA-antistoffet uttrykt intracellulært, binder til PSCA-protein og derved hemmer dens funksjon. Fremgangsmåter for konstruksjon av slike intracellulære enkeltkjede antistoffer er velkjente. Slike intracellulære antistoffer også kjent som "intrabodier", er spesifikt målrettet mot et spesielt kompartiment innen cellen, tilveiebringer kontroll over hvor den hemmende aktiviteten til behandlingen er fokusert. Denne teknologien er med hell anvendt på området (for oversikt se Richardson and Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13). Intrabodier er vist å praktisk talt eliminere ekspresjonen av på annen måte rikelige celleoverflatereseptorer (se *f.eks.* Richardson *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli *et al.*, 1994, J. Biol. Chem. 289: 23931-23936; Deshan *et al.*, 1994, Gene Ther. 1: 332-337).

[0341] Enkeltkjede antistoffer omfatter de variable domenene av den tunge og lette kjeden bundet med en fleksibel linkerpolypeptid og er uttrykt som et enkelt polypeptid. Eventuelt er enkeltkjede antistoffer uttrykt som et enkeltkjede variabel region-fragment bundet til lettkjedens konstante region. Velkjente intracellulær trafikkerings signaler er konstruert inn i rekombinante polynukleotidvektorer som koder for slike enkeltkjede antistoffer for å måle presist intrabodien til det ønskede intracellulær kompartiment. For eksempel er intrabodier målrettet til det endoplasmatiske reticulumet (IS) konstruert for å innføre et lederpeptid og eventuelt et C-terminalt IS-retensjonssignal, slik som KDEL-aminosyremotivet. Intrabodier ment for å utøve aktivitet i kjernen er konstruert til å omfatte et nukleært lokaliseringssignal. Lipidgrupper er bundet til intrabodier for å tjøre intrabodien til den cytosoliske siden av plasmamembranen. Intrabodier kan også være målrettet til å utøve funksjon i cytosolen. For eksempel blir cytosoliske intrabodier anvendt til sekvestre faktorer innen cytosolen, derved å forhindre dem fra å bli transportert til deres naturlig cellulær bestemmelse.

[0342] I én utførelsesform blir intrabodier anvendt til å fange PSCA i kjernen, derved forhindring av dens aktivitet innen kjernen. Nukleære målrettede signaler er konstruert inn i slike PSCA-intrabodier for å oppnå den ønskede målrettingen. Slike PSCA-intrabodier er utformet til å binde spesifikt til en spesiell PSCA-domene. I en annen utførelsesform blir cytosoliske intrabodier som spesifikt binder til et PSCA-protein anvendt for å forhindre PSCA fra å oppnå tilgang til kjernen, derved forhindring av det fra utøvelse av hvilken som helst biologisk aktivitet innen kjernen (*f.eks.* forhindring av PSCA fra dannelsen av transkripsjonskomplekser med andre faktorer).

[0343] For å spesifikt dirigere ekspresjonen av slike intrabodier til spesielle celler, blir transkripsjonen av intrabodien plassert under den regulatoriske kontrollen til en passende tumorspesifikk promoter og/eller enhancer. For å måle intrabodyekspresjon spesifikt til prostata kan for eksempel PSA-promoter og/eller promoter/enhancer anvendes (se for eksempel US-patent nr. 5.919.652 publisert 6 juli 1999).

XII.B.) Hemning av PSCA med rekombinante proteiner

[0344] I en annen angrepsmåte binder rekombinante molekyler til PSCA og hemmer derved PSCA-funksjon. For eksempel forhindrer eller hemmer disse rekombinante molekyler PSCA fra tilgjengelighet/binding til dens bindingspartner(e) eller assosiering med andre protein(er). Slike rekombinante molekyler kan for eksempel inneholde de(n) reaktive delen(e) av et PSCA-spesifikt antistoffmolekyl. I en spesiell utførelsesform er PSCA-bindingsdomet til en PSCA-bindingspartner konstruert inn i et dimerisk fusjonsprotein, hvorved fusjonsproteinet omfatter to PSCA-ligandbindende domener bundet til Fc-delen til et humant IgG, slik som human IgG₁. Slik IgG-del kan inneholde for eksempel CH₂- og CH₃-domenene og hengsleregionen, men ikke CH₁-domenet. Slike dimeriske fusjonsproteiner blir administrert i oppløselig form til pasienter som lider av kreft forbundet med ekspresjon av PSCA, hvorved det dimeriske fusjonsproteinet spesifikt binder til PSCA og blokkerer PSCA-interaksjon med en bindingspartner. Slike dimeriske fusjonsproteiner er videre kombinert inn i multimeriske proteiner ved anvendelse av kjente antistofflinkingsteknologier.

XII.C.) Hemning av PSCA-transkripsjon eller translasjon

[0345] Det er mulig med forskjellige fremgangsmåter og sammensetninger for å hemme transkripsjonen av PSCA-genet. Tilsvarende tilveiebringer oppfinnelsen også fremgangsmåter og sammensetninger for å hemme translasjonen av PSCA-mRNA til protein.

[0346] I én angrepsmåte omfatter en fremgangsmåte for å hemme transkripsjonen av PSCA-genet å sette PSCA-genet i kontakt med en PSCA-antisensepolynukleotid. I en annen

angrepmåte omfatter en fremgangsmåte for å hemme PSCA-mRNA-translasjon å sette en PSCA-mRNA i kontakt med en antisensepolynukleotid. I en annen angrepmåte blir et PSCA-spesifikt ribozym anvendt til å spalte en PSCA-message, derved å hemme translasjon. Slike antisense- og ribozymbaserte fremgangsmåter kan også være rettet mot de regulatoriske regionene til PSCA-genet, slik som PSCA-promoter- og/eller enhancerelementer. Tilsvarende blir proteiner som er i stand til å hemme en PSCA-gentranskripsjonsfaktor anvendt til å hemme PSCA-mRNA-transkripsjon. De forskjellige polynukleotidene og sammensetningene anvendelige i ovennevnte fremgangsmåter er beskrevet ovenfor. Anvendelsen av antisense- og ribozymmolekyler til å hemme transkripsjon og translasjon er velkjente på området.

[0347] Andre faktorer som hemmer transkripsjonen av PSCA ved påvirkning av PSCA-transkripsjonell aktivisering er også anvendelige for å behandle kreft som uttrykker PSCA. Tilsvarende er faktorer som griper inn i PSCA-prosessering anvendelige for å behandle kreft som uttrykker PSCA. Kreftbehandlingsfremgangsmåter ved anvendelse av slike faktorer er også innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen.

XII.D.) Generelle betraktninger for terapeutiske strategier

[0348] Genoverførings- og genterapiteknologier kan anvendes til å levere terapeutiske polynukleotidmolekyler til tumorceller som syntetiserer PSCA (*dvs.* antisense, ribozym, polynukleotider som koder for intrabodier og andre PSCA-hemmende molekyler). Flere genterapifremgangsmåter er kjent på området. Rekombinante vektorer som koder for PSCA-antisensepolynukleotider, ribozymmer, faktorer som er i stand til å påvirke PSCA-transkripsjon og så videre, kan leveres til måltumorceller ved anvendelse av slike genterapifremgangsmåter.

[0349] De ovenfor terapeutiske angrepmåter kan kombineres med hvilken som helst éne av en rekke kirurgiske, kjemoterapi- eller strålingsterapiregimer. De terapeutiske angrepmåtene ifølge oppfinnelsen kan sette i stand til anvendelse av reduserte doser av kjemoterapi (eller andre terapier) og/eller mindre frekvent administrering, fordel for alle pasienter og spesielt for de som ikke tolererer toksisiteten til det kjemoterapeutiske midlet godt.

[0350] Antitumoraktiviteten til en spesiell sammensetning (*f.eks.* antisense, ribozym, intrabody), eller en kombinasjon av slike sammensetninger, kan evalueres ved anvendelse av forskjellige *in vitro*- og *in vivo*-forsøkssystemer. *In vitro*-forsøk som evaluerer terapeutisk aktivitet omfatter cellevekstforsøk, mykagarforsøk og andre forsøk indikative for tumorfremmende aktivitet, bindingsforsøk som er i stand til bestemmelse av omfanget til

hvilken en terapeutisk sammensetning som vil hemme bindingen av PSCA til en bindingspartner, etc.

[0351] *In vivo* kan effekten av en PSCA-terapeutisk sammensetning evalueres i en egnert dyremodell. For eksempel kan xenogeniske prostatakraftmodeller anvendes, hvor humane prostatakraft-eksplantater eller passerte xenograftvev blir innført i immune kompromisserte dyr, slik som naken- eller SCID-mus (Klein *et al.*, 1997, Nature Medisin 3: 402-408). For eksempel beskriver PCT-patentsøknad WO98/16628 og US-patent 6.107.540 forskjellige xenograftmodeller av human prostatakraft som er i stand til å rekapitulere utviklingen av primærtumorer, mikrometastase og dannelsen av osteoblastiske metastaser karakteristiske for sent trinns sykdom. Effektivitet kan være forutsagt ved anvendelse av forsøk som måler hemning av tumordannelse, tumorregresjon eller metastase og lignende.

[0352] *In vivo*-forsøk som evaluerer fremmingen av apoptose er anvendelige i evaluering av terapeutiske sammensetninger. I én utførelsesform kan xenografts fra tumorbærende mus behandlet med den terapeutiske sammensetningen bli undersøkt for tilstedeværelsen av apoptotiske foki og sammenlignet med ubehandlede kontroll-xenograftbærende mus. Omfanget av hvilke apoptotiske foki som er funnet i tumorene av de behandlede musene tilveiebringer en indikasjon på den terapeutiske effektivitet av sammensetningen.

[0353] De terapeutiske sammensetningene anvendt i praksisen av foregående fremgangsmåter kan formuleres inn i farmasøytiske sammensetninger omfattende en bærer egnet for den ønskede leveringsfremgangsmåten. Egnede bærere omfatter hvilket som helst materiale som når kombinert med den terapeutiske sammensetningen beholder antitumorfunksjonen til den terapeutiske sammensetningen og generelt ikke er reaktiv med pasientens immunsystem. Eksempler omfatter, men er ikke begrenset til, hvilken som helst av flere standard farmasøytiske bærere slik som sterile fosfatbufret saltløsninger, bakteriostatisk vann og lignende (se generelt Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

[0354] Terapeutiske formuleringer kan solubiliseres og administreres via hvilken som helst vei som er i stand til levering av den terapeutiske sammensetningen til tumorstedet. Potensielt effektive administreringsfremgangsmåter omfatter, men er ikke begrenset til, intravenøse, parenterale, intraperitoneale, intramuskulære, intratumore, intradermale, intraorgane, ortotopiske og lignende. En foretrukket formulering for intravenøs injeksjon omfatter den terapeutiske sammensetningen i en løsning av preservert bakteriostatisk vann, sterile upreservert vann og/eller fortynnet i polyvinylklorid- eller polyetylenbagger

inneholdende 0,9% steril natriumklorid for injeksjon, USP. Terapeutiske proteinfremstillinger kan være frysetørket og lagret som sterile pulvere, fortrinnsvis under vakuum og deretter rekonstituert i bakteriostatisk vann (inneholdende for eksempel benzylalkohol konserveringsmiddel) eller i sterilt vann før injeksjon.

[0355] Doser og administreringsprotokoller for behandlingen av kreft ved anvendelse av de foregående fremgangsmåtene vil variere med fremgangsmåten og målkreften og vil generelt avhenge av flere andre faktorer anerkjent på området.

XIII.) Identifikasjon, karakterisering og anvendelse av modulatorer av PSCA

Fremgangsmåter for å identifisere og anvende modulatorer

[0356] I én utførelsesform blir screening utført for å identifisere modulatorer som fremkaller eller undertrykker en spesiell ekspresjonsprofil, undertrykker eller fremkaller spesifikke reaksjonsveier, fortrinnsvis dannelse av den assosierte fenotypen derved. I en annen utførelsesform, som har identifisert differensielt uttrykte gener viktig i en spesiell tilstand; blir screener utført for å identifisere modulatorer som endre ekspresjon av individuelle gener, enten økning eller reduksjon. I en annen utførelsesform blir screening utført for å identifisere modulatorer som endrer en biologisk funksjon av det uttrykte produktet på et differensielt uttrykt gen. Som igjen har identifisert betydningen av et gen i en spesiell tilstand, screener blir utført for å identifisere midler som binder og/eller modulerer den biologiske aktiviteten til genproduktet.

[0357] I tillegg blir screener utført for gener som er induisert som respons på et kandidatmiddel. Etter identifikasjon av en modulator (en som undertrykker kreftekspresjonsmønster hvilket fører til et normalt ekspresjonsmønster eller en modulator av kreftgen som fører til ekspresjon av genet som i normalt vev) en screen blir utført for å identifisere gener som er spesifikt modulert som respons på midlet. Sammenligning av ekspresjonsprofiler mellom normalt vev og middelbehandlet kreftvev avslører gener som ikke er uttrykt i normalt vev eller kreftvev, men er uttrykt i middelbehandlet vev og vice versa. Disse middelspesifikke sekvensene er identifisert og anvendt ved fremgangsmåter beskrevet her for kreftgener eller -proteiner. Spesielt blir disse sekvensene og proteinene de koder for anvendt i merking eller identifikasjon av middelbehandlede celler. I tillegg er antistoffer reist mot de middelinduserte proteinene og anvendt til å måle nye terapeutiske midler til den behandlede kreftvevsprøven.

Modulatorrelatert identifikasjon og screeningsforsøk:

Genekspresjonrelaterte forsøk

[0358] Proteiner, nukleinsyrer og antistoffer ifølge oppfinnelsen blir anvendt i screeningsforsøk. De kreftassosierte proteinene, antistoffene, nukleinsyrene, modifiserte proteinene og cellene inneholdende disse sekvensene blir anvendt i screeningsforsøk, slik som evaluering av effekten til medikamentkandidater på en "genekspresjonsprofil," ekspresjonsprofil til polypeptider eller endring av biologisk funksjon. I én utførelsesform blir ekspresjonsprofilene anvendt, fortrinnsvis sammen med høy gjennomstrømnings screeningsteknikker for å tillate overvåkning av ekspresjonsprofilgener etter behandling med et kandidatmiddel (*f.eks.* Davis, GF, et al, J Biol Screen 7:69 (2002); Zlokarnik, *et al.*, Science 279:84-8 (1998); Heid, Genome Res 6:986-94,1996).

[0359] Kreftproteinene, antistoffene, nukleinsyrene, modifiserte proteinene og cellene inneholdende de naturlige eller modifiserte kreftproteinene eller genene blir anvendt i screeningsforsøk. Det er foreliggende oppfinnelse omfatter fremgangsmåter for screening for sammensetninger som modulerer kreftfenotypen eller en fysiologisk funksjon av et kreftprotein ifølge oppfinnelsen. Dette blir utført på et gen selv eller ved å bedømme effekten av medikamentkandidater på en "genekspresjonsprofil" eller biologisk funksjon. I én utførelsesform blir ekspresjonsprofiler anvendt, fortrinnsvis sammen med høy gjennomstrømnings screeningsteknikker for å tillate overvåkning etter behandling med et kandidatmiddel, se Zlokarnik, *supra*.

[0360] En rekke forsøk er utført rettet mot genene og proteinene ifølge oppfinnelsen. Forsøk er kjørt på en individuell nukleinsyre eller proteinnivå. Det er, som har identifisert et spesielt gen som oppregulert i kreft, testforbindelser blir screenet for evnen til å modulere genekspresjon eller for binding til kreftproteinene ifølge oppfinnelsen. "Modulering" i denne sammenhengen omfatter en økning eller en reduksjon i genekspresjon. Den foretrukne mengden av modulering vil avhenge av den opprinnelige forandringen av genekspresjonen i normal versus vev som gjennomgår kreft, med endringer på minst 10%, fortrinnsvis 50%, mer foretrukket 100-300% og i noen utførelsesformer 300-1000% eller større. Således, hvis et gen oppviser en 4-gangers økning i kreftvev sammenlignet med normalt vev, en reduksjon på omtrent fire-ganger er ofte ønsket; tilsvarende en 10-gangers reduksjon i kreftvev sammenlignet med normalt vev en målverdi på en 10-gangers økning i ekspresjon av testforbindelsen er ofte ønsket. Modulatorer som forverrer typen genekspresjon sett i kreft er også anvendelige, *f.eks.* som et oppregulert mål i videre analyser.

[0361] Mengden av genekspresjon er overvåket ved anvendelse av nukleinsyreprober og kvantifisering av genekspresjonsnivåer, eller alternativt er et genprodukt selv overvåket, *f.eks.* gjennom anvendelse av antistoffer til kreftproteinet og standardimmunoanalyser. Proteomikk og separeringsteknikker tillater også kvantifisering av ekspresjon.

Ekspresjonsovervåkning for å identifisere forbindelser som modifierer genekspresjon

[0362] I én utførelsesform er genekspresjonsovervåkning, *dvs.* en ekspresjonsprofil, overvåket samtidig for flere enheter. Slik profiler vil typisk involvere én eller flere av genene fra figur 1. I denne utførelsesformen er *f.eks.* kreftnukleinsyreprober bundet til biobrikker ("biochips") for å detektere og kvantifisere kreftsekvenser i en spesiell celle. Alternativt kan PCR anvendes. Således kan en serie, *f.eks.* brønner i en mikrotiterplate anvendes med fordelte primere i ønskete brønner. En PCR-reaksjon kan deretter utføres og analyseres for hver brønn.

[0363] Ekspresjonsovervåkning blir utført for å identifisere forbindelser som modifierer ekspresjonen av én eller flere kreftassosierte sekvenser, *f.eks.* en polynukleotidsekvens angitt i figur 1. Generelt blir en testmodulator satt til cellene før analyse. Videre er screener også tilveiebrakt for å identifisere midler som modulerer kreft, modulere kreftproteiner ifølge oppfinnelsen, binder til kreftprotein ifølge oppfinnelsen eller griper inn i bindingen av kreftprotein ifølge oppfinnelsen og et antistoff eller annen bindingspartner.

[0364] I én utførelsesform involverer høy gjennomstrømnings screeningsfremgangsmåter tilveiebringning av et bibliotek inneholdende et stort antall av potensielle terapeutiske forbindelser (kandidatforbindelser). Slike "kombinatorisk kjemiske biblioteker" blir deretter screenet i ett eller flere forsøk for å identifisere de bibliotekmedlemmer (spesielt kjemiske arter eller subklasser) som viser en ønsket karakteristisk aktivitet. Forbindelsene således identifisert kan tjene som konvensjonelle "lederforbindelser," som forbindelser for screening eller som terapeutiske midler.

[0365] I visse utførelsesformer blir kombinatoriske biblioteker av potensielle modulatorer screenet for en evne til å binde til kreftpolypeptid eller til å modulere aktivitet. Konvensjonelt er nye kjemiske enheter med anvendelige egenskaper dannet ved identifikasjon av en kjemisk forbindelse (betegnet en "lederforbindelse") med noe ønskelig egenskap eller aktivitet, *f.eks.* hemmende aktivitet, frembringende varianter av lederforbindelsen og evaluering av egenskapen og aktiviteten til de variantforbindelsene. Ofte blir høy gjennomstrømnings screening (HTS)-fremgangsmåter anvendt for en slik analyse.

[0366] Som angitt ovenfor er genekspresjonsovervåkning hensiktsmessig anvendt til å teste kandidatmodulatorer (*f.eks.* protein, nukleinsyre eller lite molekyl). Etter at

kandidatmidlet er tilsatt og cellene tillat å innkubere for en periode, er prøven inneholdende en målsekvens som er analysert *f.eks.* satt til en biobrikke.

[0367] Hvis nødvendig blir målsekvensen fremstilt ved anvendelse av kjente teknikker. For eksempel blir en prøve behandlet for å lysere cellene, ved anvendelse av kjente lyseringsbuffer, elektroporering, etc., med rensning og/eller amplifisering slik som PCR utført som passende. For eksempel blir en *in vitro*-transkripsjon med merker kovalent bundet til nukleotidene utført. Generelt er nukleinsyrene merket med biotin-FITC eller PE eller med cy3 eller cy5.

[0368] Målsekvensen kan være merket med *f.eks.* et fluorescerende, et kjemiluminescerende, et kjemisk eller et radioaktivt signal for å tilveiebringe et middel for detektering av den målsekvensens spesifikke bindingen til en probe. Merket kan også være et enzym, slik som alkalisk fosfatase eller pepperrotperoksydase, som når tilveiebrakt med et passende substrat tilveiebringer et produkt som blir detektert. Alternativt er merket en merket forbindelse eller lite molekyl, slik som en enzyminhibitor, som binder men ikke er katalysert eller endret av enzymet. Merket kan også være en gruppe eller forbindelse, slik som en epitoptag eller biotin som spesifikt binder til streptavidin. For eksemplet med biotin er streptavidinet merket som beskrevet ovenfor, derved tilveiebringende av et detekterbart signal for den bundne målsekvensen. Ubundet merket streptavidin er typisk fjernet før analyse.

[0369] Som vil være anerkjent av de på området kan disse forsøkene være direkte hybridiseringsforsøk eller kan omfatte "sandwich-forsøk", som omfatter anvendelsen av multiple prober, som generelt er beskrevet i US-patent nr. 5.681.702; 5.597.909; 5.545.730; 5.594.117; 5.591.584; 5.571.670; 5.580.731; 5.571.670; 5.591.584; 5.624.802; 5.635.352; 5.594.118; 5.359.100; 5.124.246; og 5.681.697. I denne utførelsesformen blir generelt målnukleinsyren fremstilt som beskrevet ovenfor og deretter satt til biobrikken omfattende en rekke nukleinsyreprober, ved betingelser som tillater dannelsen av et hybridiseringskompleks.

[0370] En rekke hybridiseringsbetingelser blir anvendt ifølge foreliggende oppfinnelse, omfattende høy, moderat og lav stringensbetingelser som beskrevet ovenfor. Forsøkene er generelt kjørt under stringensbetingelser som tillater dannelse av det merkete probehybridiseringskomplekset bare i nærværet av mål. Stringens kan kontrolleres ved å endre en trinnparameter som er en termodynamisk variabel, omfattende, men ikke begrenset til, temperatur, formamidkonsentrasjon, saltkonsentrasjon, kaotropisk saltkonsentrasjon, pH, organisk løsningsmiddelkonsentrasjon, etc. Disse parameterene kan også anvendes for å kontrollere uspesifikk binding som generelt er beskrevet i US-patent nr. 5.681.697. Således

kan det være ønskelig å utføre visse trinn ved høyere stringensbetingelser for å redusere uspesifikk binding.

[0371] Reaksjonene beskrevet her kan gjennomføres på en rekke måter. Komponenter av reaksjonen kan tilsettes samtidig eller sekvensielt, i forskjellige rekkefølger, med foretrukne utførelsesformer beskrevet nedenfor. I tillegg kan reaksjonen omfatte en rekke andre reagenser. Disse omfatter salter, buffere, nøytrale proteiner, *f.eks.* albumin, detergenter, etc. som kan anvendes for å lette optimal hybridisering og deteksjon og/eller redusere uspesifikke eller bakgrunnsinteraksjoner. Reagenser som på annen måte forbedrer effektiviteten av forsøket, slik som proteaseinhibitorer, nukleaseinhibitorer, antimikrobielle midler, etc., kan også anvendes som passende, avhengig av prøvefremstillingsfremgangsmåtene og renhet av målet. Forsøksdataen blir analysert for å bestemme ekspresjonsnivåene av individuell gener og endringer i ekspresjonsnivåer som mellom tilstander, dannelsen av en genekspresjonsprofil.

Biologisk aktivitetsrelaterte forsøk

[0372] Det er beskrevet å identifisere eller screene en forbindelse som modulerer aktiviteten til et kreftrelatert gen eller protein ifølge oppfinnelsen. Fremgangsmåtene omfatter tilsetning av en testforbindelse, som definert ovenfor, til en celle omfattende et kreftprotein ifølge oppfinnelsen. Cellene inneholder en rekombinant nukleinsyre som koder for et kreftprotein ifølge oppfinnelsen. I en annen utførelsesform blir et bibliotek av kandidatmidler testet på en rekke celler.

[0373] I ett aspekt er forsøkene evaluert i nærværet eller fraværet eller tidligere eller påfølgende eksponering av fysiologiske signaler, *f.eks.* hormoner, antistoffer, peptider, antigener, cytokiner, vekstfaktorer, virkningspotentialer, farmakologiske midler omfattende kjemoterapeutika, stråling, karsinogeniske eller andre celler (*dvs.* celle-cellekontakter). I et annet eksempel er bestemmelsene gjort på forskjellige trinn av cellecyklusprosessen. På denne måten er forbindelser som modulerer gener eller proteiner ifølge oppfinnelsen identifisert. Forbindelser med farmakologisk aktivitet er i stand til å forbedre eller griper inn i aktiviteten til kreftproteinene ifølge oppfinnelsen. Med én gang identifisert er lignende strukturer evaluert for å identifisere kritiske strukturelle trekk til forbindelsen.

[0374] I én utførelsesform er en fremgangsmåte for å modulerer (*f.eks.* hemme) kreftcelledeling tilveiebrakt; fremgangsmåten omfatter administrering av kreftmodulator. I en annen utførelsesform er en fremgangsmåte for å modulerer (*f.eks.* hemme) kreft tilveiebrakt; fremgangsmåten omfatter administrering av en kreftmodulator. I en ytterligere utførelsesform

er fremgangsmåter for behandling av celler eller individer med kreft tilveiebrakt; fremgangsmåten omfatter administrering av en kreftmodulator.

[0375] I én utførelsesform er en fremgangsmåte for å modulere statusen til en celle som uttrykker et gen ifølge oppfinnelsen tilveiebrakt. Som anvendt her omfatter status slike artsaksepterte parametere slik som vekst, proliferasjon, overlevelse, funksjon, apoptose, aldring, lokalisasjon, enzymatisk aktivitet, signaltransduksjon, etc. av en celle. I én utførelsesform er kreftinhibitor et antistoff som beskrevet ovenfor. I en annen utførelsesform er kreftinhibitoren et antisensemolekyl. En rekke cellevekst-, proliferasjons- og metastaseforsøk er kjent for fagfolk på området som beskrevet her.

Høy gjennomstrømnings screening for å identifisere modulatorer

[0376] Forsøkene for å identifisere egnete modulatorer er mottagelig for høy gjennomstrømnings screening. Foretrukne forsøk detekterer således forbedring eller hemning av kreftgentranskripsjon, hemning eller forbedring av polypeptidokspresjon og hemning eller forbedring av polypeptidaktivitet.

[0377] I én utførelsesform er modulatorer evaluert i høy gjennomstrømnings screeningsfremgangsmåter proteiner, ofte naturlig forekommende proteiner eller fragmenter av naturlig forekommende proteiner. Således blir *f.eks.* cellulære ekstrakter inneholdende proteiner eller tilfeldig eller rettet fordøyinger av proteinholdige cellulære ekstrakter anvendt. På denne måten er biblioteker av proteiner gjort for screening ved fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. Spesielt foretrukket i denne utførelsesformen er biblioteker av bakterielle, fungale, virale og mammalske proteiner, med den sistnevnte som blir foretrukket og humane proteiner blir spesielt foretrukket. Spesielt anvendelig testforbindelse vil være rettet mot klassen av proteiner til hvilken målet tilhører, *f.eks.* substrater for enzymer eller ligander og reseptorer.

Anvendelse av mykagarvekst og kolonidannelse for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0378] Normale celler krever et fast substrat for å binde og vokse. Når celler blir transformert mister denne fenotypen og vokser atskilt fra substratet. For eksempel kan transformerte celler vokse i omrørt suspensjonskultur eller suspendert i halvfast media, slik som halvfast- eller mykagar. De transformerte cellene, når transfektert med tumorsuppressorgener, kan regenerere normal fenotype og krever igjen et fast substrat for å binde til og vokse. Mykagarvekst eller kolonidannelse i forsøk blir anvendt for å identifisere modulatorer til kreftsekvenser, som når uttrykt i vertsceller, hemmer unormal cellulær

proliferasjon og transformasjon. En modulator reduserer eller eliminerer vertscelleevnen til å vokse suspendert i fast stoff eller semifast media, slik som agar.

[0379] Teknikker for mykagarvekst eller kolonidannelse i suspensjonsforsøk er beskrevet i Freshney, *Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technoque* (3rd ed., 1994). Se også fremgangsmåteavsnittet til Garkavtsev *et al.* (1996), *supra*.

Evaluering av kontakthemning og veksttetthetsbegrensning for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0380] Normale celler vokser typisk i et flatt og organisert mønster i cellekultur inntil de berører andre celler. Når cellene berører hverandre er de kontakthemmet og stopper voksing. Transformerte celler er imidlertid ikke kontakthemmet og fortsetter å vokse til høye tettheter i disorganiserte foki. Således vokser transformerte celler til en høyere metningstetthet enn tilsvarende normale celler. Dette blir detektert morfologisk ved dannelsen av et disorientert monolag av celler eller celler i foki. Alternativt blir merkingsindeks med (^3H)-thymidin ved metningstetthet anvendt for å måle tetthetsbegrensning av vekst, tilsvarende et MTT- eller Alamar Blue-forsøk, vil avsløre proliferasjonskapasitet av celler og evnen til modulatorer til å påvirke same. Se Freshney (1994), *supra*. Transformerte celler, når transfektert med tumorsuppressorgener, kan regenerere en normal fenotype og blir kontakthemmet og vill vokse til en lavere tetthet.

[0381] I dette forsøket er merkingsindeks med (^3H)-thymidin ved metningstetthet en foretrukket fremgangsmåte for måling av tetthetsbegrensning av vekst. Transformerte vertsceller er transfektert med en kreftassosiert sekvens og blir dyrket i 24 timer ved metningstetthet i ikke-begrensende mediumforhold. Prosentdelen av cellemerking med (^3H)-thymidin blir bestemt ved innkorporert cpm.

[0382] Kontaktuavhengig vekst blir anvendt for å identifisere modulatorer til kreftsekvenser, som hadde ført til unormal cellulær proliferasjon og transformasjon. En modulator reduserer eller eliminerer kontaktuavhengig vekst og returnerer cellene til en normal fenotype.

Evaluering av vekstfaktor- eller serumavhengighet for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0383] Transformerte celler har lavere serumavhengighet enn deres normale motstykker (se f.eks. Temin, J. Natl. Cancer Inst. 37:167-175 (1966); Eagle *et al.*, J. Exp. Med 131:836-879 (1970)); Freshney, *supra*. Dette er delvis på grunn av frigjøring av forskjellige vekstfaktorer fra de transformerte cellene. Graden av vekstfaktor- eller serumavhengighet til

transformerte vertsceller kan sammenlignes med de til kontroll. For eksempel er vekstfaktor- eller serumavhengighet av en celle overvåket ved fremgangsmåter for å identifisere og karakterisere forbindelser som modulerer kreftassosierte sekvenser ifølge oppfinnelsen.

Anvendelse av tumorspesifikke markørnivåer for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0384] Tumorceller frigjør en øket mengde av visse faktorer (nedenfor "tumorspesifikke markører") enn deres normale motstykker. For eksempel er plasminogen aktivator (PA) frigjort fra human gliom på et høyere nivå enn fra normale hjerneceller (se *f.eks.* Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, in *Biological Responses in Cancer*, pp. 178-184 (Mihich (ed.) 1985)). Tilsvarende er tumorangiogenesefaktor (TAF) frigjort på et høyere nivå i tumorceller enn deres normale motstykker. Se *f.eks.* Folkman, Angiogenesis and Cancer, *Sem. Cancer Biol.* (1992)), mens bFGF er frigjort fra endoteltumorer (Ensoli, B *et al.*).

[0385] Forskjellige teknikker som måler frigjøringen av disse faktorene er beskrevet i Freshney (1994), *supra*. Se også Unkless *et al.*, *J. Biol. Chem.* 249:4295-4305 (1974); Strickland & Beers, *J. Biol. Chem.* 251:5694-5702 (1976); Whur *et al.*, *Br. J. Cancer* 42:305-312 (1980); Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, in *Biological Responses in Cancer*, pp. 178-184 (Mihich (ed.) 1985); Freshney, *Anticancer Res.* 5:111-130 (1985). For eksempel tumorspesifikke markørnivåer er overvåket ved fremgangsmåter for å identifisere og karakterisere forbindelser som modulerer de kreftassosierte sekvensene.

Invasjonsevne inn i Matrigel for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0386] Graden av invasjonsevne inn i Matrigel eller en ekstracellulær matriksbestanddel kan anvendes som et forsøk for å identifisere og karakterisere forbindelser som modulerer kreftassosierte sekvenser. Tumorceller viser en positiv korrelasjon mellom ondartet sykdom og invasjonsevne av celler inn i Matrigel eller noe annen ekstracellulær matriksbestanddel. I dette forsøket er tumorigeniske celler typisk anvendt som vertsceller. Ekspresjon av et tumorsuppressorgen i disse vertscellene ville redusere invasjonsevne av vertscellene. Teknikker beskrevet i *Cancer Res.* 1999; 59:6010; Freshney (1994), *supra*, kan anvendes. Kort beskrevet blir nivået av invasjon av vertsceller målt ved anvendelse av filter belagt med Matrigel eller noe annen ekstracellulær matriksbestanddel. Penetrering inn i gelen eller gjennom til den distale siden av filteret er ratet som invasjonsevne og ratet histologisk ved antall celler og distanse forflyttet eller ved formerking av cellene med ^{125}I og telling av

radioaktiviteten på den distale siden av filteret eller bunn av skålen. Se *f.eks.* Freshney (1984), *supra*.

Evaluerings av tumorvekst in vivo for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0387] Effekter av kreftassosierte sekvenser på cellevekst blir testet i transgene eller immunundertrykkende organismer. Transgene organismer blir fremstilt på en rekke artsaksepterte måter. For eksempel er knock-out transgene organismer, *f.eks.* pattedyr slik som mus gjort, hvor et kreftgen er ødelagt eller hvor et kreftgen blir innsatt. Knock-out transgene mus blir fremstilt ved insersjon av et markørgen eller annet heterologt gen inn i det endogene kreftgenset i musegenomet via homolog rekombinering. Slike mus kan også bli laget ved substituerings av det endogene kreftgenet med en mutert versjon av kreftgenet eller ved mutering av det endogene kreftgenet, *f.eks.* ved å eksponere for karsinogener.

[0388] For å fremstille transgene kimær dyr, *f.eks.* mus, blir en DNA-konstruksjon innført i kjernene av embryoniske stamceller. Celler inneholdende den nylig konstruerte genetiske lesjonen blir injisert i en vertsmusembryo, som er reimplantert inn i en mottager kvinnelig mus. Noen av disse embryoene utvikles til kimære mus som har germceller noen av hvilke som er avledet fra mutantcellelinjen. Derfor, ved å ale opp de kimære musene, er det mulig å oppnå en ny linje av mus inneholdende den innførte genetiske lesjonen (se *f.eks.* Capecchi *et al.*, Science 244:1288 (1989)). Kimære mus kan avledes i henhold til US-patent 6.365.797, publisert 2 april 2002; US-patent 6.107.540 publisert 22 august 2000; Hogan *et al.*, Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) og Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987).

[0389] Alternativt kan forskjellige immunundertrykkende eller immunmanglende vertsdyr anvendes. For eksempel kan en genetisk athymisk "naken"-mus (se *f.eks.* Giovanella *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. 52:921 (1974)), en SCID-mus, en thymektomisert mus ("thymectornized") eller en bestrålet mus (se *f.eks.* Bradley *et al.*, Br. J. Cancer 38:263 (1978); Selby *et al.*, Br. J. Cancer 41:52 (1980)) anvendes som en vert. Transplanterbare tumorceller (typisk ca. 106 celler) injisert inn i isogeniske verter produserer invasive tumorer i en høy del av tilfeller, mens normale celler av lignende opprinnelse ikke vil. I verter som utvikler invasive tumorer blir celler som uttrykker kreftassosierte sekvenser injisert subkutan eller ortotopisk. Mus blir deretter separert i grupper, omfattende kontrollgrupper og behandlede eksperimentelle grupper) *f.eks.* behandlet med en modulator). Etter et egnet tidsrom, fortrinnsvis 4-8 uker, blir tumorvekst målt (*f.eks.* ved volum eller ved dens to største dimensjoner eller vekt) og

sammenlignet med kontrollen. Tumorer som har statistisk signifikant reduksjon (ved anvendelse av, f.eks. Students t-test) er angitt å ha hemmet vekst.

In vitro-forsøk for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0390] Forsøk for å identifisere forbindelser med modulerende aktivitet kan utføres *in vitro*. For eksempel er et kreftpolypeptid først kontaktet med en potensiell modulator og innkubert i en egnet tidsperiode, f.eks. fra 0,5 til 48 timer. I én utførelsesform blir kreftpolypeptidnivåene bestemt *in vitro* ved å måle nivået av protein eller mRNA. Nivået av protein blir målt ved anvendelse av immunoanalyser slik som Western-blotting, ELISA og lignende med et antistoff som selektivt binder til kreftpolypeptidet eller et fragment derav. For måling av mRNA er amplifisering, f.eks. ved anvendelse av PCR, LCR eller hybridiseringsforsøk, f.eks. Northern-hybridisering, RNase-beskyttelse, dotblotting foretrukket. Nivået av protein eller mRNA blir detektert ved anvendelse av direkte eller indirekte merkete deteksjonsmidler, f.eks. fluorescerende eller radioaktivt merkete nukleinsyrer, radioaktive eller enzymatiske merkete antistoffer og lignende, som beskrevet her.

[0391] Alternativt kan et rapportørgensystem være planlagt ved anvendelse av en kreftproteinpromoter operabelt bundet til et rapportørgen slik som luciferase, grønt fluorescerende protein, CAT eller P-gal. Rapportørkonstruksjonen er typisk transfektert inn i en celle. Etter behandling med en potensiell modulator blir mengden av rapportørgentranskripsjon, translasjon eller aktivitet målt i henhold til standardteknikker kjent for fagfolk på området (Davis GF, *supra*; Gonzalez, J. & Negulescu, P. Curr. Opin. Biotechnol. 1998: 9:624).

[0392] Som beskrevet ovenfor blir *in vitro*-screener utført på individuelle gener og genprodukter. Det er som har identifisert et spesielt differensielt uttrykt gen som viktig i en spesiell tilstand blir screening av modulatorer av ekspresjonen til genet eller genproduktet selv utført.

[0393] I én utførelsesform blir screening for modulatorer av ekspresjon av spesifikt gen(er) utført. Typisk er ekspresjon av bare ett eller noen få gener evaluert. I en annen utførelsesform er screener utformet til å først finne forbindelser som binder til differensielt uttrykte proteiner. Disse forbindelsene blir deretter evaluert for evnen til å modulere differensielt uttrykt aktivitet. Videre med én gang innledende kandidatforbindelser er identifisert kan varianter videre bli screenet for å bedre evaluere strukturaktivitetsrelasjoner.

Bindingsforsøk for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0394] I bindingsforsøket heri blir et rensset eller isolert genprodukt ifølge oppfinnelsen generelt anvendt. For eksempel er antistoffer dannet til et protein ifølge oppfinnelsen og immunoanalyser er kjørt for å bestemme mengden og/eller lokalisasjonen til protein. Alternativt blir celler omfattende kreftproteinene anvendt i forsøkene.

[0395] Således omfatter fremgangsmåtene kombinerende av kreftprotein ifølge oppfinnelsen og en kandidatforbindelse slik som en ligand og bestemmelse av bindingen av forbindelsen til kreftproteinene ifølge oppfinnelsen. Foretrukne utførelsesformer anvender det humane kreftproteinene; dyremodeller av human sykdom kan også bli utviklet og anvendt. Også andre analoge mammalske proteiner kan også anvendes som anerkjent av fagfolk på området. I noen utførelsesformer blir videre varianter eller derivater av kreftproteiner anvendt.

[0396] Generelt er kreftproteinene ifølge oppfinnelsen eller liganden ikke-diffuserbart bundet til en uoppløselig bærer. Bæreren kan *f.eks.* være én som har isolert prøve som mottar områder (en mikrotiterplate, et array, etc.). Den uoppløselige bæreren kan fremstilles av hvilken som helst sammensetning til hvilken sammensetningene kan være bundet, er lett separert fra oppløselig materiale og er på annen måte kompatibel med den totale screeningsfremgangsmåten. Overflaten av slike bærere kan være fast eller porøs og av hvilken som helst hensiktsmessig form.

[0397] Eksempler på egnede uoppløselige bærere omfatter mikrotiterplater, arrayer, membraner og kuler. Disse er typisk gjort av glass, plast (*f.eks.* polystyren), polysakkarid, nylon, nitrocellulose eller Teflon™, etc. Mikrotiterplater og arrayer er spesielt hensiktsmessige fordi et stort antall av forsøk kan utføres samtidig, ved anvendelse av små mengder av reagenser og prøver. Den spesielle måten for binding av sammensetningen til bæreren er ikke viktig så lenge det er kompatibelt med reagensene og totale fremgangsmåter ifølge oppfinnelsen, opprettholder aktiviteten til sammensetningen og er ikke-diffuserbar. Foretrukne fremgangsmåter for binding omfatter anvendelsen av antistoffer som ikke sterisk blokkerer hverken ligandbindingssetet eller aktiveringssekvensen når binding av proteinet til bæreren, direkte binding til "klebrige" eller ioniske bærere, kjemisk kryssbinding, syntesen av proteinet eller middelet på overflaten, etc. Etter binding av proteinet eller liganden/bindemiddelet til bæreren blir overskudd av ubundet materiale fjernet ved vasking. Prøven som mottar områder kan deretter blokkeres gjennom innkubering med bovint serumalbumin (BSA), kasein eller annet uskadelig protein eller annen gruppe.

[0398] Med én gang et kreftprotein ifølge oppfinnelsen er bundet til bæreren og en testforbindelse blir satt til forsøket. Alternativt er kandidatbindemiddelet bundet til bæreren og kreftproteinet ifølge oppfinnelsen blir deretter tilsatt. Bindemidler omfatter spesifikke antistoffer, ikke-naturlige bindemidler identifisert i screeninger av kjemiske biblioteker, peptidanaloger, etc.

[0399] Av spesiell interesse er forsøk for å identifisere midler som har en lav toksisitet for humane celler. En rekke forsøk kan anvendes til dette formålet, omfattende proliferasjonsforsøk, cAMP-forsøk, merket *in vitro* protein-proteinbindingsforsøk, elektroforetisk mobilitetsskiftforsøk, immunoanalyser for proteinbinding, funksjonelle forsøk (fosforyleringsforsøk, etc.) og lignende.

[0400] En bestemmelse av binding av testforbindelsen (ligand, bindemiddel, modulator, etc.) til et kreftprotein ifølge oppfinnelsen kan utføres på flere måter. Testforbindelsen kan være merket og binding bestemt direkte, *f.eks.* ved binding av alle eller en del av kreftproteinet ifølge oppfinnelsen til en fast bærer, tilsetning av en merket kandidatforbindelse (*f.eks.* et fluorescerende merke), avvasking av overskuddsreagens og bestemmelse av hvorvidt merket er til stede på den faste bæreren. Forskjellig blokkering og vasketrinn kan anvendes som passende.

[0401] I visse utførelsesformer er bare én av komponentene merket, *f.eks.* et protein ifølge oppfinnelsen eller ligander merket. Alternativt er mer enn én komponent merket med forskjellige merker, *f.eks.* I^{125} for proteinene og en fluorofoor for forbindelsen. Nærhetsreagenser, *f.eks.* quenching- eller energi overføringsreagenser er også anvendelige.

Kompetitiv binding for å identifisere og karakterisere modulatorer

[0402] I én utførelsesform blir bindingen av "testforbindelsen" bestemt ved kompetitivt bindingsforsøk med en "konkurrent." Konkurrenten er en bindingsgruppe som binder til målmolekylet (*f.eks.* et kreftprotein ifølge oppfinnelsen). Konkurrenter omfatter forbindelser slik som antistoffer, peptider, bindingspartnere, ligander, etc. Under visse omstendigheter fortrenger den kompetitive bindingen mellom testforbindelsen og konkurrenten testforbindelsen. I én utførelsesform er testforbindelsen merket. Enten testforbindelsen, konkurrenten eller begge blir satt til proteinet i en tid tilstrekkelig for å tillate binding. Innkuberinger blir utført ved en temperatur som letter optimal aktivitet, typisk mellom fire og 40°C. Innkuberingsperioder er typisk optimalisert *f.eks.* for å lette rask høy gjennomstrømnings screening; typisk vil mellom null og én time være tilstrekkelig.

Overskudd av reagens er generelt fjernet eller vasket vekk. Den andre komponent blir deretter tilsatt og nærværet eller fraværet av den merkete komponenten er fulgt for å indikere binding.

[0403] I én utførelsesform blir konkurrenten tilsatt først, fulgt av testforbindelsen.

Fortrengning av konkurrenten er en indikasjon på at testforbindelsen binder til kreftproteinet og således er i stand til å binde til og potensielt å modulere aktiviteten til kreftproteinet. I denne utførelsesformen kan hvilken som helst komponent være merket. Således *f.eks.* hvis konkurrenten er merket, tilstedeværelsen av merke i post-testforbindelsesvaskeløsningen indikerer fortrenning av testforbindelsen. Alternativt hvis testforbindelsen er merket, tilstedeværelsen av merket på bæreren indikerer fortrenning.

[0404] I en alternativ utførelsesform blir testforbindelsen tilsatt først, med innkubering og vasking, fulgt av konkurrenten. Fraværet av binding av konkurrenten indikerer at testforbindelsen binder til kreftproteinet med høyere affinitet enn konkurrenten. Således hvis testforbindelsen er merket, tilstedeværelsen av merket på bæreren, koblet med en mangel på konkurrentbinding, indikerer at testforbindelsen binder til og således potensielt modulerer kreftproteinet ifølge oppfinnelsen.

[0405] Følgelig omfatter de kompetitive bindingsfremgangsmåtene differensiell screening for å identifisere midler som kan modulere aktiviteten til kreftproteinene ifølge oppfinnelsen. I denne utførelsesformen omfatter fremgangsmåtene kombinerings av et kreftprotein og en konkurrent i en første prøve. En annen prøve omfatter en testforbindelse, kreftproteinet og en konkurrent. Bindingen av konkurrenten blir bestemt for begge prøver og en forandring eller forskjell i binding mellom de to prøvene indikerer tilstedeværelsen av et middel i stand til å binde til kreftproteinet og potensielt modulering av dens aktivitet. Det er hvis bindingen av konkurrenten er forskjellig i den andre prøven i forhold til den første prøven er midlet i stand til å binde til kreftproteinet.

[0406] Alternativt blir differensiell screening anvendt for å identifisere medikamentkandidater som binder til det naturlige kreftproteinet, men ikke kan binde til modifiserte kreftproteiner. For eksempel er strukturen av kreftproteinet modelert og anvendt i rasjonell medikamentdesign for å syntetisere midler som interagerer med det setet, midler som generelt ikke binder til setemodifiserte proteiner. Videre er slike medikamentkandidater som påvirker aktiviteten til et naturlig kreftprotein også identifisert ved screening av medikamenter for evnen til å enten forsterke eller redusere aktiviteten til slike proteiner.

[0407] Positive kontroller og negative kontroller kan anvendes i forsøkene. Fortrinnsvis blir kontroll- og testprøver utført i minst triplikat for å oppnå statistisk signifikante resultater.

Innkubering av alle prøver forekommer i en tid tilstrekkelig til å tillate bindingen av midlet til proteinet. Etter innkubering blir prøver vasket frie fra ikke-spesifikt bundet materiale og mengden av bundet, generelt merket middel bestemt. For eksempel hvor et radiomerke blir anvendt kan prøvene bli tallet i en scintillasjonsteller for å bestemme mengden av bundet forbindelse.

[0408] En rekke andre reagenser kan omfattes i screeningsforsøket. Disse omfatter reagenser som salter, nøytrale proteiner, *f.eks.* albumin, detergenter, etc. som blir anvendt for å lette optimal protein-proteinbinding og/eller redusere uspesifikk eller bakgrunnsinteraksjoner. Også reagenser som på annen måte forbedrer effektiviteten av forsøket, slik som proteaseinhibitorer, nukleaseinhibitorer, antimikrobielle midler, etc., kan anvendes. Blandingen av komponenter blir tilsatt i en rekkefølge som tilveiebringer for den ønskede bindingen.

Anvendelse av polynukleotider for å nedregulere eller hemme et protein ifølge oppfinnelsen.

[0409] Polynukleotidkreftmodulatorer kan innføres i en celle inneholdende målnukleotidsekvensen ved dannelse av et konjugat med et ligandbindingsmolekyl, som beskrevet i WO 91/04753. Egnete ligandbindingsmolekyler omfatter, men er ikke begrenset til, celleoverflatereseptorer, vekstfaktorer, andre cytokiner eller andre ligander som binder til celleoverflatereseptorer. Fortrinnsvis interfererer konjugering av ligandbindingensmolekylet hovedsakelig ikke med evnen til ligandbindingensmolekylet til å binde til dens tilsvarende molekyl eller reseptor eller blokkere inntreden av sense- eller antisenseoligonukleotidet eller dens konjugerte versjon inn i cellen. Alternativt kan en polynukleotidmodulator av kreft innføres i en celle inneholdende målnukleinsyresekvensen, *f.eks.* ved dannelse av et polynukleotid-lipidkompleks, som beskrevet i WO 90/10448. Det er forstått at anvendelsen av antisensemolekyler eller “knock out” og “knock in”-modeller også kan anvendes i screeningsforsøk som beskrevet ovenfor, i tillegg til fremgangsmåter for behandling.

Hemmende og antisensnukleotider

[0410] I visse utførelsesformer er aktiviteten til kreftassosiert protein nedregulert eller fullstendig hemmet, ved anvendelsen av antisensepolynukleotid eller hemmende små nukleære RNA (snRNA), *dvs.* en nukleinsyre komplementær til og som fortrinnsvis kan hybridisere spesifikt til, en kodende mRNA nukleinsyresekvens, *f.eks.* et kreftprotein ifølge oppfinnelsen, mRNA eller en subsekvens derav. Binding av antisensepolynukleotidet til mRNAet reduserer translasjonen og/eller stabiliteten til RNAet.

[0411] I sammenheng med foreliggende oppfinnelse kan antisensepolynukleotider omfatte naturlig forekommende nukleotider eller syntetisk arter dannet fra naturlig forekommende subenheter eller deres nære homologer. Antisensepolynukleotider kan også ha endrete sukkergrupper eller intersukkerbindinger. Eksempler blant disse er fosforotioatet og andre svovelinneholdende arter som er kjent for anvendelse på området. Analoger er omfattet ved foreliggende oppfinnelse så lenge de fungerer effektivt for å hybridisere med nukleotider ifølge oppfinnelsen. Se *f.eks.* Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA; Sequitor, Inc., Natick, MA.

[0412] Slike antisensepolynukleotider kan lett bli syntetisert ved anvendelse av rekombinante midler eller kan syntetiseres *in vitro*. Utstyr for slik syntese er solgt av mange forhandlere omfattende Applied Biosystems. Fremstillingen av andre oligonukleotider slik som fosforotioater og alkylerte derivater er også velkjente for fagfolk på området.

[0413] Antisensemolekyler som anvendt her omfatter antisense- eller senseoligonukleotider. Senseoligonukleotider kan *f.eks.* anvendes for å blokkere transkripsjon ved å binde til antisensetråden. Antisense- og senseoligonukleotidet omfatter en enkeltrådet nukleinsyresekvens (enten RNA eller DNA) i stand til å binde til mål-mRNA (sense) eller DNA (antisense)-sekvenser for kreftmolekyler. Antisense- eller senseoligonukleotider, ifølge foreliggende oppfinnelse, omfatter et fragment generelt på minst ca. 12 nukleotider, fortrinnsvis fra ca. 12 til 30 nukleotider. Evnen til å avlede et antisense- eller et senseoligonukleotid, basert på en cDNA-sekvens som koder for et gitt protein er beskrevet i *f.eks.* Stein & Cohen (Cancer Res. 48:2659 (1988) og van der Krol *et al.* (BioTechniques 6:958 (1988)).

Ribozymer

[0414] I tillegg til antisensepolynukleotider kan ribozymer anvendes til å mål og hemme transkripsjon av kreftassosierte nukleotidsekvenser. Et ribozym er et RNA-molekyl som katalytisk spalter andre RNA-molekyler. Forskjellige typer av ribozymer er beskrevet, omfattende gruppe I-ribozymer, hammerhai-ribozymer, hårnål-ribozymer, RNase P og øksehode-ribozymer (se *f.eks.* Castanotto *et al.*, Adv. in Pharmacology 25: 289-317 (1994) for en generell oversikt av egenskapene til forskjellig ribozymer).

[0415] De generelle trekkene til hårnål-ribozymer er beskrevet *f.eks.* i Hampel *et al.*, Nucl. Acids Res. 18:299-304 (1990); europeisk patentpublikasjon nr. 0360257; US-patent nr. 5.254.678. Fremgangsmåter for fremstilling er velkjent for fagfolk på området (se *f.eks.* WO 94/26877; Ojwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6340-6344 (1993); Yamada *et al.*, Human Gene Therapy 1:39-45 (1994); Leavitt *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92:699- 703

(1995); Leavitt *et al.*, Human Gene Therapy 5: 1151-120 (1994); og Yamada *et al.*, Virology 205: 121-126 (1994)).

Anvendelse av modulatorer i fenotypisk screening

[0416] I én utførelsesform blir en testforbindelse administrert til en populasjon av kreftceller, som har en assosiert kreftekspresjonsprofil. Med "administrering" eller "å sette i kontakt med" menes her at modulatorene blir satt til cellene på en slik måte som for å tillate modulatorene å virke på cellen, hvorvidt ved opptak og intracellulær virkning eller ved virkning på celleoverflaten. I noen utførelsesformer er en nukleinsyre som koder for et proteinholdig middel (*dvs.* et peptid) satt inn i en viral konstruksjon slik som en adenoviral eller retroviral konstruksjon og satt til cellen, slik at ekspresjon av peptidmiddelet blir fullført, *f.eks.* PCT US97/01019. Regulerbare genterapisystemer kan også anvendes. Med én gang modulatorene blir administrert til cellene, blir cellene vasket om ønsket og får innkubere under fortrinnsvis fysiologiske betingelser en periode. Cellene blir deretter høstet og en ny genekspressjonsprofil er dannet. Således blir *f.eks.* kreftvev screenet for midler som modulerer, *f.eks.* fremkaller eller undertrykker, kreftfenotypen. En forandring i minst ett gen, fortrinnsvis mange, fra ekspresjonsprofilen indikerer at midlet har en effekt på kreftaktivitet. Tilsvarende er endring av en biologisk funksjon eller en signaleringsreaksjonsvei indikativ for modulatoraktivitet. Ved å definere en slik signatur for kreftfenotypen er screener for nye medikamenter som endrer fenotypen planlagt. Med denne angrepsmåten trenger medikamentmålet ikke være kjent og trenger ikke være representert i den opprinnelige gen-/proteinekspressjonsscreeningsplattformen, heller ikke gjør nivået av transkript som målproteinene trenger for forandring. Den modulatorhemmende funksjonen vil tjene som en surrogatmarkør.

[0417] Som beskrevet ovenfor blir screener utført for å bedømme gener eller genprodukter. Det er som har identifisert et spesielt differensielt uttrykt gen som viktig i en spesiell tilstand blir screening av modulatorer for enten ekspresjon av genet eller genproduktet selv utført.

Anvendelse av modulatorer til å påvirke peptider ifølge oppfinnelsen

[0418] Målinger av kreftpolypeptidaktivitet eller av kreftfenotypen blir utført ved anvendelse av en rekke forsøk. For eksempel virkningene av modulatorer på funksjonen av et kreftpolypeptid(er) blir målt ved undersøkelse av parametere beskrevet ovenfor. En fysiologisk forandring som påvirker aktivitet blir anvendt for å bedømme innvirkningen av en testforbindelse på polypeptidene ifølge foreliggende oppfinnelse. Når de funksjonelle

resultatene blir bestemt ved anvendelse av intakte celler eller dyr kan en rekke effekter bli tilgjengelige slik som, i tilfellet av kreft forbundet med faste tumorer, tumorvekst, tumormetastase, neovaskularisering, hormonfrigjøring, transkripsjonelle endringer til både kjente og ukarakteriserte genetiske markører (*f.eks.* ved Northern-blotter), endringer i cellemetabolisme slik som cellevekst eller pH-endringer og endringer i intracellulære “second messengers” slik som cGNIP.

Fremgangsmåter for identifikasjon av karakteristiske kreftassosierte sekvenser

[0419] Ekspresjon av forskjellige gensekvenser er i samsvar med kreft. Følgelig blir lidelser basert på mutant eller variant kreftgener bestemt. I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen fremgangsmåter for å identifisere celler inneholdende variantkreftgener, *f.eks.* bestemmelse av tilstedeværelsen av, hele eller del, sekvensen av minst ett endogent kreftgen i en celle. Dette blir fullført ved anvendelse av hvilket som helst antall av sekvenseringsteknikker. Det er beskrevet fremgangsmåter for identifikasjon av kreftgenotypen til et individ, *f.eks.* bestemmelse av hele eller del av sekvensen til minst ett gen heri i det individet. Dette blir generelt utført i minst ett vev fra det individet, *f.eks.* et vev angitt i tabell I og kan omfatte evalueringen av flere vev eller forskjellig prøver av samme vev. Fremgangsmåten kan omfatte sammenligning av sekvensen til det sekvenserte genet til et kjent kreftgen, *dvs.* et villtype gen for å bestemme tilstedeværelsen av familiemedlemmer, homologier, mutasjoner eller varianter. Sekvensen av hele eller del av genet kan deretter bli sammenlignet med sekvensen av et kjent kreftgen for å bestemme om hvilken som helst forskjeller eksistere. Dette blir utført ved anvendelse av hvilket som helst antall av kjente homologiprogrammer, slik som BLAST, Bestfit, etc. Tilstedeværelsen av en forskjell i sekvensen mellom kreftgenet til pasienten og det kjente kreftgenet korrelerer med en sykdomstilstand eller en tilbøyelighet for en sykdomstilstand, som beskrevet her.

[0420] I en foretrukket utførelsesform blir kreftgenene anvendt som prober for å bestemme antallet kopier av kreftgenet i genomet. Kreftgenene blir anvendt som prober for å bestemme den kromosomale lokaliseringen av kreftgenene. Informasjon slik som kromosomal lokalisering finner anvendelser i tilveiebringning av en diagnose eller prognose spesielt når kromosomale anormaliteter slik som translokasjoner og lignende er identifisert i kreftgenets lokus.

XIV.) RNAi og terapeutisk anvendelse av små interfererende RNA (siRNAer)

[0421] Det er også beskrevet siRNA-oligonukleotider, spesielt dobbeltrådede RNAer omfattende minst et fragment av den PSCA-kodende regionen eller 5'-UTR-regioner eller

komplement eller hvilket som helst antisenseoligonukleotid spesifikt for PSCA-sekvensen. I én utførelsesform blir slike oligonukleotider anvendt til å belyse en funksjon av PSCA eller blir anvendt for å screene for eller evaluere modulatorer til PSCA-funksjon eller ekspresjon. I en annen utførelsesform blir genekspresjon av PSCA redusert ved anvendelse av siRNA-transfeksjon og resulterer i betydelig redusert proliferativ kapasitet av transformerte kreftceller som endogent uttrykker antigenet; celler behandlet med spesifikke PSCA-siRNAer viser redusert overlevelse som målt, *f.eks.* ved en metabolsk utredning av cellelevedyktighet korrelert til den reduserte proliferative kapasiteten. Således omfatter PSCA-siRNA-sammensetninger siRNA (dobbeltrådet RNA) som svarer til nukleinsyre-ORF-sekvensen til PSCA-proteinet eller subsekvenser derav; disse subsekvenser er generelt 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 eller flere enn 35 påfølgende RNA-nukleotider i lengde og inneholder sekvenser som er komplementære og ikke-komplementære til minst en del av den mRNA-kodende sekvensen. I en foretrukket utførelsesform er subsekvensene 19-25 nukleotider i lengde, mest foretrukket 21-23 nukleotider i lengde.

[0422] RNA-interferens er en ny angrepsmåte til å gjøre gener stumme *in vitro* og *in vivo*, således er små dobbeltrådet RNAer (siRNAer) verdifull terapeutiske midler. Kraften til siRNAer til å gjøre spesifikke genaktiviteter stumme har nå vært brakt til dyremodeller av sykdom og blir dessuten anvendt hos mennesker. For eksempel er hydrodynamisk infusjon av en løsning av siRNA inn i en mus med en siRNA mot et spesielt mål anerkjent å være terapeutisk effektive.

[0423] Pionerarbeidet til Song *et al.* indikerer at én type av fullstendig naturlig nukleinsyre, små interfererende RNAer (siRNAer), tjener som terapeutiske midler selv uten ytterligere kjemisk modifikasjon (Song, E., *et al.* "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis" Nat. Med. 9(3): 347-51(2003)). Dette arbeidet tilveiebrakte de første *in vivo*-bevis at infusjon av siRNAer i et dyr kunne lindre sykdom. I det tilfellet tilveiebrakte forfatterne muse injeksjoner av siRNA utformet til å gjøre stum FAS-proteinet (en celledødreseptor som når overaktivert under inflammatorisk respons induserer hepatocytter og andre celler til å dø). Den neste dagen ble dyrene gitt et antistoff spesifikt til Fas. Kontrollmus døde av akutt leversvikt innen noen få dager, mens over 80% av de siRNA-behandlede musene forble frie fra alvorlig sykdom og overlevde. Omtrent 80% til 90% av deres leverceller innkorporerte de nakne siRNA-oligonukleotidene. Videre fungerte RNA-molekylene i 10 dager før mistet effekt etter 3 uker.

[0424] For anvendelse i human terapi blir siRNA levert ved effektive systemer som fremkaller lang vedvarende RNAi-aktivitet. Et hovedhulrom ("caveat") for klinisk anvendelse er levering av siRNAer til de passende cellene. Hepatocytter ser ut til å være spesielt mottagelig for eksogen RNA. I dag er mål lokalisert i leveren attraktive fordi lever er et organ som lett kan være målrettet av nukleinsyremolekyler og virale vektorer. Imidlertid er andre vev- og organmål dessuten foretrukket.

[0425] Formuleringer av siRNAer med forbindelser som fremmer overføring tvers over cellemembraner blir anvendt for å forbedre administrering av siRNAer i terapi. Kjemisk modifisert syntetisk siRNA, som er resistente mot nukleaser og har serumstabilitet som har ledsagende forbedret varighet av RNAi-effekter, er en ytterligere utførelsesform.

[0426] Således er siRNA-teknologi et terapeutisk middel for human ondartet sykdom ved levering av siRNA-molekyler rettet mot PSCA til individer med kreftene, slik som de listet opp i tabell 1. Slik administrering av siRNAer fører til redusert vekst av kreftceller som uttrykker PSCA og tilveiebringer en antitumorterapi, minskning av morbiditeten og/eller dødeligheten forbundet med ondartet sykdom.

[0427] Effektiviteten av denne modaliteten av genprodukt kraftig nedsetting ("knockdown") er betydelig når målt *in vitro* eller *in vivo*. Effektivitet *in vitro* er lett demonstrerbar gjennom anvendelse av siRNAer til celler i kultur (som beskrevet ovenfor) eller til alikvoter av kreftpasientbiopsier når *in vitro*-fremgangsmåter blir anvendt for å detektere den reduserte ekspresjonen av PSCA-protein.

XV.) Kitt/artikler for fremstilling

[0428] For anvendelse i laboratoriet er prognostiske, profylaktiske, diagnostiske og terapeutiske anvendelser beskrevet her kits innenfor omfanget ifølge oppfinnelsen. Slike kits kan omfatte en bærer, emballasje eller beholder som er delt i rom for å motta én eller flere beholdere slik som medisinglass, rør og lignende, hver av beholderen(e) omfattende én av de separate elementene som skal anvendes ved fremgangsmåten, sammen med et merke eller innlegg omfattende instruksjoner for anvendelse, slik som en anvendelse beskrevet her. For eksempel kan beholderen(e) omfatte en probe som er eller kan være detekterbart merket. Slik probe kan være et antistoff eller polynukleotid spesifikk for henholdsvis et protein eller et gen eller message ifølge oppfinnelsen. Hvor fremgangsmåten anvender nukleinsyrehybridisering for å detektere målnukleinsyren, kittet kan også ha beholdere inneholdende nukleotid(er) for amplifisering av målnukleinsyresekvensen. Kits kan omfatte en beholder omfattende en rapportør slik som et biotinbindingsprotein, slik som avidin eller streptavidin, bundet til et

rapportørmolekyl, slik som et enzymatisk, fluorescerende eller radioisotop merke; slik en rapportør kan anvendes med, *f.eks.* en nukleinsyre eller antistoff. Kittet kan omfatte hele eller del av aminosyresekvensene i figur 1, figur 2 eller figur 3 eller analoger derav eller et nukleinsyremolekyl som koder for slike aminosyresekvenser.

[0429] Kittet vil typisk omfatte beholderen beskrevet ovenfor og én eller flere andre beholdere forbundet derved som omfatter materialer ønskelig fra et kommersielt og bruker standpunkt, omfattende buffere, fortynningsmidler, filterer, nåler, sprøyter; bærer, emballasje, beholder, medisinglass og/eller rørmerker som opplister innhold og/eller instruksjoner for anvendelse og emballasjeinnlegg med instruksjoner for anvendelse.

[0430] Et merke kan være til stede på eller med beholderen for å indikere at sammensetningen blir anvendt for en spesifikk terapi eller ikke-terapeutisk anvendelse, slik som en prognostisk, profylaktisk, diagnostisk eller laboratorie anvendelse og kan indikerer også retninger for enten *in vivo*- eller *in vitro*-anvendelse, slik som de beskrevet her. Retninger og eller annen informasjon kan også bli omfattet på et innlegg(er) eller merke(er) som er omfattet med eller på kittet. Merket kan være på eller forbundet med beholderen. Et merke kan være på en beholder når bokstaver, nummer eller andre karakterer som danner merket er støpt eller etset inn i beholderen selv; et merke kan være forbundet med en beholder når det er til stede innen en beholder eller bærer som også inneholder beholderen, *f.eks.* som et emballasjeinnlegg. Merket kan indikere at sammensetningen blir anvendt for diagnoser av, behandling av, profylaksing ("prophylaxing") eller prognosering av et forhold, slik som en neoplasie av et vev angitt i tabell I.

[0431] Betegnelsene "kitt" og "artikkel for fremstilling" kan anvendes som synonymer.

[0432] I en annen utførelsesform er en artikkel(artikler) for fremstilling inneholdende sammensetninger, slik som aminosyresekvens(er), små molekyl(er), nukleinsyresekvens(er) og/eller antistoff(er), *f.eks.* materialer anvendelige for diagnosen, prognosen, forebyggingen og/eller behandlingen av neoplasier av vev slik som de angitt i tabell I tilveiebrakt. Artikkelen for fremstilling omfatter typisk minst én beholder og minst ett merke. Egnete beholdere omfatter for eksempel flasker, medisinglass, sprøyter og testrør. Beholderne kan bli dannet fra en rekke materialer slik som glass, metall eller plast. Beholderen kan inneholde aminosyresekvens(er), små molekyl(er), nukleinsyresekvens(er), cellepopulasjon(er) og/eller antistoff(er). I én utførelsesform inneholder beholderen et polynukleotid for anvendelse i undersøkelse av mRNA-ekspresjonsprofilen til en celle, sammen med reagenser anvendt for dette formålet. I en annen utførelsesform omfatter en beholder et antistoff, bindingsfragment

derav eller spesifikt bindingsprotein for anvendelse i evaluering av proteinekspresjon til PSCA i celler og vev eller for relevante laboratorie, prognostiske, diagnostiske, profylaktiske og terapeutiske formål; indikasjoner og/eller retninger for slike anvendelser kan omfattes på eller med slike beholdere, likeledes kan reagenser og andre sammensetninger eller verktøy anvendt for disse formålene. I en annen utførelsesform omfatter en beholder materialer for å frembringe en cellulær eller humoral immunrespons, sammen med assosierte indikasjoner og/eller retninger. I en annen utførelsesform omfatter en beholder materialer for adoptiv immunoterapi, slik som cytotoksiske T-celler (CTL) eller hjelpe-T-celler (HTL), sammen med assosierte indikasjoner og/eller retninger; reagenser og andre sammensetninger eller verktøy anvendt for slikt formål kan også være omfattet.

[0433] Beholderen kan alternativt inneholde en sammensetning som er effektiv for behandling av, diagnose, prognosering eller profylaksing av et forhold og kan ha en steril tilgangsport (for eksempel beholderen kan være en intravenøsløsningsbag eller et medisinglass som har en stopper gjennombarbar ("pierceable") ved en hypodermisk injeksjonsnål). De aktive midlene i sammensetningen kan være et antistoff som er i stand til spesifikt binding av PSCA og modulering av funksjonen til PSCA.

[0434] Artikkelen for fremstilling kan videre omfatte en annen beholder omfattende en farmasøytisk akseptabel buffer, slik som fosfatbufret saltløsning, Ringers løsning og/eller dekstrose løsning. Den kan videre omfatte andre materialer ønskelige fra et kommersielt og bruker standpunkt, omfattende andre buffere, fortynningsmidler, filtrer, rørere, nåler, sprøyter og/eller emballasjeinnlegg med indikasjoner og/eller instruksjoner for anvendelse.

EKSEMPLER:

[0435] Forskjellige aspekter ifølge oppfinnelsen er ytterligere beskrevet og illustrert ved måter til de mange eksemplene som følger.

Eksempel 1Ekspresjonsanalyse av PSCA-varianter i normalt vev og pasientprøver

[0436] Tidligere ble PSCA, her referert til som PSCA-v.1, identifisert som et antigen uttrykt i prostatakraft. Dens ekspresjon ble detektert i mer enn 80% av primære prostatakraft og i majoriteten av prostatametastaser. Det har også vært vist å være uttrykt i blærekræft, eggstokkræft og pankreatisk kræft; disse kreftene er listet opp i tabell I. Ved immunohistokjemisk analyse er PSCA vist å være overuttrykt på celleoverflaten av fleste uroteliale overgangskarsinom og i 60% av primære pankreatiske adenokarsinomer. PSCA-ekspresjonsdataet er rapportert i patentpublikasjoner (PCT/US98/04664, PCT/US/28883, PCT/US00/19967) og i peer-reviewed artikler (Saffran *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27; 98(5): 2658-2663; Amara *et al.*, Cancer Res. 2001 Jun 15; 61(12): 4660-65; Reiter *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1998 Feb 17; 95(4): 1735-40; Argani *et al.*, Cancer Res. 2001 Jun 1; 61(11): 4320-24).

[0437] Spesifikk ekspresjon av forskjellige PSCA-varianter er studert i normale og kreftpasientprøver. Primere ble utformet for å differensiere mellom PSCA-v.1/v.2/v.4, PSCA-v.3 og PSCA-v.5. PSCA-v.1/v.2/v.4 fører til et PCR-produkt på 425 bp, PSCA-v.3 fører til et PCR-produkt på 300 bp, mens PSCA-v.5 fører til et PCR-produkt på 910 bp i størrelse (figur 1I(a)).

[0438] Første tråds cDNA ble fremstilt fra normal blære, hjerne, hjerte, nyre, lever, lunge, prostata, milt, skjelettmuskel, testikkel, bukspyttkjertel, kolon, mage, samlinger av prostatakraft, blærekræft, nyrekræft, kolonkræft, lungekræft, eggstokkræft, brystkræft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkreft (figur 1I(b)). Normalisering ble utført med PCR ved anvendelse av primere til aktin. Semikvantitativ PCR ved anvendelse av de variantspesifikke primerne ble utført ved 30 syklar av amplifisering.

[0439] Resultater viser ekspresjon av PSCA-v.5 hovedsakelig i brystkræft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkreft og ved lavere nivå i kolonkræft og lungekræft. PSCA-v.1/v.2/v.4-PCR-produkt ble detektert i prostatakraft, blærekræft, nyrekræft, kolonkræft, lungekræft, eggstokkræft, brystkræft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkreft. Blant normalt vev ble PSCA-v.1/v.2/v.4-PCR-produkt detektert bare i prostata, mage og ved lavere nivå i nyre og lunge,

mens PSCA-v.5 ikke ble detektert i noen normale vev. PSCA-v.3-PCR-detektert produkt ble ikke detektert i noen av de testete prøvene.

[0440] Primere ble utformet for å differensiere mellom PSCA-v.4 og PSCA-v.5 (figur 1J(a)). PSCA-v.4 fører til et PCR-produkt på 460 bp, mens PSCA-v.5 fører til et PCR-produkt på 945 bp i størrelse.

[0441] Første tråds cDNA ble fremstilt fra normal blære, hjerne, hjerte, nyre, lever, lunge, prostata, milt, skjelettmuskel, testikkel, bukspyttkjertel, kolon, mage, samlinger av prostatakrefte, blærekreft og multi-xenograftsamling (prostatakrefte, nyrekrefte og blærekreft-xenografts) (figur 1J(b)). Normalisering ble utført med PCR ved anvendelse av primere til aktin. Semikvantitativ PCR ved anvendelse av de variantspesifikke primerne ble utført ved 30 syklar av amplifisering.

[0442] Resultater viser ekspresjon av PSCA-v.4 i prostatakrefte, blærekreft og multi-xenograftsamling, normal nyre og prostata. PSCA-v.5 ble detektert bare i normal prostata og blærekreft.

[0443] Den begrensede ekspresjonen av PSCA-varianter i normalt vev og uttrykket detektert i kreftpasientprøver indikerer at PSCA-varianter er terapeutiske, prognostiske, laboratorie, profylaktiske og diagnostiske mål for human kreft.

Eksempel 2

Spleisevarianter av PSCA

[0444] Som anvendt her omfatter betegnelsen variant transkriptvarianter og enkelt-nukleotid polymorfier (SNPer). Transkriptvarianter er varianter av moden mRNA fra samme genet som oppstår ved alternativ transkripsjon eller alternativ spleising. Alternative transkripter er transkripter fra samme genet men starter transkripsjon på forskjellig punkter. Spleisevarianter er mRNA-varianter spleisete ulikt fra samme transkript. I eukaryoter, når et multi-ekson gen er transkribert fra genomisk DNA, er det innledende RNAet spleiset for å produsere funksjonell mRNA, som bare har eksoner og blir anvendt for translasjon til en aminosyresekvens. Følgelig kan et gitt gen ha null til mange alternative transkripter og hvert transkript kan ha null til mange spleisevarianter. Hver transkriptvariant har en unik eksonsammensetning og kan ha forskjellig kodende og/eller ikke-kodende (5'- eller 3'-end) deler, fra det opprinnelige transkriptet. Transkriptvarianter kan kode for samme, lignende eller forskjellige proteiner, slike proteiner som har samme eller en lignende funksjon eller en forskjellig funksjon. Variantproteinene kan uttrykkes i samme vev samtidig, i et forskjellig

vev samtidig eller i samme vev på forskjellige tider eller i et forskjellig vev på en ulik tid. Proteiner kodet for av en transkriptvariant kan ha lignende eller forskjellige subcellulære eller ekstracellulære lokaliseringer (*f.eks.* utskilt versus intracellulær).

[0445] Transkriptvarianter er identifisert ved en rekke artsaksepterte fremgangsmåter. For eksempel er alternative transkripter og spleisevarianter identifisert ved fullengde kloning eller ved anvendelse av fullengde transkript og EST-sekvenser. Først ble alle human ESTer gruppert inn i klustere som viser direkte eller indirekte identitet med hverandre. Deretter ble ESTer i samme klusteret videre gruppert inn i subklustere og samlet inn i en konsensussekvens. Den opprinnelige gensekvensen blir sammenlignet med konsensussekvensen(e) eller andre fullengde sekvenser. Hver konsensussekvens er en potensiell spleisevariant for det genet. Mange bekreftelsesmodaliteter er kjent på området, slik som identifikasjon av varianten ved Northern-analyse, fullengde kloning eller ved anvendelse av probebiblioteker, etc. Selv når en variant er identifisert, som ikke ennå er en fullengde klon, er den delen av varianten meget anvendelig som et forskningsverktøy, *f.eks.* for antigendannelse eller for videre kloning av den fullengde spleisevarianten ved anvendelse av teknikker kjent på området.

[0446] Videre er dataprogrammer tilgjengelige på området som identifiserer transkriptvarianter basert på genomiske sekvenser. Genomisk baserte transkriptvariantidentifikasjonsprogrammer omfatter FgenesH (A. Salamov and V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA," Genome Research. 2000 April; 10(4):516-22); Grail (URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm) og GenScan (URL genes.mit.edu/GENSCAN.html). For en generelle omtale av spleisevariantidentifikasjonsprotokoller se *f.eks.* Southan, C., A genomic perspective on human proteases, FEBS Lett. 2001 Jun 8; 498(2-3):214-8; de Souza, S.J., *et al.*, Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tager, Proc. Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7; 97(23):12690-3.

[0447] For å videre bekrefte parametrene til en transkriptvariant er en rekke teknikker tilgjengelig på området slik som fullengde kloning, proteomikk-validering, PCR-basert-validering og 5'-RACE-validering, etc. (se *f.eks.* Proteomic Validation: Brennan, S.O., *et al.*, Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, Biochem Biophys Acta. 1999 Aug 17;1433(1-2):321-6; Ferranti P, *et al.*, Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, Eur J Biochem. 1997 Oct 1;249(1):1-7. For PCR-basert-validering:

Wellmann S, *et al.*, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology, Clin Chem. 2001 Apr;47(4):654-60; Jia, H.P., *et al.*, Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, Gene. 2001 Jan 24; 263(1-2):211-8. For PCR-basert- og 5'-RACE-validering: Brigle, K.E., *et al.*, Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, Biochem Biophys Acta. 1997 Aug 7; 1353(2): 191-8).

[0448] Det er kjent på området at genomiske regioner er modulert i kreft. Når den genomiske regionen til hvilken et gen kartlegges er modulert i en spesiell kreft er de alternative transkriptene eller spleisevariantene av genet dessuten modulert. Beskrevet her er at PSCA har en spesiell ekspresjonsprofil relatert til kreft (se *f.eks.* tabell I). Alternative transkripter og spleisevarianter av PSCA er også involvert i kreft, for eksempel i én eller flere av disse vevene og dessuten i visse ytterligere vev. Variantene tjener således som tumorassosierte markører/antigener.

[0449] Ved anvendelse av fullengde PSCA-genet sammen med EST-sekvenser ble fire ytterligere transkriptsvarianter identifisert, betegnet som PSCA-v.2, v.3, v.4 og v.5. Grensene for eksoner i det opprinnelige transkriptet var PSCA-v.1 vist i tabell VI. Sekvensene for PSCA og PSCA-variantene er angitt i figur 1.

Eksempel 3

Enkel-nukleotid polymorfier av PSCA

[0450] En enkel-nukleotid polymorfisme (SNP) er en enkel baseparvariasjon i en nukleotidsekvens på en spesifikk lokalisasjon. På hvilket som helst gitt punkt av genomet er det fire mulig nukleotidbasepar: A/T, C/G, G/C og T/A. Som anvendt her er en allele én av en serie av alternative former av et gitt gen, avviker i DNA-sekvens og påvirkning av et produkt (RNA og/eller protein).

[0451] En SNP som forekommer på en cDNA er betegnet en cSNP. Denne cSNP'en kan forandre aminosyrer til proteinet kodet for av genet og således forandre funksjonen av proteinet. Noen SNPer forårsaker nedarvede sykdommer; andre bidrar til kvantitative variasjoner i fenotype og reaksjoner på omgivelsesfaktorer omfattende diett og medikamenter blant individer. Derfor har eksistensen av en SNP og/eller kombinasjoner av alleler (betegnet haplotyper) mange anvendelige applikasjoner, slik som diagnose av nedarvede sykdommer, bestemmelse av medikament reaksjoner og doser, identifikasjon av gener ansvarlige for sykdommer og analyse av det genetiske slektskapet mellom individer (P. Nowotny, J. M.

Kwon and A. M. Goate, "SNP analysis to dissect human traits," *Curr. Opin. Neurobiol.* 2001 Oct; 11(5):637-641; M. Pirmohamed and B. K. Park, "Genetic susceptibility to adverse drug reactions," *Trends Pharmacol. Sci.* 2001 Jun; 22(6):298-305; J. H. Riley, C. J. Allan, E. Lai and A. Roses, "The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes," *Pharmacogenomics*. 2000 Feb; 1(1):39-47; R. Judson, J. C. Stefens and A. Windemuth, "The predictive power of haplotypes in clinical response," *Pharmacogenomics*. 2000 Feb; 1(1):15-26).

[0452] SNPer er identifisert ved en rekke artsaksepterte fremgangsmåter (P. Bean, "The promising voyage of SNP target discovery," *Am. Clin. Lab.* 2001 Oct-Nov; 20(9):18-20; K. M. Weiss, "In search of human variation," *Genome Res.* 1998 Jul; 8(7):691-697; M. M. She, "Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies," *Clin. Chem.* 2001 Feb; 47(2):164-172). For eksempel er SNPer identifisert ved sekvensering av DNA-fragmenter som viser polymorfisme ved gelbaserte fremgangsmåter slik som restriksjonsfragment lengde polymorfisme (RFLP) og denaturerende gradient gelelektroforese (DGGE). De er også oppdaget ved direkte sekvensering av DNA-prøver samlet fra forskjellige individer eller ved å sammenligne sekvenser fra forskjellig DNA-prøver. Med den raske akkumuleringen av sekvensdata i publiserte og private databaser oppdager én også SNPer ved å sammenligne sekvenser ved anvendelse av dataprogrammer (Z. Gu, L. Hillier and P. Y. Kwok, "Single nucleotide polymorphism hunting in cyberspace," *Hum. Mutat.* 1998; 12(4):221-225). SNPer kan bli verifisert og genoypen eller haplotypen til et individ kan bestemmes ved en rekke fremgangsmåter omfattende direkte sekvensering og høy gjennomstrømning mikroarrayer (P. Y. Kwok, "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2001; 2:235-258; M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Mathis, B. Erwin, P. Grass, B. Hines and A. Dueterhoeft, "High-throughput SNP genotyping with the Masscode system," *Mol. Diagn.* 2000 Dec; 5(4):329-340).

[0453] Ved anvendelse av fremgangsmåtene beskrevet ovenfor ble tretten SNP identifisert i transkriptet for PSCA-v.2. Variant 2 ble anvendt, heller enn for eksempel variant 1, da det hadde færre tvetydige baser enn variant 1. Følgelig ble SNPer identifisert for PSCA-v.2 i posisjoner 57 (t/c), 367 (c/t), 424 (a/c), 495 (c/g), 499 (c/t), 563 (c/t), 567 (g/a), 627 (g/a), 634 (t/g), 835 (g/a), 847 (g/a), 878 (g/a) og 978 (c/g). Transkriptene eller proteinene med alternative alleler ble betegnet som variant PSCA-v.6 til og med v.18, som vist i figur 1B og figur 1 G.

[0454] Nukleotidforandringen i v.6 endret startkodonet til v.1 og således ville translasjonen ikke start inntil neste ATG (AUG i mRNA), hvilket resulterer i et protein 9 AA kortere enn v.1-protein. Nukleotidendringene for v.7 og v.8 ble stumme på proteinnivået.

[0455] Tolv av disse 13 SNPer var også til stede i variant 4. De 12 SNP-variantene i relativt til PSCA-v. 4 er betegnet PSCA-v.19 til og med v.30. Varianter 19 til og med 27 koder for alternative aminosyrer som vist i figur 1H.

Eksempel 4

Produksjon av rekombinant-PSCA i prokaryote systemer

[0456] For å uttrykke rekombinant-PSCA og PSCA-varianter i prokaryote celler, er den fulle eller partielle lengden av PSCA og PSCA-variant cDNA-sekvenser klonet inn i hvilken som helst éne av en rekke ekspresjonsvektorer kjent på området. Én eller flere av de følgende regionene av PSCA-varianter er uttrykt: fullengde sekvensen presentert i figur 1 eller hvilken som helst 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 eller flere påfølgende aminosyrer fra PSCA, varianter eller analoger derav.

A. In vitro-transkripsjons- og translasjonskonstruksjoner:

[0457] pCRII: For å danne PSCA-sense og antisense RNA-prober for RNA in situ-undersøkelser er pCRII-konstruksjoner (Invitrogen, Carlsbad CA) dannet som koder for enten hele eller fragmenter av PSCA-cDNAet. pCRII-vektoren har Sp6- og T7-promotere flankerende insersjonen for å drive transkripsjonen av PSCA-RNA for anvendelse som prober i RNA in situ-hybridiseringsforsøk. Disse probene blir anvendt for å analysere celle- og vevsekspressjonen av PSCA på RNA-nivået. Transkribert PSCA-RNA som representerer den cDNA-aminosyrekodende regionen av PSCA-genet blir anvendt i *in vitro*-translasjonssystemer slik som TnT™ Coupled Reticulolysatsystemet (Promega, Corp., Madison, WI) for å syntetisere PSCA-protein.

B. Bakterielle konstrukter:

[0458] pGEX-konstrukter: For å danne rekombinante PSCA-proteiner i bakterier som er kondensert til glutation-S-transferase (GST)-proteinet er hele eller deler av den PSCA-cDNA-proteinkodende sekvensen klonet inn i pGEX-familien av GST-fusjonsvektorer (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Disse konstruksjonene tillater kontrollert ekspresjon av rekombinante PSCA-proteinsekvenser med GST kondensert på aminotermussen og en seks-histidinepitop (6XHis) på karboksylterminusen. GST- og 6XHis-tagene tillater rensning av det rekombinante fusjonsproteinet fra induserte bakterier med den passende

affinitetsmatriksen og tillater gjenkjennelse av fusjonsproteinet med anti-GST- og anti-His-antistoffer. 6XHis-taggen er dannet ved tilsetning av 6 histidinkodoner til kloningsprimeren ved 3'-enden, *f.eks.* av den åpne leserammen (ORF). Et proteolytisk spaltningssete, slik som PreScission™-gjenkjennelsessetet i pGEX-6P-1, kan anvendes slik at det tillater spaltning av GST-taggen fra PSCA-relatert protein. Ampicillinresistensgenet og pBR322-opprinnelsen tillater seleksjon og opprettholdelse av pGEX-plasmidene i *E. coli*.

[0459] pMAL-konstrukter: For å danne rekombinante PSCA-proteiner, i bakterier, som er kondensert til maltosebindingsprotein (MBP) er hele eller deler av den PSCA-cDNA-proteinkodende sekvensen kondensert til MBP-genet ved kloning inn i pMAL-c2X- og pMAL-p2X-vektorene (New England Biolabs, Beverly, MA). Disse konstruksjonene tillater kontrollert ekspresjon av rekombinante PSCA-proteinsekvenser med MBP kondensert på aminotermiusen og en 6XHis-epitoptag på karboksylterminusen. MBP- og 6XHis-tagene tillater rensning av det rekombinante proteinet fra induerte bakterier med den passende affinitetsmatriksen og tillater gjenkjennelse av fusjonsproteinet med anti-MBP- og anti-His-antistoffer. 6XHis-epitoptagen er dannet ved tilsetning av 6 histidinkodoner til 3'-kloningsprimeren. Et faktor Xa-gjenkjennelsessete tillater spaltning av pMAL-taggen fra PSCA. pMAL-c2X- og pMAL-p2X-vektorene er optimalisert for å uttrykke det rekombinante proteinet i henholdsvis cytoplasmaet eller periplasmaet. Periplasmaekspresjon forsterker folding av proteiner med disulfidbindinger.

[0460] pET-konstrukter: For å uttrykke PSCA i bakterieceller er hele eller deler av den PSCA-cDNA-proteinkodende sekvensen klonet inn i pET-familien av vektorer (Novagen, Madison, WI). Disse vektorene tillater stramt kontrollert ekspresjon av rekombinant PSCA-protein i bakterier med og uten fusjon til proteiner som forsterke oppløselighet, slik som NusA og tioredoksin (Trx) og epitoptager, slik som 6XHis- og S-Tag™ som hjelper til rensning og deteksjon av det rekombinante proteinet. For eksempel er konstruksjoner gjort ved anvendelse av pET-NusA-fusjonssystem 43.1 slik at regioner av PSCA-proteinet er uttrykt som aminoterminal fusjoner til NusA.

C. Gjærkonstrukter:

[0461] pESC-konstrukter: For å uttrykke PSCA i gjærarten *Saccharomyces cerevisiae* for dannelse av rekombinant protein og funksjonelle undersøkelser er hele eller deler av den PSCA-cDNA-proteinkodende sekvensen klonet inn i pESC-familien av vektorer som hver inneholder 1 av 4 selekterbare markører, HIS3, TRP1, LEU2 og URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). Disse vektorene tillater kontrollert ekspresjon fra det samme plasmidet av opptil 2

forskjellig gener eller klonete sekvenser inneholdende enten FlagTM- eller Myc-epitoptager i den samme gjærcellen. Dette systemet er anvendelig for å bekrefte protein-proteininteraksjoner til PSCA. I tillegg innbringer ekspresjon i gjær lignende posttranslasjonelle modifikasjoner, slik som glykosyleringer og fosforyleringer, som er funnet når uttrykt i eukaryote celler.

[0462] pESP-konstrukter: For å uttrykke PSCA i gjærarten *Saccharomyces pombe* er hele eller deler av den PSCA-cDNA-proteinkodende sekvensen klonet inn i pESP-familien av vektorer. Disse vektorene tillater kontrollert høyt ekspresjonsnivå av en PSCA-proteinsekvens som er kondensert på enten aminoterminusen eller på karboksylterminusen til GST som hjelper til rensning av det rekombinante proteinet. En FlagTM-epitoptag tillater deteksjon av det rekombinante proteinet med anti-FlagTM-antistoff.

Eksempel 5

Produksjon av rekombinant-PSCA i høyere eukaryote systemer

A. Mammalske konstrukter:

[0463] For å uttrykke rekombinant-PSCA i eukaryote celler kan den fulle eller partielle lengden av PSCA-cDNA-sekvenser eller varianter derav klones inn i hvilken som helst éne av en rekke ekspresjonsvektorer kjent på området. Én eller flere av de følgende regionene av PSCA er uttrykt i disse konstruksjonene, aminosyrer 1 til 123 eller hvilken som helst 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 eller flere påfølgende aminosyrer fra PSCA-v.1, PSCA-varianter eller analoger derav.

[0464] Konstruksjonene kan transfekteres inn i hvilken som helst éne av en rekke mammalske celler slik som 293T-celler. Transfekterte 293T-cellelysater kan være probet med det anti-PSCA-polyklonale serumet beskrevet her.

[0465] pcDNA4/HisMax-konstrukter: For å uttrykke PSCA hos mammalske celler er et PSCA-ORF eller deler derav av PSCA klonet inn i pcDNA4/HisMax-versjon A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proteinekspresjon er drevet fra cytomegalovirus (CMV)-promoter og den SP16-translasjonelle enhanceren. Det rekombinante proteinet har XpressTM- og seks-histidin (6XHis)-epitoper kondensert til aminoterminusen. pcDNA4/HisMax-vektoren inneholder også bovin veksthormon (BGH)-polyadenyleringssignalet og transkripsjonstermineringssekvensen for å forbedre mRNA-stabilitet sammen med SV40-opprinnelsen for episomal replikasjon og enkel vektorunnsetting ("rescue") i cellelinjer som uttrykker det store T-antigenet. Zeocinresistensgenet tillater seleksjon av mammalske celler

som uttrykker proteinet og ampicillinresistensgenet og ColE1-opprinnelse tillater seleksjon og opprettholdelse av plasmidet i *E. coli*.

[0466] pcDNA3.1/MycHis-konstrukt: For å uttrykke PSCA i mammalske celler ble et PSCA-ORF eller deler derav av PSCA med et konsensus Kozak-translasjonsinitieringssete klonet inn i pcDNA3.1/MycHis-versjon A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proteinekspresjon er drevet fra cytomegalovirus (CMV)-promoter. De rekombinante proteinene har myc-epitopen og 6XHis-epitopen kondensert til karboksylterminusen. pcDNA3.1/MycHis-vektoren også inneholde bovine veksthormon (BGH)-polyadenyleringssignalet og transkripsjonstermineringssekvensen for å forbedre mRNA-stabilitet, sammen med SV40-opprinnelsen for episomal replikasjon og enkel vektorinnsetting i cellelinjer som uttrykker det store T-antigenet. Neomycinresistensgenet kan anvendes da det tillater seleksjon av mammalske celler som uttrykker proteinet og ampicillinresistensgenet og ColE1-opprinnelse tillater seleksjon og opprettholdelse av plasmidet i *E. coli*.

[0467] pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO-konstruksjon: For å uttrykke PSCA hos mammalske celler og for å tillate deteksjon av de rekombinante proteinene ved anvendelse av fluorescens er et PSCA-ORF eller deler derav, med et konsensus Kozak-translasjonsinitieringssete, klonet inn i pcDNA3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). Proteinekspresjon er drevet fra cytomegalovirus (CMV)-promoter. De rekombinante proteinene har det grønt fluorescerende proteinet (GFP) kondensert til karboksylterminusen som fasiliterer ikke-invasiv *in vivo*-deteksjon og cellebiologiundersøkelser. pcDNA3.1CT-GFP-TOPO-vektoren også inneholde det bovine veksthormon (BGH)-polyadenyleringssignalet og transkripsjonstermineringssekvensen for å forbedre mRNA-stabilitet sammen med SV40-opprinnelsen for episomal replikasjon og enkel vektorinnsetting i cellelinjer som uttrykker det store T-antigenet. Neomycinresistensgenet tillater seleksjon av mammalske celler som uttrykker proteinet og ampicillinresistensgenet og ColE1-opprinnelse tillater seleksjon og opprettholdelse av plasmidet i *E. coli*. Ytterligere konstruksjoner med en aminoterminal GFP-fusjon er gjort i pcDNA3.1/NT-GFP-TOPO som spenner over hele lengde til et PSCA-protein.

[0468] PAPtag: Et PSCA-ORF eller deler derav er klonet inn i pAPtag-5 (GenHunter Corp. Nashville, TN). Denne konstruksjonen genererer en alkalisk fosfatasefusjon på karboksylterminusen til et PSCA-protein mens kondensering av IgGκ-signalsekvensen til aminoterminalen. Konstrukt er også dannet hvor alkalisk fosfatase med en aminoterminal IgGκ-signalsekvens er kondensert til aminoterminalen til et PSCA-protein. De resulterende

rekombinante PSCA-proteinene er optimalisert for sekresjon i mediumet til transfekterte mammalske celler og kan anvendes for å identifisere proteiner slik som ligander eller reseptorer som interagerer med PSCA-proteiner. Proteinekspresjon er drevet fra CMV-promoteren og de rekombinante proteinene inneholder også myc- og 6XHis-epitoper kondensert på karboksylterminusen som letter deteksjon og rensning. Zeocinresistensgenet til stede i vektoren tillater seleksjon av mammalske celler som uttrykker det rekombinante proteinet og ampicillinresistensgenet tillater seleksjon av plasmidet i *E. coli*.

[0469] ptag5: Et PSCA-ORF eller deler derav ble klonet inn i pTag-5. Denne vektoren er lignende til pAPtag men uten den alkalisk fosfatasefusjonen. Denne konstruksjonen genererer PSCA-protein med en aminoterminal IgGκ-signalsekvens og myc- og 6XHis-epitoptager på karboksylterminusen som letter deteksjon og affinitetsrensning. Det resulterende rekombinante PSCA-protein er optimalisert for sekresjon til mediumet av transfekterte mammalske celler og blir anvendt som immunogen eller ligand for å identifisere proteiner slik som ligander eller reseptorer som interagerer med PSCA-proteinene. Proteinekspresjon er drevet fra CMV-promoteren. Zeocinresistensgenet til stede i vektoren tillater seleksjon av mammalske celler som uttrykker proteinet og ampicillinresistensgenet tillater seleksjon av plasmidet i *E. coli*.

[0470] PsecFc: Et PSCA-ORF eller deler derav ble klonet inn i psecFc. psecFc-vektoren ble sammenlignet ved kloning av det humane immunoglobulin G1 (IgG)-Fc (hengsel, CH2, CH3-regioner) inn i pSecTag2 (Invitrogen, California). Denne konstruksjonen genererer en IgG1-Fc-fusjon på karboksylterminusen av PSCA-proteinene, mens kondensering av IgGκ-signalsekvensen til N-terminus. PSCA-fusjoner ved anvendelse av den murine IgG1-Fc-regionen er også anvendt. De resulterende rekombinante PSCA-proteinene er optimalisert for sekresjon til mediumet av transfekterte mammalske celler og kan anvendes som immunogener eller for å identifisere proteiner slik som ligander eller reseptorer som interagerer med PSCA-protein. Proteinekspresjon er drevet fra CMV-promoteren. Hygromycinresistensgenet til stede i vektoren tillater seleksjon av mammalske celler som uttrykker det rekombinante proteinet og ampicillinresistensgenet tillater seleksjon av plasmidet i *E. coli*.

[0471] Figur 8 viser ekspresjon og rensning av PSCA.psecFc-protein fra 293T-celler.

[0472] pSRα-konstrukt: For å danne mammalske cellelinjer som uttrykker PSCA konstitutivt ble PSCA-ORF eller deler derav av PSCA klonet inn i pSRα-konstruksjoner. Amfotropiske og ekotropiske retrovirus ble dannet ved transfeksjon av henholdsvis pSRα-konstruksjoner inn i 293T-10A1-pakkingslinjen eller kotransfeksjon av pSRα og et

hjelpeplasmid (inneholdende deletert pakningssekvenser) inn i 293-cellene. Retroviruset blir anvendt for å infisere en rekke mammalske cellelinjer, hvilket resulterer i integreringen av det klonete genet, PSCA, inn i vertscellelinjene. Proteinekspresjon er drevet fra et langt terminal repeterende element (LTR). Neomycinresistensgenet til stede i vektoren tillater seleksjon av mammalske celler som uttrykker proteinet, og ampicillinresistensgenet og ColE1-opprinnelse tillater seleksjon og opprettholdelse av plasmidet i *E. coli*. De retrovirale vektorene kan deretter anvendes for infeksjon og dannelsen av forskjellige cellelinjer ved anvendelse av for eksempel PC3-, NIH 3T3-, TsuPr1-, 293- eller rat-1-celler.

[0473] Figur 6 viser ekspresjon av PSCA i rekombinant murin, rotte og humane cellelinjer ved anvendelse av PSCA.pSR α -konstruksjonen. De angitt murine, rotte og humane cellelinjene ble infisert med retrovirus som bærer det humane PSCA-cDNAet og et neomycinresistensgen eller med bare neomycinresistensgenet. Stabile rekombinante cellelinjer ble dannet ved G418-medikamentsseleksjon. PSCA-ekspresjon ble bestemt ved FACS-merking med 1G8-anti-PSCA-MAb (5 ug/ml). Vist er FACS-profilen av hver cellelinje som viser et fluorescerende skift bare i den PSCA-infiserte linjen som indikerer celleoverflate-PSCA-ekspresjon. Disse linjene er anvendelige i MAb-utvikling som immunogener, MAb-screeningsreagenser og i funksjonelle forsøk.

[0474] Ytterligere pSR α -konstruksjoner er gjort som kondenserer en epitoptag slik som FLAGTM-tagen til karboksylterminusen av PSCA-sekvenser for å tillate deteksjon ved anvendelse av anti-Flag-antistoffer. For eksempel blir FLAGTM-sekvensen 5'-gat tac aag gat gac gat aag 3' (SEKV ID NR:76) satt til kloningsprimer ved 3'-enden av ORFet. Ytterligere pSR α -konstruksjoner er gjort for å produsere både aminoterminal og karboksylterminal GFP og myc/6XHis-fusjonsproteiner av de fullengde PSCA-proteinene.

[0475] Ytterligere virale vektorer: Ytterligere konstruksjoner er gjort for viralmediert levering og ekspresjon av PSCA. Høyt virustiter hvilket fører til høynivåekspresjon av PSCA blir oppnådd i virale leveringssystemer slik som adenovirale vektorer og herpes amplikonvektorer. PSCA-kodende sekvenser eller fragmenter derav er amplifisert ved PCR og subklonet inn i AdEasy-skyttelvektoren (Stratagene). Rekombinering og viruspakking blir utført i henhold til produsentens instruksjoner for å danne adenovirale vektorer. Alternativt er PSCA-kodende sekvenser eller fragmenter derav klonet inn i HSV-1-vektoren (Imgenex) for å danne herpes virale vektorer. De virale vektorene er deretter anvendt for infeksjon av forskjellige cellelinjer slik som PC3-, NIH 3T3-, 293- eller rat-1-celler.

[0476] Regulerte ekspresjonssystemer: For å kontrollere ekspresjon av PSCA hos mammalske celler er kodende sekvensene av PSCA eller deler derav klonet inn i regulerte mammalske ekspresjonssystemer slik som T-Rex-systemet (Invitrogen), GeneSwitch-systemet (Invitrogen) og det stramt regulerte Ecdyson-systemet (Sratagen). Disse systemene tillater undersøkelse av de temporale og konsentrasjonsavhengige effektene av rekombinant PSCA. Disse vektorene er deretter anvendt for å kontrollere ekspresjon av PSCA i forskjellige cellelinjer slik som PC3-, NIH 3T3-, 293- eller rat-1-celler.

B. Baculovirus-ekspresjonssystemer

[0477] For å danne rekombinante PSCA-proteiner i et baculovirus-ekspresjonssystem er PSCA-ORF eller deler derav klonet inn i baculovirusoverføringsvektoren pBlueBac 4.5 (Invitrogen), som tilveiebringer en His-tag på N-terminusen. Spesifikt er pBlueBac-PSCA kotransfektet med hjelpeplasmid-pBac-N-Blue (Invitrogen) inn i SF9- (Spodoptera frugiperda) insektceller for å danne rekombinante baculovirus (se Invitrogens instruksjonsmanual for detaljer). Baculovirus blir deretter oppsamlet fra cellesupernatant og renses ved plakkforsøk.

[0478] Rekombinant PSCA-protein blir deretter dannet ved infeksjon av HighFive-insektceller (Invitrogen) med rensete baculovirus. Rekombinant PSCA-protein kan detekteres ved anvendelse av anti-PSCA eller anti-His-tag-antistoff. PSCA-protein kan renses og anvendes i forskjellige cellebaserte forsøk eller som immunogen for å danne polyklonale og monoklonale antistoffer spesifikke for PSCA.

C. Ekspresjonsvektorer for PSCA-ortologer

[0479] Muse- og ape-ortologer av PSCA ble klonet inn i pcDNA3.1/MycHis-versjon A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Proteinekspresjon er drevet fra cytomegalovirus (CMV)-promoter. De rekombinante proteinene har myc-epitopen og 6XHis-epitopen kondensert til karboksylterminusen. Disse vektorene tillater ekspresjon av PSCA-ortologer til å analysere kryssreaktivitet til monoklonale antihumane PSCA-antistoffer.

[0480] Muse- og ape-ortologer av PSCA ble også klonet inn i pSR α -konstruksjoner. pSR α -konstruksjonene tillater dannelsen av mammalske cellelinjer som konstitutivt uttrykker PSCA-ortologer. Proteinekspresjon er drevet fra cytomegalovirus (CMV)-promoter. De rekombinante proteinene har myc-epitopen og 6XHis-epitopen kondensert til karboksylterminusen. Disse vektorene tillater ekspresjon av PSCA-ortologer for å analysere kryssreaktivitet til monoklonale antihumane PSCA-antistoffer og å undersøke funksjonell aktivitet til PSCA-ortologer. Amfotropiske og ekotropiske retrovirus ble dannet ved

transfeksjon av henholdsvis pSR α -konstruksjoner inn i 293T-10A1-pakkingslinjen eller kotransfeksjon av pSR α og et hjelpeplasmid (inneholdende deleterte pakningssekvenser) inn i 293-cellene. Retroviruset blir anvendt for å infisere en rekke mammalske cellelinjer, hvilket resulterer i integreringen av det klonete genet, PSCA-ortolog, inn i vertscellelinjene.

[0481] Figur 7 viser ekspresjon av mus og simian PSCA.pcDNA3.1/MycHis etter transfeksjon inn i 293T-celler. 293T-celler ble transfektert med enten muse-PSCA.pcDNA3.1/MycHis eller simian PSCA.pcDNA3.1/MycHis eller pcDNA3.1/MycHis-vektor kontroll. Før ti timer senere ble celler oppsamlet og analysert ved flowcytometri ved anvendelse av anti-PSCA monoklonale antistoffer.

Eksempel 6

Antigenisitetsprofiler og sekundærstruktur

[0482] Aminosyreprofiler av PSCA-varianter 1, 3 og 4, ble funnet tilgjengelige på ProtScale-websiden på World Wide Web på (expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) på ExPasy molekylærbiologiserveren.

[0483] Disse profilerer: Hydrofilitet (Hopp T.P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828); hydrofatisitet (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132); prosentdel tilgjengelige residuer (Janin J., 1979 Nature 277:491-492); gjennomsnitts fleksibilitet (Bhaskaran R. and Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255); beta-turn (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294); og eventuelt andre tilgjengelige på området slik som på ProtScale-websiden, ble anvendt for å identifisere antigene regioner av hver av PSCA-variantproteinene. Hver av de ovenfor aminosyreprofilene til PSCA-varianter ble dannet ved anvendelse av de følgende ProtScale-parametere for analyse: 1) En vindustørrelse på 9; 2) 100% vekt av vinduskantene sammenlignet med vindussentrumet; og 3) aminosyreprofilverdier normalisert til å ligge mellom 0 og 1.

[0484] Hydrofilitets-, hydrofatisitets- og prosentdel tilgjengelige residue-profiler ble anvendt for å bestemme strekker av hydrofile aminosyrer (*dvs.* verdier større enn 0,5 på hydrofilitets- og prosentdel tilgjengelige residue-profilen og verdier mindre enn 0,5 på hydrofatisitetsprofilen). Slike regioner er sannsynlig til å være eksponert for den vandige omgivelsen, være til stede på overflaten av proteinet og således tilgjengelige for immun gjenkjennelse slik som av antistoffer.

[0485] Gjennomsnittets fleksibilitet og beta-turnprofiler bestemmer strekker av aminosyrer (dvs. verdier større enn 0,5 på beta-turnprofilen og gjennomsnittets fleksibilitetsprofilen) som ikke er tvungen i sekundære strukturer slik som beta-sheets og alfahelikser. Slike regioner er også mer sannsynlig for å være eksponert på proteinet og således tilgjengelige for immun gjenkjennelse slik som ved antistoffer.

[0486] Antigene sekvenser av PSCA-variantproteinene angitt, *f.eks.* ved profiler beskrevet ovenfor, blir anvendt for å fremstille immunogener, enten peptider eller nukleinsyrer som koder for dem, for å danne terapeutiske og diagnostiske anti-PSCA-antistoffer. Immunogenet kan være hvilke som helst 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50 eller flere enn 50 påfølgende aminosyrer eller de tilsvarende nukleinsyrene som koder for dem, fra PSCA-proteinvariantene listet opp i figur 1 av hvilke aminosyreprofilene kan bli konkludert fordi varianten inneholder sekvens som er den samme som en vist variant. Spesielt kan peptidimmunogener ifølge oppfinnelsen omfatte, en peptidregion på minst 5 aminosyrer fra figur 1 i hvilket som helst helt antall tilvekst som omfatter en aminosyreposisjon som har en verdi større enn 0,5 i hydrofilitetsprofilen; en peptidregion på minst 5 aminosyrer fra figur 1 i hvilket som helst helt antall tilvekst som omfatter en aminosyreposisjon som har en verdi mindre enn 0,5 i hydrofatisitetsprofilen; en peptidregion på minst 5 aminosyrer fra figur 1 i hvilket som helst helt antall tilvekst som omfatter en aminosyreposisjon som har en verdi større enn 0,5 i prosent tilgjengelige residue-profilene; en peptidregion på minst 5 aminosyrer av figurer 1 i hvilket som helst helt antall tilvekst som omfatter en aminosyreposisjon som har en verdi større enn 0,5 i gjennomsnittets fleksibilitetsprofilene; og en peptidregion på minst 5 aminosyrer fra figur 1 i hvilket som helst helt antall tilvekst som omfatter en aminosyreposisjon som har en verdi større enn 0,5 i beta-turnprofilen. Peptidimmunogener ifølge oppfinnelsen kan også omfatte nukleinsyrer som koder for hvilken som helst av de foregående.

[0487] Alle immunogener ifølge oppfinnelsen, peptid eller nukleinsyre, kan bli konkretisert i human enhetsdoseform eller omfattet av en sammensetning som omfatter et farmasøytisk tilsetningsmiddel kompatibelt med human fysiologi.

[0488] Den sekundære strukturen av PSCA-proteinvarianter 1, 3, 4 og 6, dvs. den antatte tilstedeværelsen og lokalisasjonen av alfahelikser, forlengete tråder og tilfeldige kveiler, er forutsagte fra den primære aminosyresekvensen ved anvendelse av HNN - Hierarchical Neural Network-metoden (NPS@: Network Protein Sequence Analysis TIBS 2000 March

Vol. 25, No 3 [291]:147-150 Combet C., Blanchet C., Geourjon C. and Deléage G., http://pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), tilgjengelig fra ExPasy molekylærbiologiserveren lokalisert på World Wide Web på (expasy.ch/tools/). Analysen indikerer at PSCA-variant 1 er sammensatt av 30,89% alfaheliks, 21,95% forlenget tråd og 47,15% tilfeldig kveil. PSCA-proteinvariant 3 er sammensatt av 14,89% alfaheliks, 8,51% forlenget tråd og 76,60% tilfeldig kveil. PSCA-proteinvariant 4 er sammensatt av 9,52% alfaheliks, 8,99% forlenget tråd og 81,48% tilfeldig kveil. PSCA-proteinvariant 6 er sammensatt av 24,56% alfaheliks, 21,93% forlenget tråd og 53,51% tilfeldig kveil.

[0489] Analyse for den potensielle tilstedeværelsen av transmembrane domener i PSCA-variantproteinene ble utført ved anvendelse av en rekke transmembranforutsigelsealgoritmer tilgjengelig fra ExPasy molekylærbiologiserveren lokalisert på World Wide Web på (expasy.ch/tools/).

Eksempel 7

Dannelse av PSCA-polyklonale antistoffer

[0490] Polyklonale antistoffer kan fremkalles hos et pattedyr, for eksempel ved én eller flere injeksjoner av et immuniserende middel og, om ønsket, en adjuvans. Typisk vil det immuniserende middelet og/eller adjuvans bli injisert i pattedyret ved multiple subkutane eller intraperitoneale injeksjoner. I tillegg for å immunisere med en fullengde PSCA-proteinvariant blir dataalgoritmer anvendt i design av immunogener som, basert på aminosyresekvensanalyse inneholdende karakteristika av å være antigenisk og tilgjengelig for gjenkjennelse av immunsystemet til den immuniserte verten (se eksemplet betegnet “Antigenisitetsprofiler og sekundærstruktur”). Slike regioner ville være forutsagte å være hydrofile, fleksible, i beta-turnkonformationer og være eksponert på overflaten av proteinet.

[0491] For eksempel rekombinante bakterielle fusjonsproteiner eller peptider inneholdende hydrofile, fleksible beta-turnregioner av PSCA-proteinvarianter blir anvendt som antigener for å danne polyklonale antistoffer i New Zealand White-kaniner eller monoklonale antistoffer som beskrevet i eksemplet betegnet “Dannelse av PSCA monoklonale antistoffer (MAbs)”. For eksempel i PSCA-variant 1 omfatter slike regioner, men er ikke begrenset til, aminosyrer 28-56 og aminosyrer 66-94. For variant 3 omfatter slike regioner, men er ikke begrenset til, aminosyrer 7-39 og aminosyrer 70-94. For variant 4 omfatter slike regioner, men er ikke begrenset til, aminosyrer 6-18, aminosyrer 27-39, aminosyrer 103-133 og 177-189. For variant 6 omfatter slike regioner, men er ikke begrenset

til, aminosyrer 19-35 og aminosyrer 57-85. Det er anvendelig å konjugere det immuniserende middelet til et protein kjent for å være immunogent i pattedyret som blir immunisert. Eksempler på slik immunogeniske proteiner omfatter, men er ikke begrenset til, keyhole limpet hemocyanin (KLH), serum albumin, bovint tyroglobulin og soyabønne trypsin inhibitor. I én utførelsesform er et peptid som koder for aminosyrer 103-133 av PSCA-variant 4 konjugert til KLH og anvendt for å immunisere en kanin. Alternativt kan det immuniserende middelet omfatte hele eller deler av PSCA-variantproteinene, analoger eller fusjonsproteiner derav. For eksempel kan PSCA-variantaminosyresekvensene kondenseres ved anvendelse av rekombinante DNA-teknikker til hvilken som helst éne av en rekke fusjonsproteinpartnere som er velkjente på området, slik som glutathion-S-transferase (GST) og HIS-taggete fusjonsproteiner. I én utførelsesform ble PSCA-variant 1-sekvensen, aminosyrer 18-98, kondensert til GST ved anvendelse av rekombinante teknikker i pGEX-ekspresjonsvektoren uttrykt, renset og anvendt for å immunisere både kaniner og mus for å danne henholdsvis polyklonale og monoklonale antistoffer. Slike fusjonsproteiner blir renset fra induerte bakterier ved anvendelse av den passende affinitetsmatriksen.

[0492] Andre rekombinante bakterielle fusjonsproteiner som kan anvendes omfatter maltosebindingsprotein LacZ, tioredoksin, NusA eller en immunoglobulin konstant region (se avsnittet betegnet "Produksjon av PSCA i prokaryote systemer" og Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubul *et al.* eds., 1995; Linsley, P.S., Brady, W., Urnes, M., Grosmaire, L., Damle, N. and Ledbetter, L.(1991) J.Exp. Med. 174, 561-566).

[0493] I tillegg til bakterielt avledete fusjonsproteiner er mammalske uttrykte proteinantigener også anvendt. Disse antigener er uttrykt fra mammalske ekspresjonsvektorer slik som Tag5- og Fc-fusjonsvektorene (se avsnittet betegnet "Produksjon av rekombinant PSCA i eukaryote systemer") og beholder posttranslasjonelle modifikasjoner slik som glykosyleringer funnet i naturlig protein. I én utførelsesform ble cDNAet til PSCA-variant 1, minus det N-terminale lederpeptidet og C-terminale GPI-ankeret, klonet inn i den Tag5 mammalske sekresjonsvektoren og uttrykt i 293T-celler. Det rekombinante proteinet ble renset ved metallkjelat-kromatografi fra vevkultursupernatanter fra 293T-celler som stabilt uttrykker den rekombinante vektoren. Det rensete Tag5 PSCA-protein ble deretter anvendt som immunogen.

[0494] I løpet av immuniseringsprotokollen er det anvendelig å blande eller emulgere antigenet i adjuvantia som forsterker immunresponsen til vertedyret. Eksempler på adjuvantia

omfatter, men er ikke begrenset til, fullstendig Freund's adjuvans (CFA) og MPL-TDM-adjuvans (monofosforyl lipid A, syntetisk trehalose-dicorynomycolat).

[0495] I er typisk protokoll er kaniner innledningsvis immunisert subkutan med opptil 200 µg, typisk 100-200 µg, av fusjonsprotein eller peptid konjugert til KLH blandet i fullstendig Freund's adjuvans (CFA). Kaniner blir deretter injisert subkutan hver andre uke med opptil 200 µg, typisk 100-200 µg, av immunogenet i ufullstendig Freund's adjuvans (IFA). Testblødninger er tatt omtrent 7-10 dager etter hver immunisering og anvendt for å overvåke titeret av antiserumet ved ELISA.

[0496] For å teste reaktivitet og spesifisitet av immunt serum, slik som kaninserum avledet fra immunisering med en GST-fusjon av PSCA-variant 3 eller 4 protein, er den respektive fullengde PSCA-varianten av cDNA klonet inn i pCDNA 3.1 myc-his-ekspresjonsvektor (Invitrogen, se eksemplet betegnet "Produksjon av rekombinant-PSCA i eukaryote systemer"). Etter transfeksjon av konstruksjonene inn i 293T-celler er cellelysater probet med det antivariante serumet og med anti-His-antistoffet (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) for å bestemme spesifikk reaktivitet til denaturert variantprotein ved anvendelse av Western-blott-teknikken. I tillegg blir det immune serumet testet ved fluorescens mikroskopi, flowcytometri og immunopresipitering mot 293T og andre rekombinante PSCA-variantuttrykkende celler for å bestemme spesifikk gjenkjennelse av naturlig protein. Western-blott, immunopresipitering, fluorescerende mikroskopi og flowcytometriske teknikker ved anvendelse av celler som endogent uttrykker PSCA er også utført for å teste reaktivitet og spesifisitet.

[0497] Antiserum fra kaniner immunisert med PSCA-variantfusjonsproteiner, slik som GST- og MBP-fusjonsproteiner, blir rensset ved utarming av antistoffer reaktive til fusjonspartnersekvensen ved passasje over en affinitetskolonne inneholdende fusjonspartneren enten alene eller i sammenheng med et irrelevant fusjonsprotein. For eksempel er antiserum avledet fra et GST-PSCA-variant 1-fusjonsprotein først rensset ved passasje over en kolonne av GST-protein kovalent koblet til AffiGel-matriks (BioRad, Hercules, Calif.). Antiserumet blir deretter affinitetsrenset ved passasje over en kolonne sammensatt av et MBP-PSCA-fusjonsprotein kovalent koblet til Affigel-matriks. Serumet blir deretter ytterligere rensset ved protein-G-affinitetskromatografi for å isolere IgG-fraksjonen. Sera fra andre His-merkete antigener og peptidimmuniserte kaniner så vel som fusjonspartnerutarmet sera er affinitetsrenset ved passasje over en kolonnematriks sammensatt av det opprinnelige proteinimmunogenet eller fritt peptid.

Eksempel 8

Dannelse av PSCA monoklonale antistoffer (MAbs)

[0498] I én utførelsesform omfatter terapeutiske monoklonale antistoffer ("MAbs") til PSCA og PSCA-varianter de som reagerer med epitoper spesifikke for hvert protein eller spesifikke til sekvenser til vanlig mellom variantene som ville binde, internalisere, ødelegge eller modulere den biologiske funksjonen av PSCA eller PSCA-varianter, for eksempel de som ville ødelegge interaksjonen med ligander og bindingspartnere. Immunogener for dannelse av slike MAbs omfatter de utformet til å kode for eller inneholde det ekstracellulære domenet eller hele PSCA-proteinsekvensen, regioner forutsagte å inneholde funksjonelle motiver og regioner av PSCA-proteinvariantene forutsagte til å være antigeniske fra dataanalyse av aminosyresekvensen. Immunogener omfatter peptider, rekombinante bakterielle proteiner slik som GST-PSCA-fusjonsproteiner (figur 8) og His-tagget PSCA-pET-vektorprotein (figur 6) og mammalsk uttrykt rensset His-taggete proteiner (figur 7) og humane og murine IgG-Fc-fusjonsproteiner. I tillegg blir celler konstruert via retroviral transduksjon for å uttrykke høye nivåer av PSCA-variant 1, slik som RAT1-PSCA. 293T-PSCA, 3T3-PSCA eller 300.19-PSCA, anvendt for å immunisere mus (figur 5).

[0499] For å danne monoklonale antistoffer til PSCA ble mus først immunisert i fotputen (FP) med typisk 5-50 µg av immunogent protein eller mellom 10^6 og 10^7 PSCA-uttrykkende celler blandet i en egnet adjuvans. Eksempler på egnede adjuvantia for FP-immuniseringer er TiterMax (Sigma) for den innledende FP-injeksjonen fulgt av alungel med Immuneasy (Qiagen). Etter den innledende injeksjonen ble mus deretter immunisert to ganger ukentlig inntil tiden de er avlivet og B-celler oppnådd fra lymfeknuten anvendt for fusjon.

[0500] I løpet av immuniseringsprotokollen ble testblødninger tatt for å overvåke titeret og spesifisiteten til immunresponsen. I de fleste tilfeller ble med én gang passende reaktivitet og spesifisitet oppnådd, som bestemt ved ELISA-, Western-blotting-, immunopresipitering-, fluorescens mikroskopi- eller flowcytometrisk-analyser, ble fusjon og hybridomdannelse deretter utført ved anvendelse av elektrocelfusjon (BTX, ECM2000).

[0501] I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen monoklonale antistoffer betegnet Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.121 og Ha1-4.37. Antistoffene ble identifisert og er vist å reagere og binde med celleoverflate eller immobilisert PSCA.

[0502] MAbs mot PSCA ble dannet ved anvendelse av xenomus-teknologi[®] hvor det murine tung og kappa lettjede lokiet er inaktivert og en majoritet av det humane tung og kappa lettjede immunoglobulinlokiyet er innsatt: Ha1-1.16 ble dannet etter å immunisere

humane gamma 1-produserende xenomus (13 ganger med PSCA-GST); Ha1-5.99 ble dannet etter å immunisere humane gamma 2-produserende xenomus 6 ganger med Rat1-PSCA-celler fulgt av to injeksjoner med PSCA-tag5; Ha1-4.117, Ha1-4.37, Ha1-4.120 og Ha1-4.121 ble dannet etter å immunisere humane gamma 1-produserende xenomus) 6 ganger med Rat1-PSCA-celler fulgt av 4 injeksjoner med PSCA-tag5. Anti-PSCA-MAbene, Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120 og Ha1-4.121 binder endogen celleoverflate-PSCA uttrykt i prostatakraft-xenograftceller.

[0503] Antistoffene betegnet Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.37, Ha1-1.16 og Ha1-4.121 ble sent (via Federal Express) til American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 04-May-2004 og utpekte aksjonsnummere henholdsvis PTA-6703 og PTA-6699 og PTA-6700 og PTA-6702 og PTA-6698 og PTA-6701.

[0504] DNA-kodende sekvenser for anti-PSCA-MAbs Ha1-1.16, Ha1-5.99, Ha1-4.117, Ha1-4.120, Ha1-4.121 og Ha1-4.37 ble bestemt etter isolering av mRNA fra de respektive hybridomceller med Trizol-reagens (Life Technologies, Gibco BRL). Total-RNA ble renset og kvantifisert. Første tråds cDNAer ble dannet fra total-RNA med oligo (dT)₁₂₋₁₈ priming ved anvendelse av Gibco BRL Superscript Preamplificationssystemet. Første tråds cDNA ble amplifisert ved anvendelse av humane immunoglobulin variable tungkjede primere og humane immunoglobulin variable lett kjede primere. PCR-produkter ble klonet inn i pCRScript-vektoren (Stratagene, La Jolla). Mange kloner ble sekvensert og variabel tung og lett kjede regionene bestemt. Nukleinsyren og aminosyresekvensene til variabel tung og lett kjede regionene er listet opp i figur 2 og figur 3. Oppstilling av PSCA-antistoffer til germlin-V-D-J-sekvenser er vist i figur 4A – figur 4M.

Eksempel 9

Screening og identifikasjon av PSCA-antistoffer

[0505] Antistoffer dannet ved anvendelse av fremgangsmåtene angitt i eksemplet betegnet “Dannelse av PSCA monoklonale antistoffer (MAbs)” ble screenet og identifisert ved anvendelse av en kombinasjon av forsøk omfattende ELISA, FACS, epitopgruppering og affinitet for PSCA uttrykt på celleoverflaten.

A. PSCA human MAb-screening ved FACS.

[0506] Primær hybridomscreening for MAbs mot PSCA ble utført ved FACS. Protokollen var som følger: 50ul/brønn av hybridomsupernatant (nøyaktig) eller rensete antistoffer (i seriefortynninger) ble satt til 96-brønners FACS-plater og blandet med PSCA-uttrykkende

celler (endogene eller rekombinante, 50.000 celler/brønn). Blandingen ble innkubert ved 4°C i to timer. Ved slutten av innkubering ble cellene vasket med FACS-buffer og innkubert med 100ul av deteksjonsantistoff (anti-hIgG-PE) i 45 minutter ved 4°C. Ved slutten av innkubering ble cellene vasket med FACS-buffer, fiksert med formaldehyd og analysert ved anvendelse av FACScan. Data ble analysert ved anvendelse av CellQuest Pro-programvare. Fylte histogrammer indikerer data fra negative kontrollceller og åpne histogrammer representerer data fra PSCA-positive celler (figur 9).

[0507] Positive hybridomer identifisert fra primære screener ble overført til 24-brønns plater og supernatanter oppsamlet for bekreftende screener. Bekreftende screener omfattet FACS-analyse på B300.19-PSCA/300.19-neo, Rat1-PSCA/Rat1-neo, PC3-PSCA/neo, SW780 (blærekreftcellelinje), LAPC9AI (prostatakreftcellelinje), HPAC (pankreatisk kreftcellelinje) og ELISA-forsøk ved anvendelse av Tag5-PSCA, GST-PSCA, GST-PSCA N-term, Med. C-term og pET-PSCA.

B. PSCA human MAb-relativ affinitetsanalyse

[0508] Hybridomsupernatantene ble testet for å bestemme deres relative bindingsaffinitet til celleoverflate-PSCA. Hybridomsupernatanter ble serielt fortynnet i FACS-buffer (FB), fra µg/ml til sub-ng/ml; og evaluert i et FACS-bindingsforsøk ved anvendelse av LAPC9AI-celler. Høyaffinitetsantistoffer tilveiebrakte høye MFI-verdier. MFI-verdier for hvert punkt ble oppnådd ved anvendelse av CellQuest Pro-programvare og anvendt for affinitetsberegning ved anvendelse av Graphpad Prisme-programvare (tabell VII og tabell VIII): sigmoidal doserespons (variabel stignings)-ligning. Resultatene av den relative affinitetsanalysen er angitt i figur 10.

C. Epitopgruppering

[0509] PSCA-antistoffer ble gruppert ifølge epitop ved å bedømme deres bindingsmønster på LAPC9AI-celler. I korthet ble en liten mengde av hver av antistoffene biotinyllert; deretter ble hver av de biotinyllerte antistoffene innkubert med LAPC9AI i nærværet av overskuddsmengde (100 x) av ikke-biotinyllerte antistoffer ved 4°C i 1 time under innkuberingen. Generelt vil en overskuddsmengde av antistoffer konkurrere med biotinyllerte antistoffer hvis de binder til samme epitopen. Ved slutten av innkubering ble celler vasket og innkubert med Streptavidin-PE i 45 min ved 4°C. Etter bortvasking av det ubundne streptavidin-PEet ble cellene analysert ved anvendelse av FACS. MFI-bestemmelser ble anvendt for dataanalyse (tabell VII). Som vist i tabell XI indikerer celler belyst i gult egenkonkurranse (100% konkurranse), MFIen i disse cellene er bakgrunnskontroll for hvert

biotinylert antistoff. Celler med ingen farge indikerer at de to antistoffene konkurrerer med hverandre (lav MFI), høy MFI (belyst i blå) indikerer at de to antistoffene binder til to distinkte epitoper. Antistoffene som har same bindingsmønster binder til same epitop blant antistoffene. Det er 6 epitopgrupper innen de testete antistoffene. Tabell XI viser at PSCA 4.121 binder til dens unike epitop.

Eksempel 10

Karakterisering og ekspresjon av PSCA-antistoffer

A. Kryssreaktivitet med ape-PSCA og muse-PSCA

[0510] MAbs ble screenet og karakterisert for deres evne til å reagere med PSCA fra mus og simian opprinnelse. Denne egenskapen er anvendelig for å forstå konsekvensene av MAb-engasjement av PSCA på celler og vev ved anvendelse av muse og simiane dyremodeller. Cynomolgus-ape og muse-PSCA-genene ble klonet, uttrykt i en retrovirus og forbigående infisert inn i 293-T-celler. _____ ble innkubert med de respektive antistoffene ved anvendelse av den følgende protokollen. Testantistoffer ble innkubert med 293-T-celler som uttrykker enten Cynomolgus-ape- eller murin-PSCA eller 293T-celler som uttrykker neogenet bare som en negative kontroll. Spesifikk gjenkjennelse ble bestemt ved anvendelse av anti-hIgG-PE sekundær deteksjonsantistoff. Et representativt histogram som viser spesifisert kryssreaktivitet er presentert i figur 11. Oppsummeringen presentert i tabell X viser at alle utenom én av de antihumane PSCA-antistoffene kryssreagerer med ape-PSCA og bare ett antihumant PSCA-antistoff kryssreagerer med muse-PSCA.

B. Affinitetsbestemmelse ved FACS

[0511] Et panel på syv (7) antihumane PSCA-antistoffer ble testet for deres bindingsaffinitet til PSCA på SW780-celler, en human blærekreftcellelinje som uttrykker høyt nivå av PSCA. 23 serielle 1:2-fortynninger av rensede antistoffer ble innkubert med SW780-celler (50.000 celler pr. brønn) natten over ved 4°C med endelig konsentrasjon på 167nM til 0,01pM. Ved slutten av innkuberingen ble celler vasket og innkubert med anti-hIgG-PE-deteksjonsantistoff i 45 min ved 4°C. Etter vasking av det ubundne deteksjonsantistoffene ble cellene analysert ved FACS; MFI-verdier for hvert punkt ble oppnådd ved anvendelse av CellQuest Pro-programvare og ble anvendt for affinitetsberegning ved anvendelse av Graphpad Prisme-programvare: sigmoidal doserespons (variabel stignings)-ligning (tabell VII og tabell VIII). Affinitetsverdier for de syv (7) antistoffene er angitt i tabell IX.

Eksempel 11PSCA-antistoffinternalisering

[0512] Internalisering av Ha1-4.121 ble studert ved anvendelse av PC3-PSCA-celler. I korthet ble Ha1-4.121 innkubert med celler ved 4°C i 90 min for å tillate binding av antistoffene til celleoverflaten. Cellene ble deretter splittet i to grupper og innkubering fortsatt ved enten 37°C for å tillate antistoffinternalisering eller ved 4°C som kontroller (ingen internalisering). En syrevask etter 37°C/4°C innkubering ble anvendt for å fjerne PSCA 4.121 bundet på celleoverflate. Påfølgende permeabilisering tillot deteksjon av antistoffer bundet til internalisert PSCA. Etter innkubering med sekundære deteksjonsantistoffer ble celler analysert ved anvendelse av FACS eller observert under fluorescens mikroskop. Omtrent 30% av Ha1-4.121-internaliserte etter innkubering ved 37°C i to timer (figur 12).

Eksempel 12Antistoffmediert sekundært drap

[0513] Antistoffer til PSCA medierer saporinavhengig drap i PSCA-uttrykkende celler. B300.19 –PSCA-uttrykkende celler (750 celler/brønn) ble sådd i en 96-brønners plate på dag 1. Den påfølgende dagen ble et likt volum av medium inneholdende 2X-konsentrasjon av det angitte primære antistoffet sammen med et 2-gangers overskudd av antihuman (Hum-Zap) eller antigeit (Geit-Zap) polyklont antistoff konjugert med saporintoksin (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) satt til hver brønn. Cellene fikk innkubere i 5 dager ved 37 grader C. Ved slutten av innkuberingsperioden ble MTS (Promega) satt til hver brønn og innkubering fortsatte i ytterligere 4 timer. OD₄₅₀ ble bestemt. Resultatene i figurer 13(A) viser at PSCA-antistoffer HA1-4.121 og HA1-4.117 medierte saporinavhengig cytotoxissitet i B300.19-PSCA-celler mens et kontrollantistoff, uspesifikk human IgG1, hadde ingen effekt. Resultatene i figur 13(B) viser at tilsetning av et sekundært saporinkonjugert antistoff, som ikke gjenkjenner human-Fc, feiler i å mediere cytotoxissitet (figur 13(A) og figur 13(B)). Disse resultatene indikerer at medikamenter eller cytotoxiske proteiner selektivt kan bli levert til PSCA-uttrykkende celler ved anvendelse av en passende anti-PSCA-MAb.

Eksempel 13Antistoffimmunemediert cytotoxissitet

[0514] PSCA-antistoffer ble evaluert for å bestemme deres evne til å mediere immuneavhengig cytotoxissitet. PSCA-antistoffer (0–50 µg/ml) ble fortynnet med RHB-

buffer (RPMI 1640, Gibco Life Technologies, 20 mM HEPES). B300.19-PSCA-uttrykkende celler ble vasket i RHB-buffer og resuspendert ved en tetthet på 10^6 celler/ml. I et typisk forsøk ble 50 μ l av PSCA-antistoff, 50 μ l av fortynnet komplement kaninserum (Cedarlane, Ontario, Can) og 50 μ l av en celsuspensjon tilsatt sammen i en flatbunnet vevkulturs 96-brønners plate. Blandingen ble innkubert i 2 timer ved 37°C i en 5% CO₂-innkubator for å lette komplementmediert cellelyse. Deretter ble 50 μ l av Alamar Blue (Biosource Intl. Camarillo, CA) satt til hver brønn og innkubering fortsatte i ytterligere 4-5 timer ved 37°C. Fluorescensen i hver brønn ble lest ved anvendelse av et 96-brønners fluormeter med eksitasjon ved 530 nm og emisjon ved 590 nm. Resultatene viser at PSCA-antistoffer som har en Ig1- (HA1-4.121) eller en IgG2-isotype (HA1-5.99.1) men ikke en IgG4-isotype (HA1-6.46) var i stand til å mediere komplementavhengig lyse (figur 14).

[0515] ADCC (antistoffavhengig cellulær cytotoxicitet) er et immunmediert lytisk angrep på celler bundet med et antistoff målrettet mot et spesifikt celleoverflateantigen. I dette tilfellet er det PSCA. Immunceller gjenkjenner Fc-delen av antistoffet gjennom binding til Fc γ -reseptorer på overflaten av leukocyt-, monocyt- og NK-celler hvilket trigger et lytisk angrep som resulterer i celledød. Evnen til PSCA-antistoffer til å mediere denne reaksjonen kan evalueres ved merking av tumorceller *in vitro* med ⁵¹krom, europium eller et fluorescerende molekyl og innkubering av dem i nærværet av humane PSCA-MAbs sammen med perifert blod mononukleære celler. Spesifikk lyse av tumorcellene kan bestemmes ved å måle den prosentvise lysisen av de måletrettede tumorcellene. Vanlige endepunkter som blir bestemt omfatter frigjøring av radioaktivitet, europium eller fluorescerende fargestoff fra de døde cellene ved anvendelse av en passende deteksjonsfremgangsmåte. Alternativt kan frigjøringen av et intracellulært enzym slik som laktatdehydrogenase (LDH) måles.

Eksempel 14

Dannelse av F(Ab')₂-fragmenter

[0516] Dannelse av F(Ab')₂-fragmenter av MAb er anvendelige for å undersøke virkningene av MAb-molekyler som beholder deres bivalente anitgenbindingssete men mangler de immune effektor Fc-domene i *in vitro*- og *in vivo*-terapeutiske modeller. 20 mg av MAb-Ha1-4.121 i 20 mM natriumacetatbuffer pH 4,5 ble innkubert med og uten immobilisert pepsin (Pierce. Rockford IL) for de angitte gangene. Intakt MAb og fordøyete Fc-fragmenter ble fjernet ved protein-A-kromatografi. Vist i figur 15 er en SDS-PAGE Coomassie-farget gel av intakt ufordøyet uredusert MAb, ureduserte alikvoter av fordøyet materiale tatt fra de

angitte gangene og en redusert prøve av det endelige fordøyete F(ab')₂-produktet. Dette reagenset kan anvendes for å behandle dyr som bærer PSCA-uttrykkende tumorer. Antitumoraktiviteten observert med dette antistofffragmentet kan atskille iboende biologisk aktivitet fra aktivitet mediert av immuneavhengige mekanismer.

Eksempel 15

Ekspresjon av humane antistoffer ved anvendelse av rekombinante DNA-fremgangsmåter

[0517] For å uttrykke anti-PSCA-MAbs rekombinant i transfekterte celler ble anti-PSCA variable tung og lettkjede sekvenser klonet oppstrøms for henholdsvis de humane tungkjede IgG1- og lettkjede Igκ-konstante regionene. De fullstendige anti-PSCA human tungkjede og lettkjede kassetene ble klonet nedstrøms for CMV-promoter/enhanceren i en kloningsvektor. Et polyadenyleringssete ble omfattet nedstrøms for den MAb-kodende sekvensen. Det rekombinante anti-PSCA-MAb som uttrykker konstruksjoner ble transfektert inn i 293T-, Cos- og CHO-celler. HA1-4.121-antistoffet utskilt fra rekombinante 293-T-celler ble evaluert for binding til celleoverflate-PSCA i figur Pia-3A og sammenlignet med samme antistoff produsert fra den opprinnelige hybridomen (figur 16).

Eksempel 16

HLA-klasse I- og klasse II-bindingsforsøk

[0518] HLA-klasse I- og klasse II-bindingsforsøk ved anvendelse av rensede HLA-molekyler blir utført i henhold til beskrevne protokoller (*f.eks.* PCT-publikasjoner WO 94/20127 og WO 94/03205; Sidney *et al.*, Current Protokolls in Immunology 18.3.1 (1998); Sidney, *et al.*, J. Immunol. 154:247 (1995); Sette, *et al.*, Mol. Immunol. 31:813 (1994)). Kort beskrevet blir rensede MHC-molekyler (5 til 500 nM) innkubert med forskjellige umerkete peptidinhibitorer og 1-10 nM ¹²⁵I-radioaktivt merkete probepeptider som beskrevet. Etter innkubering blir MHC-peptidkomplekser separert fra fritt peptid ved gelfiltrering og fraksjonen av peptid bundet blir bestemt. I preliminare forsøk er typisk hver MHC-fremstilling titerert i nærværet av fikserte mengder av radioaktivt merkete peptider for å bestemme konsentrasjonen av HLA-molekyler nødvendige for å binde 10-20% av den totale radioaktiviteten. Alle påfølgende hemnings- og direkte bindingsforsøk blir utført ved anvendelse av disse HLA-konsentrasjonene.

[0519] Siden under disse betingelsene [merke]<[HLA] og IC₅₀≥[HLA] er de målte IC₅₀-verdiene rimelige tilnærminger av de sanne KD-verdiene. Peptidinhibitorer er typisk testet

ved konsentrasjoner i området fra 120 µg/ml til 1,2 ng/ml og blir testet i to til fire fullstendig uavhengige forsøk. For å tillate sammenligning av dataene oppnådd i forskjellige forsøk blir en relativ bindingsfigur beregnet for hvert peptid ved å dividere IC_{50} for en positiv kontroll for hemning med IC_{50} for hvert testete peptid (typisk umerkete versjoner av det radioaktivt merkete probepeptidet). For databaseformål og interforsøkssammenligninger er relative bindingsverdier samlet. Disse verdiene kan deretter omdannes tilbake til IC_{50} nM verdier ved å dividere IC_{50} nM til de positive kontrollene for hemning med den relative bindingen av det interessante peptidet. Denne fremgangsmåten av datasamling er nøyaktig og konsistent for sammenligning av peptider som er testet på forskjellig dager eller med forskjellig partier ("lots") av rensset MHC.

[0520] Bindingsforsøk som beskrevet ovenfor kan anvendes for å analysere HLA-supermotiv- og/eller HLA-motivbærende peptider (se tabell IV).

Eksempel 17

Konstruksjon av "minigen" multi-epitop-DNA-plasmider

[0521] Dette eksemplet diskuterer konstruksjonen av et minigenekspresjonsplasmid. Minigenplasmider kan selvfølgelig inneholde forskjellige konfigurasjoner av B-celle, CTL- og/eller HTL-epitoper eller epitopanaloger som beskrevet her.

[0522] Et minigenekspresjonsplasmid omfatter typisk multiple CTL- og HTL-peptidepitoper. I foreliggende eksempel blir HLA-A2, -A3, -B7-supermotivbærende peptidepitoper og HLA-A1 og -A24-motivbærende peptidepitoper anvendt sammen med DR-supermotivbærende epitoper og/eller DR3-epitoper. HLA-klasse I-supermotiv- eller motivbærende peptidepitopavledet-PSCA er valgt slik at multiple supermotiver/motiver er representert for å sikre bred populasjonsdekning. Tilsvarende er HLA-klasse II-epitoper valgt fra PSCA for å tilveiebringe bred populasjonsdekning, dvs. både HLA-DR-1-4-7-supermotivbærende epitoper og HLA-DR-3-motivbærende epitoper er valgt for inklusjon i minigenkonstruksjonen. De valgte CTL- og HTL-epitopene blir deretter innført i et minigen for ekspresjon i en ekspresjonsvektor.

[0523] En slik konstruksjon kan i tillegg omfatte sekvenser som dirigerer HTL-epitopene til det endoplasmatiske retikulumet. For eksempel kan Ii-proteinet kondenseres til én eller flere HTL-epitoper som beskrevet på området, hvor CLIP-sekvensen av Ii-proteinet blir fjernet og erstattet med en HLA-klasse II-epitopsekvens slik at HLA-klasse II-epitop dirigert til det endoplasmatiske retikulumet, hvor epitopen binder til et HLA-klasse II-molekyl.

[0524] Dette eksemplet illustrerer fremgangsmåtene som skal anvendes for konstruksjon av et minigenbærende ekspresjonsplasmid. Andre ekspresjonsvektorer som kan anvendes for minigensammensetninger er tilgjengelige og kjente for fagfolk på området.

[0525] Minigen DNA-plasmidet fra dette eksemplet inneholder en konsensus Kozak-sekvens og en konsensus murin kappa Ig-lettkjede signalsekvens fulgt av CTL- og/eller HTL-epitoper valgt i henhold til prinsipper beskrevet her. Sekvensen koder for en åpen leseramme kondensert til Myc- og His-antistoffepitoptagen kodet for av pCDNA 3.1-Myc-His-vektoren.

[0526] Overlappende oligonukleotider som kan, for eksempel gjennomsnitt ca. 70 nukleotider i lengde med 15 nukleotid overlappinger, bli syntetisert og HPLC-renset. Oligonukleotidene koder for de valgte peptidepitopene så vel som passende linkernukleotider, Kozak-sekvens og signalsekvens. Det endelige multiepitopeminigenet er samlet ved forlenging av de overlappende oligonukleotidene i tre sett av reaksjoner ved anvendelse av PCR. En Perkin/Elmer 9600 PCR-maskin blir anvendt og totalt 30 syklar blir utført ved anvendelse av de følgende forholdene: 95°C i 15 sek, hybridiseringstemperatur (5° nedenfor den laveste beregnede T_m til hvert primerpar) i 30 sek og 72°C i 1 min.

[0527] For eksempel blir et minigen fremstilt som følger. For en første PCR-reaksjon er 5 µg av hver av to oligonukleotider hybridisert og forlenget: I et eksempel ved anvendelse av åtte oligonukleotider, *dvs.* fire par av primere, oligonukleotider 1+2, 3+4, 5+6 og 7+8 blir kombinert i 100 µl reaksjoner inneholdende Pfu-polymerasebuffer (1x= 10 mM KCL, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM Tris-klorid, pH 8,75, 2 mM MgSO₄, 0,1% Triton X-100, 100 µg/ml BSA), 0,25 mM av hver dNTP og 2,5 U av Pfu-polymerase. Fullengde dimerproduktene blir gelrenset og to reaksjoner inneholdende produktet av 1+2 og 3+4 og produktet av 5+6 og 7+8 blir blandet, hybridisert og forlenget i 10 syklar. Halvparten av de to reaksjonene blir deretter blandet og 5 syklar av hybridisering og utvidelse utført før flankerende primere blir tilsatt for å amplifisere fullengde produktet. Fullengde produktet er gelrenset og klonet inn i pCR-blunt (Invitrogen) og individuelle kloner blir screenet ved sekvensering.

Eksempel 18

Plasmidkonstruksjon og graden til hvilke det fremkaller immunogenisitet.

[0528] Graden av hvilken en plasmidkonstruksjon, for eksempel et plasmid konstruert i henhold til det tidligere eksempelet, er i stand til å fremkalle immunogenisitet er bekreftet *in vitro* ved å bestemme epitoppresentasjon av APC etter transduksjon eller transfeksjon av APCet med en epitoputtrykkende nukleinsyrekonstruksjon. En slik undersøkelse bestemmer

“antigenisitet” og tillater anvendelsen av human APC. Forsøket bestemmer evnen til epitopen til å bli presentert av APCet i en sammenheng som er gjenkjent av en T-celle ved kvantifisering av tettheten av epitop-HLA-klasse I-komplekser på celleoverflaten.

Kvantifisering kan utføres ved direkte måling av peptidmengden eluert fra APCet (se *f.eks.* Sijts *et al.*, J. Immunol. 156:683-692, 1996; Demotz *et al.*, Nature 342:682-684, 1989); eller antallet peptid-HLA-klasse I-komplekser kan beregnes ved å måle mengden av lyse eller lymfokinfrigjøring induisert ved sykdoms eller transfekterte målceller og deretter bestemmelse av peptidkonsentrasjonen nødvendig for å oppnå ekvivalente nivåer av lyse eller lymfokinfrigjøring (se *f.eks.* Kageyama *et al.*, J. Immunol. 154:567-576, 1995).

[0529] Alternativt er immunogenisitet bekreftet gjennom *in vivo*-injeksjoner i mus og påfølgende *in vitro*-vurdering av CTL- og HTL-aktivitet, som blir analysert ved anvendelse av henholdsvis cytotoxisitets- og proliferasjonsforsøk, som detaljert *f.eks.* i Alexander *et al.*, Immunity 1:751-761, 1994.

[0530] For eksempel for å bekrefte kapasiteten av en DNA-minigenkonstruksjon inneholdende minst ett HLA-A2-supermotivpeptid for å fremkalle CTLer *in vivo* er HLA-A2.1/K^b-transgene mus for eksempel immunisert intramuskulært med 100 µg av nakent cDNA. Som et middel for sammenligning av nivået av CTLer induert ved cDNA-immunisering er en kontrollgruppe med dyr også immunisert med en aktuell peptidsammensetning som omfatter multiple epitoper syntetisert som et enkelt polypeptid som om de ville bli kodet for av minigenet.

[0531] Miltceller fra immuniserte dyr blir stimulert to ganger med hver av de respektive sammensetningene (peptidepitoper kodet i minigenet eller det polyepitopiske peptidet), deretter undersøkt for peptidspesifikk cytotoxisk aktivitet i et ⁵¹Cr-frigjøringsforsøk. Resultatene indikerer størrelsen av CTL-responsen rettet mot den A2-begrensete epitopen, som således indikerer *in vivo*-immunogenisiteten av minigenvaksinen og polyepitopiske vaksinen.

[0532] Det er derfor funnet at minigenet fremkaller immunresponser rettet mot HLA-A2-supermotivpeptidepitopene som utgjør den polyepitopiske peptidvaksinen. En lignende analyse er også utført ved anvendelse av andre HLA-A3 og HLA-B7 transgene musemodeller for å bedømme CTL-induksjon ved HLA-A3- og HLA-B7-motiv- eller supermotivepitoper, hvorved det også er funnet at minigenet fremkaller passende immunresponser rettet mot de tilveiebrakte epitopene.

[0533] For å bekrefte kapasiteten av et klasse II-epitopkodende minigen til å fremkalle HTLer *in vivo* er DR-transgene mus, eller for de epitoper som kryssreagerer med det passende muse MHC-molekylet I-A^b-begrenset mus, for eksempel immunisert intramuskulært med 100 µg av plasmid-DNA. Som et middel for sammenligning av nivået av HTLer induisert ved DNA-immunisering er en gruppe kontroll dyr også immunisert med en aktuell peptidsammensetning emulgert i fullstendig Freund's adjuvans. CD4⁺ T-celler, *dvs.* HTLer, blir rensset fra miltceller av immuniserte dyr og stimulert med hver av de respektive sammensetningene (peptider kodet i minigenet). HTL-responsen blir målt ved anvendelse av et ³H-thymidininnføringsproliferasjonsforsøk (se *f.eks.* Alexander *et al.* Immunity 1:751-761, 1994). Resultatene indikerer størrelsen av HTL-responsen som således demonstrerer *in vivo*-immunogenisiteten av minigenet.

[0534] DNA-minigener, konstruert som beskrevet i det tidligere eksemplet, kan også bekreftes som en vaksine i kombinasjon med et forskerkningsmiddel ved anvendelse av en primær forsterkerprotokoll. Forskningsmiddelet kan bestå av rekombinant protein (*f.eks.* Barnett *et al.*, Aids Res. and Human Retroviruses 14, Supplement 3:S299-S309, 1998) eller rekombinant vaccinia, som for eksempel uttrykker et minigen eller DNA som koder for det fullstendige interessante proteinet (se *f.eks.* Hanke *et al.*, Vaccine 16:439-445, 1998; Sedegah *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci USA 95:7648-53, 1998; Hanke and McMichael, Immunol. Letters 66:177-181, 1999; og Robinson *et al.*, Nature Med. 5:526-34, 1999).

[0535] For eksempel er effektiviteten av DNA-minigenet anvendt i en primær forsterkerprotokoll innledningsvis evaluert i transgene mus. I dette eksemplet er A2.1/K^b-transgene mus immunisert IM med 100 µg av et DNA-minigen som koder for de immunogene peptidene omfattende minst ett HLA-A2-supermotivbærende peptid. Etter en innkuberingsperiode (i området fra 3-9 uker) er musen forsterket IP med 10⁷ pfu/mus av et rekombinant vacciniavirus som uttrykker den samme sekvensen som kodes for av DNA-minigenet. Kontrollmus er immunisert med 100 µg DNA eller rekombinant vaccinia uten minigensekvensen eller med DNA som koder for minigenet, men uten vaccinia-forsterkningen. Etter en ytterligere innkuberingsperiode på to uker er miltceller fra musen umiddelbart undersøkt for peptidspesifikk aktivitet i et ELISPOT-forsøk. I tillegg blir miltceller stimulert *in vitro* med de A2-begrensede peptidepitopene kodet i minigenet og rekombinant vaccinia, deretter undersøkt for peptidspesifikk aktivitet i en alfa-, beta- og/eller gamma-IFN ELISA.

[0536] Det er funnet at minigenet anvendt i en primær forsterkerprotokoll fremkaller større immunresponser mot HLA-A2-supermotivpeptidene enn med DNA alene. En slik analyse kan også utføres ved anvendelse av HLA-A11- eller HLA-B7-transgene musemodeller for å bedømme CTL-induksjon ved HLA-A3- eller HLA-B7-motiv- eller supermotivepitoper. Anvendelsen av primære forsterkerprotokoller hos mennesker er beskrevet nedenfor i eksemplet betegnet "Induksjon av CTL-responser ved anvendelse av en primær forsterkerprotokoll."

Eksempel 19

Polyepitopiske vaksinesammensetninger fra multiple antigener

[0537] PSCA-peptidepitopene ifølge foreliggende oppfinnelse blir anvendt sammen med epitoper fra andre måltumorassosierte antigener, for å skape en vaksinesammensetning som er anvendelig for forebygging eller behandling av kreft som uttrykker PSCA og slike andre antigener. For eksempel kan en vaksinesammensetning gis som et enkelt polypeptid som innfører multiple epitoper fra PSCA så vel som tumorassosierte antigener som ofte er uttrykt med en målkreft forbundet med PSCA-ekspresjon eller kan administreres som en sammensetning omfattende en kocktail av én eller flere atskilte epitoper. Alternativt kan vaksinen administreres som en minigenkonstruksjon eller som dendritiske celler som er ladet med peptidepitopene *in vitro*.

Eksempel 20

Anvendelse av peptider for å bedømme en immunrespons

[0538] Peptider ifølge oppfinnelsen kan anvendes for å analysere en immunrespons for tilstedeværelsen av spesifikke antistoffer, CTL eller HTL rettet mot PSCA. En slik analyse kan utføres på en måte beskrevet av Ogg *et al.*, Science 279:2103-2106, 1998. I dette eksemplet blir peptider i henhold til oppfinnelsen anvendt som et reagens for diagnostiske eller prognostiske formål, ikke som et immunogen.

[0539] I dette eksemplet blir meget sensitive humane leukocyttantigene tetrameriske komplekser ("tetramerer") anvendt for en kryss-seksjonsanalyse av for eksempel PSCA-HLA-A*0201-spesifikke CTL-frekvenser fra HLA A*0201-positive individer på forskjellige trinn av sykdom eller etter immunisering omfattende et PSCA-peptid inneholdende et A*0201-motiv. Tetrameriske komplekser blir syntetisert som beskrevet (Musey *et al.*, N. Engl. J. Med. 337:1267, 1997). Kort beskrevet blir rensset HLA-tungkjede (A*0201 i dette

eksemplet) og β 2-mikroglobulin syntetisert ved hjelp av et prokaryot ekspresjonssystem. Tungkjeden blir modifisert ved delesjon av den transmembrancytosoliske halen og COOH-terminal tilsetning av en sekvens inneholdende et BirA-enzymatisk biotinyleringssete. Tungkjeden, β 2-mikroglobulin, og peptid er refoldet ved fortynning. Det 45-kD refoldete produktet blir isolert ved fast protein-væskekromatografi og deretter biotinyleret med BirA i nærværet av biotin (Sigma, St. Louis, Missouri), adenosin 5'-trifosfat og magnesium. Streptavidin-fykoerytrinkonjugat blir tilsatt i et 1:4 molarforhold og det tetrameriske produktet blir konsentrert til 1 mg/ml. Det resulterende produktet er referert til som tetramer-fykoerytrin.

[0540] For analysen av pasientblodprøver blir omtrent én million PBMCer sentrifugert ved 300 g i 5 minutter og resuspendert i 50 μ l av kald fosfatbufret saltløsning. Tre-fargeanalyse ("tri-color") blir utført med tetramer-fykoerytrinet, sammen med anti-CD8-tricolor og anti-CD38. PBMCene blir innkubert med tetramer og antistoffer på is i 30 til 60 min og deretter vasket to ganger før formaldehydfiksering. Porter er anvendt til å inneholde >99,98% av kontrollprøver. Kontroller for tetramere omfatter både A*0201-negative individer og A*0201-positive ikke-sykdomsdonorer. Prosentdelen av celler merket med tetrameren blir deretter bestemt ved flowcytometri. Resultatene indikerer antallet celler i PBMC-prøven som inneholder epitopbegrensete CTLer, som derved lett indikerer omfanget av immunrespons på PSCA-epitopen og således statusen til eksponering for PSCA eller eksponering for en vaksine som fremkaller en beskyttende eller terapeutisk respons.

Eksempel 21

Induksjon av immunresponser ved anvendelse av en primær forsterkerprotokoll

[0541] En primær forsterkerprotokoll lignende i dens underliggende prinsipp av hvilken anvendt for å bekrefte effektiviteten av en DNA-vaksine i transgene mus, slik som beskrevet ovenfor i eksemplet betegnet "Plasmidkonstruksjonen og graden av hvilke det fremkaller immunogenisitet," kan også anvendes for administrering av vaksinen til mennesker. Et slikt vaksineregime kan omfatte en innledende administrering av, for eksempel nakent DNA fulgt av en forsterkning ved anvendelse av rekombinant virus som koder for vaksinen eller rekombinant protein/polypeptid eller et peptidblanding administrert i en adjuvans.

[0542] For eksempel kan den innledende immuniseringen utføres ved anvendelse av en ekspresjonsvektor, slik som den konstruert i eksemplet betegnet "Konstruksjon av "minigen" multi-epitop-DNA-plasmider" i formen av naken nukleinsyre administrert IM (eller SC eller

ID) i mengdene på 0,5-5 mg på multiple steder. Nukleinsyren (0,1 til 1000 µg) kan også administreres ved anvendelse av en genpistol. Etter en innkuberingsperiode på 3-4 uker blir en forsterkningsdose deretter administrert. Forsterkeren kan være rekombinant fowlpoxvirus administrert i en dose på $5 \cdot 10^7$ til $5 \cdot 10^9$ pfu. En alternativ rekombinant virus, slik som en MVA, canarypox, adenovirus eller adenoassosiert virus, kan også anvendes for forsterkeren eller det polyepitopiske proteinet eller en blanding av peptidene kan administreres. For evaluering av vaksineeffektivitet blir pasientblodprøver oppnådd før immunisering så vel som ved intervaller etter administrering av den innledende vaksinen og forsterkningsdoser av vaksinen. Perifert blod mononukleære celler blir isolert fra friskt heparinisert blod ved Ficoll-Hypaque-tetthetsgradientssentrifugering, alikvotert i frysemedia og lagret frosset. Prøver er undersøkt for CTL- og HTL-aktivitet.

[0543] Analyse av resultatene indikerer at en magnitude av respons tilstrekkelig til å oppnå en terapeutisk eller beskyttende immunitet mot PSCA er dannet.

Eksempel 22

Komplementære polynukleotider

[0544] Sekvenser komplementære til de PSCA-kodende sekvensene (figur 1 eller figur 3), eller hvilke som helst deler derav, blir anvendt for å detektere, minke eller hemmer ekspresjon av naturlig forekommende PSCA. Selv om anvendelse av oligonukleotider omfattende fra ca. 15 til 30 basepar er beskrevet, i det vesentlige samme prosedyren blir anvendt med mindre eller med større sekvensfragmenter. Passende oligonukleotider er utformet ved anvendelse av f.eks. OLIGO 4.06-programvare (National Biosciences) og den kodende sekvensen av PSCA. Til å hemme transkripsjon er et komplementært oligonukleotid utformet fra den mest unike 5'-sekvensen og anvendt for å forhindre promoterbinding til den kodende sekvensen. Til å hemme translasjon er et komplementært oligonukleotid utformet for å forhindre ribosomal binding til et PSCA-kodende transkript.

Eksempel 23

Rensning av naturlig forekommende eller rekombinante PSCA ved anvendelse av PSCA-spesifikke antistoffer

[0545] Naturlig forekommende eller rekombinante PSCA er hovedsakelig rensset ved immunoaffinitetskromatografi ved anvendelse av antistoffer spesifikke for PSCA. En immunoaffinitetskolonne er konstruert ved kovalent kobling av anti-PSCA-antistoff til en

aktivert kromatografisk resin, slik som CNBr-aktivert SEPHAROSE (Amersham Pharmacia Biotech). Etter koblingen er resinen blokkert og vasket i henhold til produsentens instruksjoner.

[0546] Media inneholdende PSCA blir ført over immunoaffinitetskolonnen og kolonnen blir vasket ved betingelser som tillater den preferensielle absorpsjonen av PSCA (*f.eks.* høy ionestyrkebuffer i nærværet av detergent). Kolonnen blir eluert ved betingelser som ødelegger antistoff/PSCA-binding (*f.eks.* en buffer på pH 2 til pH 3 eller en høy konsentrasjon på et kaotrop, slik som urinstoff eller tiocyanation) og GCR.P blir oppsamlet.

Eksempel 24

Identifikasjon av molekyler som interagerer med PSCA

[0547] PSCA, eller biologisk aktive fragmenter derav, er merket med 121 I Bolton-Hunter-reagens. (se *f.eks.* Bolton *et al.* (1973) Biochem. J. 133:529.) Kandidatmolekyler tidligere analysert i brønnene av en multibrønns plate blir innkubert med det merkete PSCAet, vasket og hvilke som helst brønner med merket PSCA-kompleks er undersøkt. Data oppnådd ved anvendelse av forskjellige konsentrasjoner av PSCA blir anvendt for å beregne verdier for antallet, affiniteten og assosieringen av PSCA med kandidatmolekylene.

Eksempel 25

In vivo-forsøk for PSCA-tumorvekstfremming

[0548] Effekten av PSCA-proteinet på tumorcellevekst er evaluert *in vivo* ved å bedømme tumorutvikling og vekst av celler som uttrykker eller som mangler PSCA. For eksempel blir SCID-mus injisert subkutan på hver side med 1×10^6 av enten 3T3- eller prostatakreftecellelinjer (*f.eks.* PC3-celler) inneholdende tkNeo-tom-vektor eller PSCA. Minst to strategier kan anvendes: (1) Konstitutiv PSCA-ekspresjon under regulering av en promotor slik som en konstitutiv promotor oppnådd fra genomene av virus slik som polyomavirus, fowlpoxvirus (UK 2.211.504 publisert 5 juli 1989), adenovirus (slik som adenovirus 2), bovin papillomavirus, fugle sarkomvirus, cytomegalovirus, et retrovirus, hepatitt-B-virus og simianvirus 40 (SV40) eller fra heterologe mammalske promotere, *f.eks.* aktinpromotere eller en immunoglobulinpromoter, tilveiebrakte slike promotere er kompatible med vertscellesystemene og (2) Regulert ekspresjon under kontroll av et induserbart vektorsystem, slik som ecdyson, tetracyklin, etc., tilveiebrakte slike promotere er kompatible med vertscellesystemene. Tumorvolum blir deretter overvåket ved skyvelærmåling ved utseendet

av åpenbare tumorer og fulgt over tid for å bestemme om PSCA-uttrykkende celler vokse ved en raskere hastighet og hvorvidt tumorer produsert av PSCA-uttrykkende celler demonstrerer karakteristika av endret aggressivitet (*f.eks.* forbedret metastase, vaskularisering, redusert mottagelighet for kjemoterapeutiske medikamenter).

[0549] I tillegg kan mus bli implantert med 1×10^5 av samme celler ortotopisk for å bestemme om PSCA har en effekt på lokal vekst i prostataen og hvorvidt PSCA påvirker evnen til cellene til å metastasere, spesifikt til lymfeknuter og ben (Miki T et al, *Oncol Res.* 2001;12:209; Fu X et al, *Int J Cancer.* 1991, 49:938). Effekten av PSCA på bentumordannelse og vekst kan bedømmes ved å injisere prostatatumorceller intratibialt ("intratibially").

[0550] Forsøket er også anvendelig for å bestemme den PSCA-hemmende effekten av kandidattherapeutiske sammensetninger, slik som for eksempel PSCA-intrabodier, PSCA-antisensemolekyler og ribozymmer.

Eksempel 26

PSCA monoklonal antistoffmediert hemning av tumorer in vivo

[0551] Den betydelige ekspresjonen av PSCA på celleoverflaten av tumorvev, sammen med dens restriktive ekspresjon i normalt vev gjør PSCA til et godt mål for antistoffterapi. Tilsvarende er PSCA et mål for T-cellebasert immunoterapi. Således er den terapeutiske effektiviteten til anti-PSCA-MAbs i humane prostatakraft-xenograft-musemodeller og humane pankreatisk kreft-xenograft-musemodeller evaluert ved anvendelse av rekombinante cellelinjer slik som PC3-PSCA og 3T3-PSCA (se *f.eks.* Kaighn, M.E., *et al.*, *Invest Urol.* 1979. 17(1): 16-23), så vel som human prostata-xenograftmodeller slik som LAPC 9AD (Saffran et al *PNAS* 1999, 10:1073-1078).

[0552] Antistoffeffektivitet på tumorvekst og metastasedannelse er studert, *f.eks.* i en mus ortotopisk prostata eller pankreatisk kreft-xenograftmodeller. Antistoffene kan være ukonjugerte, som beskrevet i dette eksemplet, eller kan være konjugert til en terapeutisk modalitet som anerkjent på området. Anti-PSCA-MAbs hemmer dannelse av både pankreatiske- og prostata-xenograft. Anti-PSCA-MAbs retarderer også veksten av etablerte ortotopiske tumorer og forlenger overlevelse av tumorbærende mus. Disse resultatene indikerer nytten av anti-PSCA-MAbs ved behandlingen av lokal og langt fremskredet trinn prostatakraft, pankreatisk kreft og de kreftene angitt i tabell I. (se *f.eks.* Saffran, D., *et al.*, *PNAS* 10:1073-1078 eller "world wide web" URL pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698).

[0553] Administrering av anti-PSCA-MAbene førte til retardasjon av etablert ortotopisk tumorvekst og hemning av metastase til spredtliggende steder, hvilket resulterer i en betydelig forlengelse i overlevelsen av tumorbærende mus. Disse undersøkelsene indikerer at PSCA er et attraktivt mål for immunoterapi og demonstrerer det terapeutiske potensialet til anti-PSCA-MAbs for behandling av lokal og metastatisk prostata og pankreatisk kreft. Dette eksemplet demonstrerer at ukonjugert PSCA monoklonale antistoffer er effektive til å hemme veksten av humane prostatatumorxenografts dyrket i SCID-mus; følgelig er en kombinasjon av slike effektive monoklonale antistoffer også effektiv.

Tumorhemning ved anvendelse av multiple PSCA-MAbs

Materialer og fremgangsmåter

PSCA monoklonale antistoffer:

[0554] Monoklonale antistoffer ble reist mot PSCA som beskrevet i eksemplet betegnet "Dannelse av PSCA monoklonale antistoffer (MAbs)." Antistoffene er karakterisert ved ELISA, Western-blott, FACS og immunopresipitering for deres kapasitet til å binde PSCA. Epitopkartleggingsdata for anti-PSCA-MAbene, som bestemt ved ELISA og Western-analyse, gjenkjenner epitoper på PSCA-proteinet. Immunohistokjemisk analyse av prostatakreftevev og celler med disse antistoffene blir utført.

[0555] De monoklonale antistoffene blir renses fra ascites eller hybridomvevskultursupernatanter ved protein-G- eller protein-A-sepharosekromatografi, dialysert mot PBS, filtersterilisert og lagret ved -20°C. Proteinbestemmelser blir utført ved et Bradford-forsøk (Bio-Rad, Hercules, CA). Et terapeutisk monoklonalt antistoff eller en cocktail omfattende en blanding av individuelle monoklonale antistoffer blir fremstilt og anvendt for behandling av mus som mottar subkutane eller ortotopiske injeksjoner av LAPC9 AD- og HPAC-tumor-xenografts.

Cellelinjer og xenografts

[0556] Prostatakreftecellelinjene PC3- og LNCaP-cellelinje så vel som fibroblastlinjen NIH 3T3 (American Type Culture Collection) blir holdt i henholdsvis RPMI og DMEM, supplert med L-glutamin og 10% FBS.

[0557] PC3-PSCA- og 3T3-PSCA-cellepopulasjoner er dannet ved retroviral genoverføring som beskrevet i Hubert, R.S., *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. 96(25): 14523.

[0558] LAPC-9-xenograftet, som uttrykker en villtype androgenreseptor og tilveiebringer prostataspesifikt antigen (PSA), er passert i 6- til 8-uker gamle mannlige ICR-alvorlig

kombinert immundefekte (SCID)-mus (Taconic Farms) ved s.c. trocar-implantat (Craft, N., *et al.*, Nat Med. 1999, 5:280). Enkelcellesuspensjoner av LAPC-9-tumorceller blir fremstilt som beskrevet i Craft, *et al.*

Xenograft-musemodeller.

[0559] Subkutane (s.c.) tumorer er dannet ved injeksjon av 1×10^6 kreftceller blandet ved en 1:1-fortynning med Matrigel (Collaborative Research) i den høyre siden til mannlige SCID-mus. For å teste antistoffeffektivitet på tumordannelse, *dvs.* antistoffinjeksjoner er startet på samme dag som tumorcelleinjeksjoner. Som en kontroll blir mus injisert med enten renset muse-IgG (ICN) eller PBS; eller et renset monoklonalt antistoff som gjenkjenner et irrelevant antigen ikke uttrykt i humane celler. I preliminære undersøkelser er ingen forskjell funnet mellom muse-IgG eller PBS på tumorvekst. Tumorstørrelser blir bestemt ved skyvelærmålinger og tumorvolumet blir beregnet som lengde x bredde x høyde. Mus med subkutane tumorer større enn 1,5 cm i diameter er avlivet.

[0560] Ortotopiske injeksjoner blir utført under anestesi ved anvendelse av ketamin/xylazin. For prostata ortotopiske undersøkelser er et snitt gjort gjennom abdomen for å eksponere prostata og LAPC- eller PC3-tumorceller (2×10^6) blandet med Matrigel blir injisert inn i prostatakapselen i et 10- μ l volum. For å overvåke tumorvekst er mus palpert og blod blir oppsamlet på en ukentlig basis for å måle PSA-nivåer. Musene er skilt ut i grupper for de passende behandlingene, med anti-PSCA eller kontroll MAb som blir injisert i.p.

Anti-PSCA-MAbs hemmer vekst av PSCA-uttrykkende xenograft-krefttumorer

[0561] Effekten av anti-PSCA-MAbs på tumordannelse blir testet ved anvendelse av HPAC- og LAPC9-ortotopiske modeller. Som sammenlignet med s.c. tumormodellen den ortotopiske modellen, som krever injeksjon av tumorceller direkte i henholdsvis musebukspyttkjertelen eller prostataen, resulterer i en lokal tumorvekst, utvikling av metastase på distale steder, forringelse av muse helse og påfølgende død (Saffran, D., *et al.*, PNAS *supra*). Disse trekkene fremstiller den ortotopiske modellen mer representativ for human sykdomsprogresjon og tillot oss å følge den terapeutiske effekten av MAb på kliniske relevante endepunkter.

[0562] Følgelig blir tumorceller injisert inn i muse prostataen og 2 dager senere er musen skilt ut til to grupper og behandlet med enten: a) 250-1000 μ g av anti-PSCA-Ab eller b) kontrollantistoff tre ganger pr. uke i to til fem uker.

[0563] En hovedfordel av de ortotopiske kreftmodellene er evnen til å studere utviklingen av metastaser. Dannelse av metastase hos mus som bærer etablerte ortotopiske tumorer er

undersøkt ved IHC-analyse på lungesnitt ved anvendelse av et antistoff mot et tumorspesifikt celleoverflateprotein slik som anti-CK20 for prostatakraft (Lin *et al.*, Cancer Detect Prev. (2001) 25:202).

[0564] En annen fordel av xenograft-kreftmodeller er evnen til å studere neovaskularisering og angiogenese. Tumorvekst er delvis avhengig av ny blodkarutvikling. Selv om kapillærsystemet og utvikling av blodnettverk er av vertsopprinnelse blir innledningen og arkitekturen av neovaskulaturen regulert av xenograft-tumoren (Davidoff *et al.*, Clin Cancer Res. (2001) 7:2870; Solesvik *et al.*, Eur J Cancer Clin Oncol. (1984) 20:1295). Effekten av antistoff og lite molekyl på neovaskularisering er studert i henhold til prosedyrer kjent på området, slik som ved IHC-analyse av tumorvev og deres omliggende mikroomgivelser.

[0565] Mus som bærer etablerte ortotopiske tumorer blir administrert injeksjoner av enten anti-PSCA-MAb eller kontrollantistoff over en 4-ukes periode. Mus i begge grupper får etablere en høy tumorbyrde for å sikre en høy frekvens av metastasedannelse i muselunger. Mus blir deretter avlivete og deres blærer, leverer, ben og lunger blir analysert for tilstedeværelsen av tumorceller ved IHC-analyse. Disse undersøkelsene demonstrerer en bred antitumoreffektivitet av anti-PSCA-antistoffer på innledning og progresjon av prostatakraft i xenograft-musemodeller. Anti-PSCA-antistoffer hemmer tumordannelse av tumorer så vel som retardering av veksten til allerede etablerte tumorer og forlengelse av overlevelsen av behandlede mus. Videre demonstrerer anti-PSCA-MAbs en dramatisk hemmende effekt på spredningen av lokal prostatatumor til distale steder, selv i nærværet av en stor tumorbyrde. Således er anti-PSCA-MAbs effektiv på hoved kliniske relevante endepunkter (tumorvekst), forlengelse av overlevelse og helse.

Effekt av PSCA-MAbs på veksten av human prostatakraft hos mus

[0566] Ved anvendelse av fremgangsmåten ovenfor ble LAPC-9AI-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) injisert subkutan i mannlige SCID-mus. Musene ble randomisert i grupper (n=10 i hver gruppe) og behandling innledet intraperitonealt (i.p.) på dag 0 med HA1-4.120 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 7 doser inntil undersøkelsesdag 28. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt. Resultatene viser at humant anti-PSCA monoklonalt antistoff Ha1-4.120 signifikant hemmet veksten av humane prostatakraft-xenograft implantert subkutan i SCID-mus ($p < 0,05$) (figur 18).

[0567] I et annet forsøk ble LAPC-9AI-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) injisert subkutant i mannlige SCID-mus. Når tumorvolum nådde 50 mm³ ble musene randomisert i grupper (n=10 i hver gruppe) og behandling innledet intraperitonealt (i.p.) med HA1-5.99.1 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 5 doser inntil undersøkelsesdag 14. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt. Resultatene viser at fullstendig humant anti-PSCA monoklonalt antistoff Ha1-5.99 signifikant hemmet veksten av etablerte androgenuavhengige humane prostatakraft-xenografts implantert subkutant i SCID-mus ($p < 0,05$). (figur 19).

[0568] I et annet forsøk ble LAPC-9AD-tumorceller ($2,5 \times 10^6$ celler) injisert subkutant i mannlige SCID-mus. Når tumorvolumet nådde 40 mm³ ble musene randomisert i grupper (n=10 i hver gruppe) og behandling ble innledet intraperitonealt (i.p.) med økende konsentrasjoner av HA1-4.121 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 7 doser inntil undersøkelsesdag 21. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt. Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerte at HA1-4.121 hemmet veksten av etablerte subkutane humane androgenavhengige prostata-xenografts i SCID-mus. Resultatene ble statistisk signifikante for 300 ug dosegruppen på dager 14, 17 og 21 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-test, tosidig med $\alpha = 0,05$) og for 700 ug dosegruppen på dager 10, 14, 17 og 21 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-test, tosidig med $\alpha = 0,05$) (figur 20).

[0569] I et annet forsøk ble pasientavledete, androgenavhengige LAPC-9AD-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) injisert i de dorsale lappene av prostataene til mannlige SCID-mus. Tumorene fikk vokse i omtrent 10 dager på hvilken tid musene ble randomisert i grupper. Behandling med human 500 mg HA1-4.117, HA1-4.121 eller isotypekontroll-MAb ble innledet 10 dager etter tumorimplantasjon. Antistoffer ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 7 doser. Fire dager etter siste dosen ble dyr avlivet og primærtumorer skåret ut og veid. Resultatene viser at humane anti-PSCA monoklonale antistoffer Ha1-4.121 ($p < 0,01$) og Ha1-4.117 ($p < 0,05$) signifikant hemmet veksten av LAPC-9AD-prostatakraft-xenografts ortotopisk implantert i SCID-mus (figur 21).

[0570] I et annet forsøk ble pasientavledete, androgenavhengige LAPC-9AD-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) injisert i de dorsale lappene av prostataene til mannlige SCID-mus. Tumorene fikk vokse i omtrent 9 dager på hvilken tid musene ble randomisert i grupper. Dyrene randomisert i overlevelsesgruppene omfatter 11 mus i isotype-MAb-kontrollen og 12 mus i den HA1-4.121-behandlede gruppen. Dyr ble behandlet i.p. med 1000 ug Ha1-4.121

eller 1000 ug av isotype-MAb-kontroll to ganger ukentlig med totalt 9 doser. Resultatene demonstrerte at HA1-4.121 signifikant (log-rank test: $p < 0,01$) forlenget overlevelsen av SCID-mus med humane androgenavhengige prostatatumorer. To mus i den HA1-4.121-behandlede gruppen forble frie for åpenbare tumorer på dag 110, siste dag av forsøket (figur 22).

Effekt av PSCA-MAbs i kombinasjon med taxotere i mus

[0571] I et annet forsøk ble LAPC-9AI-tumorceller (2×10^6 celler pr. dyr) injisert subkutan i mannlige SCID-mus. Når tumorvolumet nådde 65 mm^3 ble dyr randomisert og utpekt til fire forskjellige grupper ($n=10$ i hver gruppe) som angitt. I begynnelsen på dag 0 ble Ha1-4.121 eller isotype-MAb-kontroll administrert i.p. to ganger ukentlig i en dose på 500 ug med totalt 6 doser. Den siste dosen ble gitt på dag 17. Taxotere ble gitt intravenøst i en dose på 5 mg/kg på dager 0, 3 og 7. Tumorvekst ble overvåket hver 3-4 dager ved anvendelse av skyvelærmålinger. Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerer at HA1-4.121 som et enkelt middel hemmet veksten av androgenuavhengige prostata-xenograft i SCID-mus med 45% når sammenlignet med kontrollantistoffbehandling alene på dag 28 (ANOVA/Tukey-test: $p < 0,05$). Administrering av isotype-MAb-kontrollen pluss taxotere hemmet tumorvekst med 28% når sammenlignet med kontrollantistoffbehandling alene, som ikke ble statistisk signifikant. Administrering av HA1-4.121 i kombinasjon med taxotere forbedret effekten og resulterte i en 69% hemning av tumorvekst når sammenlignet med kontrollantistoff alene (ANOVA/Tukey-test: $p < 0,01$). En statistisk signifikant forskjell ble også demonstrert når HA1-4.121 pluss taxotere-kombinasjonsgruppen ble sammenlignet med enten HA1-4.121 eller isotype-MAb-kontroll pluss taxoteregrupper (ANOVA/Tukey-test: $p < 0,05$) (figur 23).

Effekt av PSCA-MAbs på veksten av human pankreatisk kreft hos mus

[0572] I et annet forsøk ble humane HPAC-pankreatiske kreftceller (2×10^6 mus) injisert subkutan i immundefekte ICR-SCID-mus (Taconic Farm, Germantown, NY). Musene ble randomisert i grupper ($n=10$ dyr/gruppe) og behandling med det angitte humane PSCA monoklonale antistoffet innledet samme dag. Antistoffer (500 mg/mus) ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 8 doser. Resultatene demonstrerte at humane anti-PSCA monoklonale antistoffer Ha1-4.121, Ha1-4.117 og Ha1-1.16 signifikant hemmet veksten av humane pankreatiske kreft-xenograft subkutan implantert i SCID-mus. Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av en t-test (tosidig, $\alpha=0,05$) (figur 24).

[0573] I et annet forsøk ble HPAC-celler ($3,0 \times 10^6$ celler) implantert ortotopisk inn i pankreasøyen av SCID-mus. Mus ble tilfeldig utpekt til tre grupper ($n=9$ i hver gruppe) som

angitt. Behandling med HA1-4.121 (250 ug eller 1000 ug) eller isotype-MAb-kontroll (1000 ug) ble innledet på implantasjonsdagen. Antistoffer ble administrert i.p. to ganger ukentlig med totalt 10 doser. Tretten dager etter siste dose ble dyr avlivet og primærtumorer skåret ut og veid. Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerte at HA1-4.121 signifikant hemmet den ortotopiske veksten av humane pankreatisk kreft-xenograft i SCID-mus ved begge undersøkte dosenivåer. Behandling med 250 ug og 1000 ug AGS-PSCA hemmet tumorvekst med henholdsvis 66% og 70% (Kruskal-Wallis/Tukey-test: henholdsvis $p < 0,01$ og $p < 0,01$) (figur 25).

[0574] Ved autopsi ble synlige metastaser til lymfeknuter og spredtliggende organer observert hos den kontrollantistoffbehandlede gruppen. Ingen synlige metastaser ble observert i begge HA1-4.121 behandlede grupper. Lymfeknuter, lunger og lever ble fjernet fra alle dyr og undersøkt histologisk for tilstedeværelsen av metastasisk tumor. Snitt fra lungene og lymfeknutene fjernet fra hvert dyr ble merket for human cytokeratin og antallet metastaser bestemt mikroskopisk. Resultatene fra den histologiske analysen demonstrerte en signifikant reduksjon i lymfeknute (LN)-metastaser i dyr behandlet med HA1-4.121 ($p = 0,0152$ detektert ved Fishers eksakte test). Forekomsten av metastase og invasjon ble også redusert signifikant i dyr behandlet med begge konsentrasjoner av HA1-4.121 ($p = 0,0152$ detektert ved Fishers eksakte test). Antallet lungemetastaser minket signifikant hos mus behandlet bare med 1,0 mg dosen av HA1-4.121 ($p = 0,0498$ detektert ved Fishers eksakte test) (figur 26).

Effekt av PSCA-MAbs på veksten av human blærekreft hos mus

[0575] I et annet forsøk ble humane SW780-blærekreftceller (2×10^6 / mus) injisert subkutan i immundefekte ICR-SCID-mus (Taconic Farm, Germantown, NY). Musene ble randomisert i grupper ($n = 10$ dyr/gruppe) og behandling med det angitte humane PSCA-MAb innledet samme dag. Antistoffer (250 mg/mus) ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 7 doser. Resultatene demonstrerte at HA1-4.117 ($p = 0,014$), HA1-4.37 ($p = 0,0056$), HA1-1.78 ($p = 0,001$), Ha1-5.99 ($p = 0,0002$) og HA1-4.5 ($p = 0,0008$) signifikant hemmet veksten av SW780-blæretumorer implanterte subkutan i SCID-mus. Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av en t-test (tosidig, $\alpha = 0,05$) (figur 27).

[0576] Resultatene av disse forsøkene viser at PSCA-MAbs kan anvendes for terapeutiske og diagnostiske formål for å behandle og administrere kreft angitt i tabell I.

Eksempel 27

Terapeutisk og diagnostisk anvendelse av anti-PSCA-antistoffer hos mennesker.

[0577] Anti-PSCA monoklonale antistoffer er trygt og effektivt anvendt for diagnostiske, profylaktiske, prognostiske og/eller terapeutiske formål hos mennesker. Western-blott- og immunohistokjemisk analyse av kreftvev og kreft-xenografts med anti-PSCA-MAb viser sterk omfattende merking i karsinom men signifikant lavere eller udetekterbare nivåer i normalt vev. Deteksjon av PSCA i karsinom og i metastatisk sykdom demonstrerer anvendeligheten av MAbet som en diagnostisk og/eller prognostisk indikator. Anti-PSCA-antistoffer er derfor anvendt i diagnostiske applikasjoner slik som immunohistokjemi av nyrebiopsiprøver for å detektere kreft fra mistenkte pasienter.

[0578] Som bestemt ved flowcytometri binder anti-PSCA-MAb spesifikt til karsinomceller. Således blir anti-PSCA-antistoffer anvendt i diagnostisering av helkroppsavbildningsapplikasjoner, slik som radioimmunoscintigrafi og radioimmunoterapi (se *f.eks.* Potamianos S., et. al. *Anticancer Res* 20(2A):925-948 (2000)) for deteksjonen av lokalisert og metastatisk kreft som viser ekspresjon av PSCA. Felling eller frigjøring av et ekstracellulært domene av PSCA inn i det ekstracellulære miljøet, slik som sett for alkalisk fosfodiesterase B10 (Meerson, N. R., *Hepatology* 27:563-568 (1998)), tillater diagnostisk deteksjon av PSCA ved anti-PSCA-antistoffer i serum- og/eller urinprøver fra mistenkte pasienter.

[0579] Anti-PSCA-antistoffer som spesifikt binder PSCA blir anvendt i terapeutiske applikasjoner for behandlingen av kreft som uttrykker PSCA. Anti-PSCA-antistoffer blir anvendt som en ukonjugert modalitet og som konjugert form hvor antistoffene er bundet til én av forskjellige terapeutiske eller avbildningsmodaliteter velkjente på området, slik som et prodrug, enzymer eller radioisotoper. I prekliniske undersøkelser blir ukonjugerte og konjugerte anti-PSCA-antistoffer testet for effektivitet av tumorforebygging og veksthemning i SCID-mus kreft-xenograftmodellene, *f.eks.* nyrekreftmodeller AGS-K3 og AGS-K6 (se *f.eks.* eksemplet betegnet "PSCA monoklonalt antistoffmediert hemning av tumorer in vivo"). Enten konjugerte og ukonjugerte anti-PSCA-antistoffer blir anvendt som en terapeutisk modalitet i humane kliniske forsøk enten alene eller i kombinasjon med andre behandlinger som beskrevet i følgende eksempler.

Eksempel 28

Humane kliniske forsøk for behandlingen og diagnosen av humane karsinomer gjennom anvendelse av humane anti-PSCA-antistoffer in vivo

[0580] Antistoffer blir anvendt i henhold til foreliggende oppfinnelse som gjenkjenner en epitop på PSCA og blir anvendt ved behandling av visse tumorer slik som de listet opp i tabell I. Basert på flere faktorer er omfattende PSCA-ekspresjonsnivåer, tumorer slik som de listet opp i tabell I for tiden foretrukne indikasjoner. I forbindelse med hver av disse indikasjonene er tre kliniske angrepmåter med hell forfulgt.

[0581] I.) Tilleggsterapi: I tilleggsterapi behandles pasienter med anti-PSCA-antistoffer i kombinasjon med et kjemoterapeutisk eller antineoplastisk middel og/eller strålingsterapi. Primærkreftmål, slik som de listet opp i tabell I, behandles med standardprotokoller ved tilsetningen av anti-PSCA-antistoffer til standard første- og andrelinjeterapi. Protokolldesign adresserer effektivitet som bedømt ved reduksjon i tumormasse så vel som evnen til å redusere vanlige doser av standardkjemoterapi. Disse dosereduksjonene tillater ytterligere og/eller forlenget terapi ved redusering av doserelatert toksisitet av det kjemoterapeutiske midlet. Anti-PSCA-antistoffer er anvendt i mange kliniske tilleggsforsøk i kombinasjon med de kjemoterapeutiske eller antineoplastiske midlene adriamycin (langt fremskredet prostatakarsinom), cisplatin (langt fremskredet hode- og hals- og lungekarsinomer), taxol (brystkreft) og doxorubicin (preklinisk).

[0582] II.) Monoterapi: I forbindelse med anvendelsen av anti-PSCA-antistoffene i monoterapi av tumorer blir antistoffene administrert til pasienter uten et kjemoterapeutisk eller antineoplastisk middel. I én utførelsesform blir monoterapi utført klinisk i sluttrinns kreftpasienter med omfattende metastasisk sykdom. Pasienter viser noe sykdomsstabilisering. Forsøk demonstrerer en effekt i motstandsdyktige pasienter med kanserøse tumorer.

[0583] III.) Avbildningsmiddel: Gjennom binding av et radionuklid (*f.eks.* jod eller yttrium (I^{131} , Y^{90}) til anti-PSCA-antistoffer er de radioaktivt merkete antistoffene anvendt som en diagnostisk og/eller avbildningsmiddel. I en slik rolle lokaliserer de merkede antistoffetene til både faste tumorer så vel som metastasiske lesjoner av celler som uttrykker PSCA. I forbindelse med anvendelsen av anti-PSCA-antistoffene som avbildningsmidler blir antistoffene anvendt som et tilbehør til kirurgisk behandling av faste tumorer, som både en prekirurgisk screen så vel som en postoperativ oppfølger for å bestemme hvilke tumor som forblir og/eller returnerer. I én utførelsesform blir et (^{111}In)-PSCA-antistoff anvendt som et avbildningsmiddel i et Fase I humant klinisk forsøk hos pasienter som har et karsinom som

uttrykker PSCA (analogt se *f.eks.* Divgi *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 83:97-104 (1991)).

Pasienter er fulgt med standard anterior og posterior gammakamera. Resultatene indikerer at primærlesjoner og metastatiske lesjoner er identifisert.

Dose og administreringsvei

[0584] Som anerkjent av fagfolk på området kan doseringsbetraktninger bestemmes gjennom sammenligning med de analoge produktene som er i klinikken. Således kan anti-PSCA-antistoffer administreres med doser i området 5 til 400 mg/m², med de lavere dosene anvendt *f.eks.* i forbindelse med sikkerhetsundersøkelser. Affiniteten til anti-PSCA-antistoffer i forhold til affiniteten til et kjent antistoff for dens mål er én parameter anvendt av fagfolk på området for å bestemme analoge doseregimer. Videre har anti-PSCA-antistoffer, som er fullstendig humane antistoffer, sammenlignet med det kimære antistoffet langsommere utskilling; følgelig kan dosering hos pasienter med slike fullstendige humane anti-PSCA-antistoffer være lavere, kanskje i området 50 til 300 mg/m², og fortsatt forbli effektiv. Dosering i mg/m², i motsetning til den konvensjonelle målingen av dose i mg/kg, er en måling basert på overflateareal og er en hensiktsmessig doseringsmåling som er utformet til å omfatte pasienter av alle størrelser fra spebarn til voksne.

[0585] Tre distinkte leveringsangrepmåter er anvendelige for levering av anti-PSCA-antistoffer. Konvensjonell intravenøs levering er én standardleveringsteknikk for mange tumorer. Imidlertid, i forbindelse med tumorer i det peritoneale hulrommet, slik som tumorer i eggstokkene, gallegang, andre kanaler og lignende, intraperitoneal administrering kan vises fordelaktig for å oppnå høy dose av antistoff ved tumoren og til også å minimalisere antistoffutskilling. På lignende måte har visse faste tumorer vaskulatur som er passende for regional perfusjon. Regional perfusjon tillater en høy dose av antistoff på stedet av en tumor og minimaliserer korttidsutskilling av antistoffet.

Klinisk utviklingsplan (CDP)

[0586] Oversikt: CDPen følger og utvikler behandlinger til anti-PSCA-antistoffer i forbindelse med tilleggsterapi, monoterapi og som et avbildningsmiddel. Forsøk innledningsvis demonstrerer sikkerhet og bekrefter deretter effektivitet av repeterende doser. Forsøk er åpenmerket sammenligning av standardkjemoterapi med standardterapi pluss anti-PSCA-antistoffer. Som vil være anerkjent er ett kriterie som kan anvendes i forbindelse med verving av pasienter PSCA-ekspresjonsnivåer i deres tumorer bestemt ved biopsi.

[0587] Som med hvilket som helst protein- eller antistoffinfusjonsbasert terapeutisk middel, sikkerhetsbetydningene er primært relatert til (i) cytokinfrigjøringssyndrom, *dvs.*

hypotensjon, feber, risting, febergysninger; (ii) utviklingen av en immunogen respons på materialet (*dvs.* utvikling av humane antistoffer av pasienten på det terapeutiske antistoffet eller HAHA-respons); og, (iii) toksisitet til normale celler som uttrykker PSCA. Standardtester og oppfølging er anvendt for å overvåke hver av disse sikkerhetsbetydningene. Anti-PSCA-antistoffer er funnet å være sikre ved human administrering.

Eksempel 29

Humant klinisk forsøk: monoterapi med humant anti-PSCA-antistoff

[0588] Anti-PSCA-antistoffer er sikre i forbindelse med det ovenfor beskrevne tilleggssforsøket, et Fase II humant klinisk forsøk bekrefter effektiviteten og optimal dosering for monoterapi. Slike forsøk blir fullført og medfører den samme sikkerheten og resultatsanalyser til det ovenfor beskrevne tilleggssforsøket med unntaket som er pasienter som ikke mottar kjemoterapi samtidig med mottakelse av doser anti-PSCA-antistoffer.

Eksempel 30

Humant klinisk forsøk: diagnostisk avbildning med anti-PSCA-antistoff

[0589] Én gang til, som tilleggsterapien beskrevet ovenfor er sikker innen sikkerhetskriteriene beskrevet ovenfor, blir et humant klinisk forsøk utført angående anvendelse av anti-PSCA-antistoffer som et diagnostisk avbildningsmiddel. Protokollen er utformet på en hovedsakelig lignende måte til de beskrevet på området, slik som i Divgi *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 83:97-104 (1991). Antistoffene er funnet å være både sikre og effektive når anvendt som en diagnostisk modalitet.

Eksempel 31

Human klinisk forsøks tilleggsterapi med humant anti-PSCA-antistoff og kjemoterapeutisk middel, stråling og/eller hormon ablasjonsterapi

[0590] Et fase I humant klinisk forsøk blir innledet for å bedømme sikkerheten av seks intravenøse doser av et humant anti-PSCA-antistoff i forbindelse med behandlingen av en fast tumor, *f.eks.* en kreft av et vev listet opp i tabell I. I undersøkelsen blir sikkerheten av enkeldoser av anti-PSCA-antistoffer når anvendt som en tilleggsterapi til et antineoplastisk eller kjemoterapeutisk eller hormon ablasjonsmiddel som definert her, slik som, uten begrensning: cisplatin, topotecan, doxorubicin, adriamycin, taxol, Lupron, Zoladex, Eulexin, Casodex, Anandron eller lignende bedømt. Forsøksdesignen omfatter levering av omtrent seks

enkeldoser av et anti-PSCA-antistoff med dose av antistoff med opptrapping fra omtrent ca. 25 mg/m² til ca. 275 mg/m² over behandlingsforløpet i henhold til det følgende eller lignende program:

	Dag 0	Dag 7	Dag 14	Dag 21	Dag 28	Dag 35
MAB-Dose	25 mg/m ²	75 mg/m ²	125 mg/m ²	175 mg/m ²	225 mg/m ²	275 mg/m ²
Kjemoterapi (standarddose)	+	+	+	+	+	+

[0591] Pasienter er nært fulgt i en uke etter hver administrering av antistoff og kjemoterapi. Spesielt blir pasienter bedømt for sikkerhetsbetydningen nevnt ovenfor: (i) cytokinfrigjøringssyndrom, *dvs.* hypotensjon, feber, risting, febergysninger; (ii) utviklingen av en immunogen respons på materialet (*dvs.* utvikling av humane antistoffer av pasienten til det humane terapeutiske antistoffet eller HAHA-respons); og (iii) toksisitet til normale celler som uttrykker PSCA. Standardtester og oppfølging er anvendt for å overvåke hver av disse sikkerhetsbetydningene. Pasienter er også bedømt for klinisk resultat og spesielt reduksjon i tumormasse som bevist ved MRI eller andre avbildning.

[0592] Anti-PSCA-antistoffene er demonstrert til å være sikre og effektive. Fase II-forsøk bekrefter effektiviteten og rafinerer optimal dosering.

Eksempel 32

RNA-interferens (RNAi)

[0593] RNA-interferens (RNAi)-teknologi er implementert til en rekke celleforsøk relevant for onkologi. RNAi er en posttranskripsjonell genforstummingsmekanisme aktivert av dobbeltrådet RNA (dsRNA). RNAi fremkaller spesifikk mRNA-nedbrytning hvilket fører til endringer i proteinekspressjon og deretter i genfunksjon. Hos mammalske celler har disse dsRNAer, betegnet kort interfering RNA (siRNA,) den korrekte sammensetningen for å aktivere RNAi-reaksjonsveien for målretting av nedbrytning, spesifikt noen mRNAer. Se Elbashir S.M., *et al.*, Duplexes of 21-nucleotide RNAs Mediate RNA-interference in Cultured Mammalian Cells, Nature 411(6836):494-8 (2001). Således blir RNAi-teknologi anvendt med hell i mammalske celler til gjøre stumme målrettete gener.

[0594] Tap av celleproliferasjonskontroll er et holdepunkt for kancerøse celler; er således for å fastsette rollen til PSCA i celleoverlevelse/proliferasjonsforsøk relevant. Følgelig ble RNAi anvendt til å undersøke funksjonen av PSCA-antigenet. For å danne siRNA for PSCA

ble algoritmer anvendt for å prediktere oligonukleotider som viser de kritiske molekyllære parameterne (G:C-innhold, smeltetemperatur, etc.) og har evnen til å betydelig redusere ekspresjonsnivåene av PSCA-proteinet når innført i celler. I henhold til dette eksemplet blir PSCA-siRNA-sammensetninger anvendt som omfatter siRNA (dobbeltrådet, kort interfererende RNA) som svarer til nukleinsyre-ORF-sekvensen av PSCA-proteinet eller subsekvenser derav. Således blir siRNA-subsekvenser anvendt på denne måten generelt 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 eller flere enn 35 påfølgende RNA-nukleotider i lengde. Disse siRNA-sekvensene er komplementære og ikke-komplementære til minst en del av den mRNA-kodende sekvensen. I en foretrukket utførelsesform er subsekvensene 19-25 nukleotider i lengde, mest foretrukket 21-23 nukleotider i lengde. I foretrukne utførelsesformer oppnår dette siRNAet kraftig nedsetting av PSCA-antigen i celler som uttrykker proteinet og har funksjonelle effekter som beskrevet nedenfor.

[0595] Det valgte siRNAet (PSCA.b oligo) ble testet i en rekke cellelinjer i overlevelses/proliferasjons MTS-forsøket (måler cellulær metabolsk aktivitet). Tetrazoliumbasert kolorimetrisk forsøk (*dvs.* MTS) detekterer utelukkende levedyktige celler, siden levende celler er metabolsk aktive og derfor kan redusere tetrazoliumsalter til fargete formazanforbindelser; døde celler gjør imidlertid ikke. Videre oppnådde dette PSCA.b oligo kraftig nedsetting av PSCA-antigen i celler som uttrykker proteinet og hadde funksjonelle effekter som beskrevet nedenfor ved anvendelse av de følgende protokollene.

[0596] Mammalske siRNA-transfeksjoner: Dagen før siRNA-transfeksjon ble de forskjellige cellelinjer platet i media (RPMI 1640 med 10% FBS m/u antibiotika) ved 2×10^3 celler/brønn i 80 μ l (96-brønners plateformat) for overlevelsen/MTS-forsøket. I parallell med det PSCA-spesifikke siRNA-oligo ble de følgende sekvensene omfattet i hvert forsøk som kontroller: a) Falskt transfekterte celler med Lipofectamin 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) og hybridiseringsbuffer (ingen siRNA); b) Luciferase-4-spesifikk siRNA (målrettet sekvens: 5'-AAGGGACGAAGACGAACACUUCTT-3') (SEKV ID NR:77); og c) Eg5-spesifikk siRNA (målrettet sekvens: 5'-AACTGAAGACCTGAAGACAATAA-3') (SEKV ID NR:78). SiRNAer ble anvendt ved 10nM og 1 μ g/ml Lipofectamin 2000 endelig konsentrasjon.

[0597] Fremgangsmåten var som følger: siRNAene ble først fortynnet i OPTIMEM (serumfritt transfeksjonsmedia, Invitrogen) ved 0,1 μ M (10-gangers konsentrert) og innkubert 5-10 min ved RT. Lipofectamin 2000 ble fortynnet til 10 μ g/ml (10-gangers konsentrert) for det totale antallet transfeksjoner og innkubert 5-10 minutter ved

romtemperatur (RT). Passende mengder av fortynnet 10-gangers konsentrert Lipofectamin 2000 ble blandet 1:1 med fortynnet 10-gangers konsentrert siRNA og innkubert ved RT i 20-30" (5-gangers konsentrert transfeksjonsløsning). 20 µl av de 5-gangers konsentrerte transfeksjonsløsningene ble satt til de respektive prøvene og innkubert ved 37°C i 96 timer før analyse.

[0598] MTS-forsøk: MTS-forsøket er en kolorimetrisk fremgangsmåte for å bestemme antallet levedyktig celler i proliferasjons-, cytotoxisitets- eller kjemosensitivitetsforsøk basert på en tetrazoliumforbindelse [3-(4,5-dimetyltiazol-2-yl)-5-(3-karboksymetoksyfenyl)-2-(4-sulfofenyl)-2H-tetrazolium, inner salt; MTS(b)] og en elektronkoblingsreagens (fenazinetosulfat; PES). Forsøk ble utførte ved tilsetning av en liten mengde av løsningsreagenset direkte til kulturbrønner, innkubering i 1-4 timer og deretter måling av absorbans ved 490nm med en 96-brønners plateleser. Mengden av farget formazanprodukt som målt ved mengden av 490nm absorbans er direkte proporsjonal med den mitokondrielle aktiviteten og/eller antallet levende celler i kultur.

[0599] For å adressere funksjonen av PSCA i celler er PSCA gjort stummme ved transfektering av de endogent uttrykkende PSCA cellelinjene.

[0600] En annen utførelsesform ifølge oppfinnelsen er en fremgangsmåte for å analysere PSCA-relatert celleproliferasjon er målingen av DNA-syntese som en markør for proliferasjon. Merket DNA-forløpere (dvs. 3H-thymidin) blir anvendt og deres innkorporasjon i DNA blir kvantifisert. Innkorporasjon av den merket forløperen i DNA er direkte proporsjonal med mengden av celledeling som forekommer i kulturen. En annen fremgangsmåte anvendt for å måle celleproliferasjon er utøvende klonogeniske forsøk. I disse forsøkene er et definert antall celler platet på den passende matriksen og antallet kolonier dannet etter en periode av vekst etter siRNA-behandling er talt.

[0601] I PSCA-kreftmålvalidering er komplementerende til celleoverlevelsen/proliferasjonsanalysen med apoptose og cellecyklusprofilundersøkelser betraktet. Det biokjemiske holdepunktet for den apoptotiske prosessen er genomisk DNA-fragmentering, en irreversibel hendelse som overgir cellen til å dø. En fremgangsmåte for å observere fragmentert DNA i celler er den immunologiske deteksjonen av histonkomplekserte DNA-fragmenter ved et immunoassay (dvs. celledøddeteksjons ELISA) som måler anrikningen av histonkomplekserte DNA-fragmenter (mono- og oligonukleosomer) i cytoplasmaet av apoptotiske celler. Dette forsøket krever ikke premerking av cellene og kan

detektere DNA-nedbrytning i celler som ikke prolifererer *in vitro* (dvs. friske isolerte tumorceller).

[0602] De viktigste effektormolekylene for å trigge apoptotisk celledød er kaspaser. Kaspaser er proteaser som når aktivert spalter en rekke substrater på det karboksyterminale setet av en aspartatresidue, medierer meget tidlige trinn av apoptose ved aktivering. Alle kaspaser blir syntetisert som proenzymmer og aktivering involverer spaltning på aspartatresiduer. Spesielt synes kaspase-3 å spille en sentral rolle i innledningen av cellulære apoptosehendelser. Forsøk for bestemmelse av kaspase-3-aktivering detekterer tidlige apoptosehendelser. Etter RNAi-behandlinger bærer Western-blott-deteksjon av aktiv kaspase-3-tilstedeværelse eller proteolytisk spaltning av produkter (dvs. PARP) funnet i apoptotisk celler videre en aktiv induksjon av apoptose. Fordi de cellulære mekanismene som resulterer i apoptose er komplekse har hver sine fordeler og begrensninger. Betrakning av andre kriterier/endepunkter slik som cellulær morfologi, kromatinkondensering, membran blæredannelse ("blebbing"), apoptotiske legemer hjelp til å videre støtte celledød som apoptotisk. Siden ikke alle genmålene som regulerer cellevekst er antiapoptotiske blir DNA-innholdet av permeabiliserte celler målt for å oppnå profilen av DNA-innhold eller cellecyklusprofil. Kjerner av apoptotisk celler inneholder mindre DNA på grunn av lekkasjen ut til cytoplasmaet (sub-G1-populasjon). I tillegg kan anvendelsen av DNA-fargestoffer (dvs. propidiumjodid) også differensiere mellom de forskjellige fasene av cellecyklusen i cellepopulasjonen på grunn av tilstedeværelsen av forskjellig mengder av DNA i G0/G1, S og G2/M. I disse undersøkelsene kvantifiseres subpopulasjonene.

[0603] For PSCA-genet letter RNAi-undersøkelser forståelsen av bidraget til genproduktet i kreftreaksjonsveier. Slike aktive RNAi-molekyler har anvendelse i identifikasjonsforsøk for å screene for MAbs som er aktive antitumorterapeutiske midler. Videre blir siRNA administrert som terapeutiske midler til kreftpasienter for reduksjon av den ondartete veksten av mange krefttyper, omfattende de listet opp i tabell 1. Når PSCA spiller en rolle i celleoverlevelse, celleproliferasjon, tumorigenese eller apoptose blir det anvendt som et mål for diagnostiske, prognostiske, preventive og/eller terapeutiske formål.

Eksempel 33

Deteksjon av PSCA-protein i kreftpasientprøver ved IHC

[0604] Ekspresjon av PSCA-protein i tumorprøver fra kreftpasienter ble detektert ved anvendelse av antistoffet HA1-4.117. Formalinfiksert, parafininnstøpt vev ble kuttet i 4

mikron snitt og anbrakt på glasobjektglass. Snittene ble avvokset, rehydrert og behandlet med antigengjenervervelsesløsning (Antigen Retrieval Citra Solution; BioGenex, 4600 Norris Canyon Road, San Ramon, CA, 94583) ved høy temperatur. Snitt ble deretter innkubert i fluoresceinkonjugert humant monoklonalt anti-PSCA-antistoff, Ha1-4.117, i 16 timer ved 4°C. Objektglassene ble vasket tre ganger i buffer og videre innkubert med kanin-antifluorescein i 1 time og, etter vasking i buffer, nedsenket i DAKO EnVision+™-peroksydasekonjugert geit-antikanin immunoglobulin sekundært antistoff (DAKO Corporation, Carpinteria, CA) i 30 minutter. Snittene ble deretter vasket i buffer, utviklet ved anvendelse av DAB-kittet (Sigma Chemicals), kontrastfarget ved anvendelse av hematoksylin og analysert ved brightfield-mikroskopi. Resultatene viser ekspresjon av PSCA i tumorcellene av prostata adenokarsinom (A, B), blære overgangskarsinom (C) og pankreatisk duktal adenokarsinom (D). Disse resultatene indikerer at PSCA er uttrykt i humane kreft og at antistoffer rettet mot dette antigenet er anvendelige som diagnostiske reagenser (figur 17).

[0605] Disse resultatene indikerer at PSCA er et mål for diagnostiske, prognostiske og terapeutiske applikasjoner i kreft.

Tabeller

Tabell I: Vev som uttrykker PSCA når ondartete.

Prostata
 Bukspyttkjertel
 Blære
 Nyre
 Kolon
 Lunge
 Eggstokk
 Bryst

TABELL II: Aminosyreforkortelser

ENKELBOKSTAVS	TREBOKSTAVS	FULLT NAVN
F	Phe	fenylalanin
L	Leu	leucin
S	Ser	serin
Y	Tyr	tyrosin
C	Cys	cystein
W	Trp	tryptofan
P	Pro	prolin
H	His	histidin
Q	Gln	glutamin
R	Arg	arginin
I	Ile	isoleucin
M	Met	metionin
T	Thr	treonin
N	Asn	asparagin
K	Lys	lysin
V	Val	valin
A	Ala	alanin
D	Asp	asparaginsyre
E	Glu	glutaminsyre
G	Gly	glycin

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

TABELL IV:**HLA-klasse I/II-motiver/supermotiver****TABELL IV (A): HLA-klasse I-supermotiver/motiver**

SUPERMOTIV	POSISJON	POSISJON	POSISJON
	2 (primært anker)	3 (primært anker)	C-terminus (primært anker)
A1	TILVMS		FWY
A2	LIVMATQ		IVMATL
A3	VSMATLI		RK
A24	YFWIVLMT		FIYWLM
B7	P		VILFMWYA
B27	RHK		FYLWMIVA
B44	ED		FWYLIMVA
B58	ATS		FWYLI/VMA
B62	QL/VMP		FWYMI/VLA
MOTIVER			
A1	TSM		Y
A1		DEAS	Y
A2.1	LMVQIAT		VLIMAT
A3	LMVISATFCGD		KYRHFA
A11	VTMLISAGNCDF		KRYH
A24	YFWM		FLIW
A*3101	MVTALIS		RK
A*3301	MVALF/ST		RK
A*6801	AVTMSLI		RK
B*0702	P		LMFWYA/V
B*3501	P		LMFWY/VA
B51	P		LIVFWYAM
B*5301	P		IMFWYALV
B*5401	P		ATIVLMFWY

Halvfete residuer er foretrukket, kursive residuer er mindre foretrukket: Et peptid er betraktet som motivbærende hvis det har primære ankere på hver primære ankerposisjon for et motiv eller supermotiv som spesifisert i tabellen ovenfor.

TABELL IV (B): HLA-klasse II-supermotiv

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

TABELL IV (C): HLA-klasse II-motiver

MOTIVER		1° anker 1	2	3	4	5	1° anker 6	7	8	9
DR4	foretrukket skadelig	FMYL/VW	M	T	W	I	VSTCPALIM	MH R		MH WDE
DR1	foretrukket skadelig	MFL/VWY	C	CH	PAMQ FD	CWD	VMATSPLIC	M GDE	D	AVM
DR7	foretrukket skadelig	MFL/VWY	M	W	A G		IVMSACTPL	M GRD	N	IV G
<u>DR3</u>	<u>MOTIVER</u>	1° anker 1	2	3	1° anker 4	5	1° anker 6			
Motiv a foretrukket		LIVMFY			D					
Motiv b foretrukket		LIVMFAY			DNQEST		KRH			
DR-supermotiv		MFL/VWY					VMSTACPLI			

Kursive residuer indikerer mindre foretrukne eller "tolererte" residuer

TABELL IV (D): HLA-klasse I-supermotiver

	POSISJON:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-terminus
<u>SUPER-MOTIVER</u>										
A1			1° Anker TILVMS							1° Anker FWY
A2			1° Anker LIVMATQ							1° Anker LIVMAT
A3	Foretrukket skadelig	 DE (3/5); P (5/5)	1° Anker VSMATLI	YFW (4/5) DE (4/5)			YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	1° Anker RK
A24			1° Anker YFWIVLMT							1° Anker FIYWLM
B7	Foretrukket skadelig	FWY (5/5) LIVM (3/5) DE (3/5); P(5/5); G(4/5); A(3/5); QN(3/5)	1° Anker P	FWY (4/5)		DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	FWY (3/5) DE (4/5)	1° Anker VILFMWYA
B27			1° Anker RHK							1° Anker FYLWMIVA
B44			1° Anker ED							1° Anker FWYLIMVA
B58			1° Anker ATS							1° Anker FWYLI/VMA
B62			1° Anker QLIVMP							1° Anker FWYMI/VLA

Kursive residuer indikerer mindre foretrukne eller "tolererte" residuer

TABELL IV (E): HLA-klasse I-motiver

	POSISJON 1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-terminus
									eller C-terminus	
A1 9-mer	foretrukket	GFYW	<u>1° Anker</u> STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	<u>1° Anker</u> Y
	skadelig	DE		RHKLIVMP	A	G	A			
A1 9-mer	foretrukket	GRHK	ASTCLIVM	<u>1° Anker</u> DEAS	GSTC		ASTC	LIVM	DE	<u>1° Anker</u> Y
	skadelig	A	RHKDEPYFW		DE	PQN	RHK	PG	GP	
A1 10-mer	foretrukket	YFW	<u>1° Anker</u> STM	DEAQN	A	YFWQN		PASTC	GDE	P
	skadelig	GP		RHKGILVM	DE	RHK	QNA	RHKYFW	RHK	A
A1 10-mer	foretrukket	YFW	STCLIVM	<u>1° Anker</u> DEAS	A	YFW		PG	G	YFW
	skadelig	RHK	RHKDEPYFW			P	G		PRHK	QN
A2.1 9-mer	foretrukket	YFW	<u>1° Anker</u> LM/VQAT	YFW	STC	YFW		A	P	<u>1° Anker</u> VLIMAT
	skadelig	DEP		DERKH			RKH	DERKH		
A2.1 10-mer	foretrukket	AYFW	<u>1° Anker</u> LM/VQAT	LVIM	G		G		FYWL VIM	<u>1° Anker</u> VLIMAT
	skadelig	DEP		DE	RKHA	P		RKH	DERK H	RKH
A3	foretrukket	RHK	<u>1° Anker</u> LMVISATFCGD	YFW	PRHKYF W	A	YFW		P	<u>1° Anker</u> KYRHFA
	skadelig	DEP		DE						
A11	foretrukket	A	<u>1° Anker</u> VTLMISAGNCD F	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P	<u>1° Anker</u> KRYH
	skadelig	DEP					A	G		
A24 9-mer	foretrukket	YFWRHK	<u>1° Anker</u> YFWM		STC			YFW	YFW	<u>1° Anker</u> FLIW
	skadelig	DEG		DE	G	QNP	DERH K	G	AQN	
A24 10-mer	foretrukket		<u>1° Anker</u> YFWM		P	YFWP		P		<u>1° Anker</u> FLIW
	skadelig			GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA
A3101	foretrukket	RHK	<u>1° Anker</u> MVTALIS	YFW	P		YFW	YFW	AP	<u>1° Anker</u> RK
	skadelig	DEP		DE		ADE	DE	DE	DE	
A3301	foretrukket		<u>1° Anker</u> MVALFIST	YFW				AYFW		<u>1° Anker</u> RK
	skadelig	GP		DE						
A6801	foretrukket	YFWSTC	<u>1° Anker</u> AVTMSLI			YFWLIV M		YFW	P	<u>1° Anker</u> RK
	skadelig	GP		DEG		RHK			A	
B0702	foretrukket	RHKFWY	<u>1° Anker</u> P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	<u>1° Anker</u> LMFWYA/ V
	skadelig	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE	

184

POSISJON 1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-terminus
								eller C-terminus	
B3501foretrukket	FWYLIVM	<u>1°Anker</u> P	FWY			FWY		<u>1°Anker</u> LMFWY/V A	
skadelig	AGP			G	G				
B51 foretrukket	LIVMFWY	<u>1°Anker</u> P	FWY	STC	FWY	G	FWY	<u>1°Anker</u> LIVFWYA M	
skadelig	AGPDER HKSTC			DE	G	DEQN	GDE		
B5301foretrukket	LIVMFWY	<u>1°Anker</u> P	FWY	STC	FWY	LIVMFW Y	FWY	<u>1°Anker</u> IMFWYAL V	
skadelig	AGPQN				G	RHKQN	DE		
B5401foretrukket	FWY	<u>1°Anker</u> P	FWYLIVM		LIVM	ALIVM	FWYA P	<u>1°Anker</u> ATIVLMF WY	
skadelig	GPQNDE		GDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE	

TABELL IV (F):

Oppsummering av HLA-supertyper

Totalt fenotypiske frekvenser av HLA-supertyper i forskjellige etniske populasjoner

Supertype	Spesifisitet		Fenotypisk frekvens					
	Posisjon 2	C-Terminus	Kaukasisk	N.A.-sort	Japansk	Kinesisk	Hispanisk	Gjennomsnitt
B7	P	AILMVFWY	43,2	55,1	57,1	43,0	49,3	49,5
A3	AILMVST	RK	37,5	42,1	45,8	52,7	43,1	44,2
A2	AILMVT	AILMVT	45,8	39,0	42,4	45,9	43,0	42,2
A24	YF (WIVLMT)	FI (YWLM)	23,9	38,9	58,6	40,1	38,3	40,0
B44	E (D)	FWYLIMVA	43,0	21,2	42,9	39,1	39,0	37,0
A1	TI (LVMS)	FWY	47,1	16,1	21,8	14,7	26,3	25,2
B27	RHK	FYL (WMI)	28,4	26,1	13,3	13,9	35,3	23,4
B62	QL (IVMP)	FWY (MIV)	12,6	4,8	36,5	25,4	11,1	18,1
B58	ATS	FWY (LIV)	10,0	25,1	1,6	9,0	5,9	10,3

TABELL IV (G):

Beregnet populasjonsdekning tilveiebrakt ved forskjellige HLA-supertypekombinasjoner

HLA-supertyper		Fenotypisk frekvens					
		Kaukasisk	N.A.-sorte	Japansk	Kinesisk	Hispanisk	Gjennomsnitt
		83,0	86,1	87,5	88,4	86,3	86,2
A2, A3 og B7		99,5	98,1	100,0	99,5	99,4	99,3
A2, A3, B7, A24, B44 og A1		99,9	99,6	100,0	99,8	99,9	99,8
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62 og B58							

Motiver indikerer de residuedefinerte supertypespesifisitetene. Motivene inkorporerer residuer bestemt på basisen av publiserte data for å bli gjenkjent av multiple alleler i supertypen. Residuer med i parantes er tilleggsresiduer også forutsatt å bli tolerert av multiple alleler i supertypen.

Tabell V: Frekvent forekommende motiver			
Navn	gj.sn. % identitet	Beskrivelse	Potensiell funksjon
zf-C2H2	34%	Sinkfinger, C2H2 type	Nukleinsyrebindende protein fungerer som transkripsjonsfaktor, kjernelokalisasjon sannsynlig
cytokrom_b_N	68%	Cytokrom b(N-terminal)/b6/petB	membranbundet oksydase, generere superoksyd
Ig	19%	Immunoglobulindomene	domener er ett hundre aminosyrer langt og inneholder en konservert intradomenedisulfidbinding
WD40	18%	WD-domene, G-beta-repeterende element	tandemrepetisjoner på omtrent 40 residuer, hver inneholdende et Trp-Asp-motiv. Fungerer i signaloverføring og proteininteraksjon
PDZ	23%	PDZ-domene	kan fungere i målrettede signalmolekyler til submembranseter
LRR	28%	Leucinrikt repeterende element	korte sekvensmotiver involvert i protein-proteininteraksjoner

Pkinase	23%	Proteinkinasedomene	konserverte katalytiske kjerner vanlig i både serin/threonin- og tyrosinproteinkinaser inneholdende et ATP-bindingssete og et katalytisk sete
PH	16%	PH-domene	plekstrinhomologi involvert i intracellulær signallering eller som konstituent av cytoskjelettet
EGF	34%	EGF-lignende domene	30-40 aminosyre lang funnet i det ekstracellulære domenet av membranbundne proteiner eller i utskilte proteiner
Rvt	49%	Revers transkriptase (RNA-avhengig DNA-polymerase)	
Ank	25%	Ank-repeterende element	Cytoplasmatiske protein, assosierte integrerte membranproteiner til cytoskjelettet
Oksydored_q1	32%	NADH-Ubikinon/plastokinon (kompleks I), forskjellige kjeder	membranassosiert. Involvert i protontranslokasjon tvers over membranen
Efhand	24%	EF-hand	kalsium-bindingsdomene, består av en 12 residues sløyfe flankert på begge sider ved en 12 residues alfa-helikale domene
Rvp	79%	Retroviral aspartylprotease	Aspartyl- eller -syreproteaser, sentrert på en katalytisk aspartylresidue
Kollagen	42%	Kollagen trippelheliksrepetierende element (20 kopier)	ekstracellulære strukturelle proteiner involvert i dannelsen av bindevev. Sekvensen består av G-X-Y- og polypeptidkjedene som danner en trippelheliks.
Fn3	20%	Fibronektin type III-domene	Lokalisert i den ekstracellulære ligandbindingsregionen til reseptorer og er omtrent 200 aminosyreresiduer lang med to par av cysteiner involvert i disulfidbindinger
7tm_1	19%	7-transmembranreseptor (rhodopsinfamilie)	sju hydrofobiske transmembranregioner, med N-terminusen lokalisert ekstracellulært mens C-terminusen er cytoplasmisk. Signal via G-proteiner

Tabell VI: Eksongrenser for transkript PSCA-v.1

Eksonantall	Start	Slutt	Lengde
1	10	69	60
2	70	177	108
3	178	985	808

Tabell VII: MFI-verdier til hvert av datapunkter anvendt til affinitetsberegning.

MFI-verdier

nM	PSOA	PSOA	PDP3 T=8 +4	PDP3 T=8 +4
40	869,3	777,06	795,24	661,66
20	875,19	835,94	816,34	824,07
10	856,28	847,83	777,85	842,72
5	866,94	817,45	758,15	818,83
2,5	835,47	769,79	742,45	783,5
1,25	813,12	782,84	806,2	792,44
0,625	766,52	689,3	683,64	666,28
0,3125	588,3	541,25	549,03	499,22
0,15625	389,95	354,24	366,82	355,83
0,07813	234,85	230,37	225,82	211,77
0,03906	138,05	132,14	134,25	134,07
0,01953	84,35	78,49	77,62	80,14
0,00977	48,13	48,38	50,93	46,87
0,00488	33,49	30,58	30,71	30,04
0,00244	21,77	20,33	18,14	20,44
0,00122	14,45	13,59	13,82	13,11
0,00061	11,07	10,14	9,52	10,35
0,00031	8,61	8,3	8,57	9,09
0,00015	7,45	7,17	7,28	7,85
0,00008	6,91	6,73	7,32	7,86
0,00004	6,94	6,41	6,81	6,51

Tabell VIII: Affinitetsberegnet ved anvendelse av Graphpad Prisme-programvare: sigmoidal doserespons (variabel stignings)-ligning.

Kd-verdier

	PSOA	PSOA	PDP3 T=8 +4	PDP3 T=8 +4
Ligning 1				
Best-fit-verdier				
BMAKS	896,6	843,9	816,4	820,3
KD	0,1784	0,1849	0,1678	0,1839
Std. feil				
BMAKS	10,83	10,92	12,63	20,12
KD	0,01152	0,01275	0,01397	0,02405
95% Konfidensintervaller				
BMAKS	873,9 til 919,3	821,0 til 866,7	790,0 til 842,9	778,2 til 862,4
KD	0,1543 til 0,2025	0,1583 til 0,2116	0,1386 til 0,1971	0,1336 til 0,2343

Tabell IX: FACS-basert affinitet på fullstendige humane PSCA-MAbs

FACS-Based Affinity

Sample ID	Kd (nM)
Ha1-4.37	0.23
Ha1-4.121	0.26
Ha1-5.99.1	0.28
Ha1-4.117	0.32
Ha1-4.120	0.41
Ha1-4.5	1.00
Ha1-1.16.1	6.91

Tabell X: Antistoffer som kryssreagerer med ape-PSCA og/eller muse-PSCA.

Hybridom ID	Kryssreagerer med ape-PSCA	Kryssreagerer med muse-PSCA
H1-1.10	-	-
Ha1-1.16	+	-
Ha1-1.78	+	-
Ha1-1.41	+	-
Ha1-4.5	+	-
Ha1-4.37	+	-
Ha1-4.117	+	+
Ha1-4.120	+	-
Ha1-4.121	+	-
Ha1-5.99	+	-

Tabell XI: PSCA: Epitopgruppering ved FACS-analyse.

	Epitopgrupper							
	1			2	3	5		
MFI	4,37	4,120	4,5	5,99	4,121	1,41	1,16	1G8
4,37	5,73	6,45	7,35	7,28	11,63	28,88	28,86	23,92
4,120	5,31	6,24	6,73	7,32	7,3	23,81	20,91	15,41
4,5	5,36	5,75	5,86	6,82	7,47	16,46	22,91	13,45
5,99	23,77	22,33	30,82	7,38	45,45	60,06	63,63	29,5
4,121	5,4	5,63	10,51	15,13	6,16	34,83	37,64	26,38
1,41	10,21	6,37	6,03	9,45	9,54	6,75	9,8	5,77
1,16	7,51	8	8,01	6,7	22,88	14,34	10,7	6,89
1G8	11,65	12,45	13,77	8,21	28,89	16,43	14,26	6,48

Legende:

	egenkonkurranse (100%), bkgr-kontroll for hvert biotinylerte antistoff
ingen farge	100% konkurranse
	sterk konkurranse
	ingen til svak konkurranse

Ssss

SEKVENSLISTE

<110> Agensys, Inc.
 Gudas, Jean
 Jakobovits, Aya
 Xiao-Chi, Jia
 Morrison, Robert Kendall
 Morrison, Karen Jane Meyrick
 Shao, Hui
 Challita-Eid, Pia M.
 Raitano, Arthur B.

<120> ANTIBODIES AND RELATED MOLECULES THAT BIND TO PSCA PROTEINS

<130> 51158-20088.41

<140> Not yet assigned
 <141> Filed herewith

<150> 60/616,381
 <151> 2004-10-05

<150> 60/617,881
 <151> 2004-10-12

<150> 60/621,310
 <151> 2004-10-21

<150> 60/633,077
 <151> 2004-12-02

<150> 10/857,484
 <151> 2004-05-28

<150> 60/475,064
 <151> 2003-05-30

<160> 78

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 990
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<221> misc_feature
 <222> 543
 <223> n = a, t, c, or g

<400> 1
 agggagagggc agtgacc atg aag gct gtg ctg ctt gcc ctg ttg atg gca 50
 Met Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala
 1 5 10

ggc ttg gcc ctg cag cca ggc act gcc ctg ctg tgc tac tcc tgc aaa 98

191

Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys
 15 20 25
 gcc cag gtg agc aac gag gac tgc ctg cag gtg gag aac tgc acc cag 146
 Ala Gln Val Ser Asn Glu Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln
 30 35 40
 ctg ggg gag cag tgc tgg acc gcg cgc atc cgc gca gtt ggc ctc ctg 194
 Leu Gly Glu Gln Cys Trp Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu
 45 50 55
 acc gtc atc agc aaa ggc tgc agc ttg aac tgc gtg gat gac tca cag 242
 Thr Val Ile Ser Lys Gly Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln
 60 65 70 75
 gac tac tac gtg ggc aag aag aac atc acg tgc tgt gac acc gac ttg 290
 Asp Tyr Tyr Val Gly Lys Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu
 80 85 90
 tgc aac gcc agc ggg gcc cat gcc ctg cag ccg gct gcc gcc atc ctt 338
 Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu
 95 100 105
 gcg ctg ctc cct gca ctc ggc ctg ctg ctc tgg gga ccc ggc cag cta 386
 Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu
 110 115 120
 tag gctctggggg gccccgctgc agcccacact ggggtgtggtg cccaggcct 439
 *

ttgtgccact cctcacagaa cctggcccag tgggagcctg tcctggttcc tgaggcacat 499
 cctaacgcaa gtttgaccat gtatgtttgc accccttttc ccnaaccct gaccttccca 559
 tgggcctttt ccaggattcc caccggcag atcagtttta gtgacacaga tccgcctgca 619
 gatggcccct ccaacccttt ctgttgctgt ttccatggcc cagcattttc cacccttaac 679
 cctgtgttca ggcacttctt cccccaggaa gccttccctg cccaccccat ttatgaattg 739
 agccagggtt ggtccgtggt gtcccccgca ccagcaggg gacaggcaat caggagggcc 799
 cagtaaaggc tgagatgaag tggactgagt agaactggag gacaagagtt gacgtgagtt 859
 cctgggagtt tccagagatg gggcctggag gcctggagga aggggccagg cctcacattt 919
 gtggggctcc cgaatggcag cctgagcaca gcgtaggccc ttaataaaca cctgttggat 979
 aagccaaaaa a 990

<210> 2

<211> 123

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

<400> 3																
tttgaggcca tataaagtca cctgaggccc tctccaccac agcccaccag tgacc atg																58
Met																
1																
aag gct gtg ctg ctt gcc ctg ttg atg gca ggc ttg gcc ctg cag cca	106															
Lys Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro																
5					10					15						
ggc act gcc ctg ctg tgc tac tcc tgc aaa gcc cag gtg agc aac gag	154															
Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser Cys Lys Ala Gln Val Ser Asn Glu																
20					25					30						
gac tgc ctg cag gtg gag aac tgc acc cag ctg ggg gag cag tgc tgg	202															
Asp Cys Leu Gln Val Glu Asn Cys Thr Gln Leu Gly Glu Gln Cys Trp																
35					40					45						
acc gcg cgc atc cgc gca gtt ggc ctc ctg acc gtc atc agc aaa ggc	250															
Thr Ala Arg Ile Arg Ala Val Gly Leu Leu Thr Val Ile Ser Lys Gly																
50					55					60					65	
tgc agc ttg aac tgc gtg gat gac tca cag gac tac tac gtg ggc aag	298															
Cys Ser Leu Asn Cys Val Asp Asp Ser Gln Asp Tyr Tyr Val Gly Lys																
70					75					80						
aag aac atc acg tgc tgt gac acc gac ttg tgc aac gcc agc ggg gcc	346															
Lys Asn Ile Thr Cys Cys Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala																
85					90					95						
cat gcc ctg cag ccg gct gcc gcc atc ctt gcg ctg ctc cct gca ctc	394															
His Ala Leu Gln Pro Ala Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu																
100					105					110						
ggc ctg ctg ctc tgg gga ccc ggc cag cta tag gctctggggg gccccgctgc	447															
Gly Leu Leu Leu Trp Gly Pro Gly Gln Leu *																
115					120											
agcccacact ggggtgtggtg ccccaggcct ctgtgccact cctcacacac ccggcccagt	507															
gggagccctgt cctgggttcct gaggcacatc ctaacgcaag tctgaccatg tatgtctgcg	567															
ccctgtgcc ccaccctgac cctcccatgg ccctctccag gactcccacc cggcagatcg	627															
gctctattga cacagatccg cctgcagatg gccccctcaa ccctctctgc tgcgtgttcc	687															
atggcccagc attctccacc cttaaccctg tgctcaggca cctcttcccc caggaagcct	747															
tccctgcccc ccccatctat gacttgagcc aggtctggtc cgtggtgtcc cccgcaccca	807															
gcaggggaca ggcactcagc agggcccggt aaaggctcag atgaagtgga ctgagtagaa	867															
ctggaggaca ggaagtcgacg tgaagtctcg gaagtctcca gagatggggc ctggaggcct	927															
ggaggaaggg gccaggcctc acattcgtgg ggctccctga atggcagcct cagcacagcg	987															
taggccctta ataaacacct gttggataaq cca	1020															

193

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

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

<210> 5
 <211> 888
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<400> 5
 tttagaggcca tataaagtca cctgaggcccc tctccaccac agcccaccag tgaccatgaa 60
 ggctgtgctg cttgccctgt tgatggcagg cttggccctg cagccaggca ctgccctgct 120
 gtgctactcc tgcaaagccc aggcgcagtt ggcctcctga ccgtcatcag caaaggctgc 180
 agcttgaact gcgtggatga ctcacaggac tactacgtgg gcaagaagaa catcacgtgc 240
 tgtgacaccg acttgtgcac tcggcctgct gctctgggga cccggccagc tataggctct 300
 ggggggcccc gctgcagccc aactgggtg tggtgccccca ggcctctgtg ccactcctca 360
 cacacccggc ccagtgggag cctgtcctgg ttcctgaggc acatcctaac gcaagtctga 420
 cc atg tat gtc tgc gcc cct gtc ccc cac cct gac cct ccc atg gcc 467
 Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala
 1 5 10 15
 ctc tcc agg act ccc acc cgg cag atc ggc tct att gac aca gat ccg 515
 Leu Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro
 20 25 30
 cct gca gat ggc ccc tcc aac cct ctc tgc tgc tgt ttc cat ggc cca 563
 Pro Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro
 35 40 45
 gca ttc tcc acc ctt aac cct gtg ctc agg cac ctc ttc ccc cag gaa 611
 Ala Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu
 50 55 60
 gcc ttc cct gcc cac ccc atc tat gac ttg agc cag gtc tgg tcc gtg 659
 Ala Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val
 65 70 75

194

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

aggctgagat gaagtggact gagtagaact ggaggacagg agtcgacgtg agttcctggg 767
 agtctccaga gatggggcct ggaggcctgg aggaagggggc caggcctcac attcgtgggg 827
 ctccctgaat ggcagcctca gcacagcgta ggcccttaat aaacacctgt tggataagcc 887
 a 888

<210> 6

<211> 94

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

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

<210> 7

<211> 1174

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (424)...(993)

<400> 7

gacagtgaac cctgcgctga aggcgttggg gtcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
 cccagggttt cgtgccgatc agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
 agggcagtg cgccttccgg tcaccaggac cagtgcctcag cccgcctgct tgaccccctt 180
 acttagctgg ggtccaatcc ataccgaatt tagatgattc agacgatggg atttgaaact 240
 tttagaactgg gtgcgactta agcactgccc tgctgtgcta ctctgcaaa gccagggtga 300
 gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcacccagct gggggagcag tgctggaccg 360
 cgcgcacccg cgcagttggc ctccctgaccg tcatcagcaa aggctgcagc ttgaactgcg 420
 tgg atg act cac agg act act acg tgg gca aga aga aca tca cgt gct 468
 Met Thr His Arg Thr Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg Ala
 1 5 10 15

gtg aca ccg act tgt gca acg cca gcg ggg ccc atg ccc tgc agc cgg 516
 Val Thr Pro Thr Cys Ala Thr Pro Ala Gly Pro Met Pro Cys Ser Arg
 20 25 30

ctg ccg cca tcc ttg cgc tgc tcc ctg cac tcg gcc tgc tgc tct ggg 564
 Leu Pro Pro Ser Leu Arg Cys Ser Leu His Ser Ala Cys Cys Ser Gly
 35 40 45

gac ccg gcc agc tat agg ctc tgg ggg gcc ccg ctg cag ccc aca ctg 612
 Asp Pro Ala Ser Tyr Arg Leu Trp Gly Ala Pro Leu Gln Pro Thr Leu

195

50	55	60	
ggt gtg gtg ccc cag gcc tct gtg cca ctc ctc aca cac ccg gcc cag			660
Gly Val Val Pro Gln Ala Ser Val Pro Leu Leu Thr His Pro Ala Gln			
65	70	75	
tgg gag cct gtc ctg gtt cct gag gca cat cct aac gca agt ctg acc			708
Trp Glu Pro Val Leu Val Pro Glu Ala His Pro Asn Ala Ser Leu Thr			
80	85	90	95
atg tat gtc tgc gcc cct gtc ccc cac cct gac cct ccc atg gcc ctc			756
Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala Leu			
100	105	110	
tcc agg act ccc acc cgg cag atc ggc tct att gac aca gat ccg cct			804
Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro Pro			
115	120	125	
gca gat ggc ccc tcc aac cct ctc tgc tgc tgt ttc cat ggc cca gca			852
Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala			
130	135	140	
ttc tcc acc ctt aac cct gtg ctc agg cac ctc ttc ccc cag gaa gcc			900
Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala			
145	150	155	
ttc cct gcc cac ccc atc tat gac ttg agc cag gtc tgg tcc gtg gtg			948
Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val			
160	165	170	175
tcc ccc gca ccc agc agg gga cag gca ctc agg agg gcc cgg taa			993
Ser Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg *			
180	185		
aggctgagat gaagtggact gagtagaact ggaggacagg agtcgacgtg agttcctggg 1053			
agtctccaga gatggggcct ggaggcctgg aggaaggggc caggcctcac attcgtgggg 1113			
ctccctgaat ggcagcctca gcacagcgta ggcccttaat aaacacctgt tggataagcc 1173			
a 1174			

<210> 8

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

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

196

Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro Ala Phe
 130 135 140
 Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu Ala Phe
 145 150 155 160
 Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val Val Ser
 165 170 175
 Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg
 180 185

<210> 9
 <211> 1660
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<400> 9
 gacagtgaac cctgcgctga aggcgttggg gctcctgcag ttctggggca gccacaggcg 60
 cccagggttt cgtgccgata agcccaggac ggtcttcccg gtgcagtttc tgatgcgggg 120
 agggcagtg tgccttccgg tcaccaggac cagtgtctcag cccgcctgct tgacccctt 180
 acttagctgg ggtccaatcc atacccaatt tagatgattc agacgatggg atttgaaact 240
 ttggaactgg gtgcgactta agcactgccc tgctgtgcta ctcctgcaaa gcccagggtga 300
 gcaacgagga ctgcctgcag gtggagaact gcacccagct gggggagcag tgctggaccg 360
 cgcgcattcc tgagtggggg gacgacagcc gccaggccta ggtctctgcc actgaactat 420
 taatctttct ggccatctgt ccgcatctgt gtgctgtttt ccttccacct gtccccgacc 480
 cgtcccgcac ctgcaccccc aacaatcacc cagcatctgt ccctccagcc atcctcctcc 540
 atctgccact cctccactca tctgtccctc cccatcctcc atcttccact cctccacca 600
 tctgtccctc cccatccctg agctcactta ctactcacc ccatttctga cgctcagcgg 660
 gtggtccatc tgctcggac atctggatag ggctgagacc agggccgaga ccaggccctc 720
 gcaactgctt caatcctgag gccagcccag ggggactcta gagcattagg cagggtggga 780
 caggaggagg cctggggcag gtcaggcagg tgagcacaca gggcagcccc atccccggat 840
 cccgctgctc cccaggcgca gttggcctcc tgaccgtcat cagcaaaggc tgcagcttga 900
 actgcgtgg atg act cac agg act act acg tgg gca aga aga aca tca cgt 951
 Met Thr His Arg Thr Thr Trp Ala Arg Arg Thr Ser Arg
 1 5 10

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

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

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

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

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

 acc atg tat gtc tgc gcc cct gtc ccc cac cct gac cct ccc atg gcc 1239
 Thr Met Tyr Val Cys Ala Pro Val Pro His Pro Asp Pro Pro Met Ala

197

95	100	105	110	
ctc tcc agg act ccc acc cgg cag atc ggc tct att gac aca gat ccg				1287
Leu Ser Arg Thr Pro Thr Arg Gln Ile Gly Ser Ile Asp Thr Asp Pro				
	115	120	125	
cct gca gat ggc ccc tcc aac cct ctc tgc tgc tgt ttc cat ggc cca				1335
Pro Ala Asp Gly Pro Ser Asn Pro Leu Cys Cys Cys Phe His Gly Pro				
	130	135	140	
gca ttc tcc acc ctt aac cct gtg ctc agg cac ctc ttc ccc cag gaa				1383
Ala Phe Ser Thr Leu Asn Pro Val Leu Arg His Leu Phe Pro Gln Glu				
	145	150	155	
gcc ttc cct gcc cac ccc atc tat gac ttg agc cag gtc tgg tcc gtg				1431
Ala Phe Pro Ala His Pro Ile Tyr Asp Leu Ser Gln Val Trp Ser Val				
	160	165	170	
gtg tcc ccc gca ccc agc agg gga cag gca ctc agg agg gcc cgg taa				1479
Val Ser Pro Ala Pro Ser Arg Gly Gln Ala Leu Arg Arg Ala Arg *				
	175	180	185	
aggctgagat gaagtggact gagtagaact ggaggacagg agtcgacgtg agttcctggg				1539
agtctccaga gatggggcct ggaggcctgg aggaaggggc caggcctcac attcgtgggg				1599
ctccctgaat ggcagcctca gcacagcgta ggcccttaat aaacacctgt tggataagcc				1659
a				1660

<210> 10

<211> 189

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

<210> 11

```
<211> 1020
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<220>
<221> CDS
<222> (83) ... (427)

[illegible]

```
<210> 12
<211> 114
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 12
Met Ala Gly Leu Ala Leu Gln Pro Gly Thr Ala Leu Leu Cys Tyr Ser
1 5 10 15

199

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

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

<400> 13
 Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr
 20 25 30
 Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ile Trp Ile
 35 40 45
 Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr
 50 55 60
 Asn Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Met
 65 70 75 80
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val
 85 90 95
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ile Thr
 100 105 110
 Met Ile Arg Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 115 120 125
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Lys Gly
 130 135 140
 Pro Ser Val Phe
 145

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

<400> 14
 Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg
 1 5 10 15
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Arg Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 20 25 30
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Thr
 35 40 45
 Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 65 70 75 80
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Tyr Ser Phe Pro Arg Thr Phe

200

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

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

<400> 15

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

<210> 16
 <211> 139
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 16

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

201

130

135

<210> 17
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17
 Gln Val His Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Ser Tyr Lys Pro Ser Leu Lys
 50 55 60
 Ser Arg Val Thr Val Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
 65 70 75 80
 Lys Leu Ser Tyr Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Asp Arg Gly Asp Tyr Gly Asp Phe Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
 115 120 125
 Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135

<210> 18
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile
 1 5 10 15
 Gly Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 20 25 30
 Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Glu
 35 40 45
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 50 55 60
 Gly Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Phe Tyr Cys Gln Gln Cys Gly
 65 70 75 80
 Ser Ser Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 85 90 95
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 100 105 110
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 115 120 125
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
 130 135 140

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

<400> 19

202

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

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

<400> 20
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Phe Leu Ile Ser Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Cys Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Asp Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 21
 <211> 239
 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

```

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

```

<210> 22

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

```

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

```

204

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

<400> 23
 Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu Arg
 1 5 10 15
 Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Ile Leu Tyr Arg Ser Ser
 20 25 30
 Lys Lys Asn His Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Thr Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr
 85 90 95
 Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly

<210> 24
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa = Any amino acid

<400> 24
 Gly Pro Gly Xaa Xaa Lys Pro Ser Gln Xaa Leu Ser Leu Thr Gly Thr
 1 5 10 15
 Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile
 20 25 30
 Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr
 35 40 45
 Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile
 50 55 60
 Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ala Val
 65 70 75 80
 Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Ile Thr
 85 90 95
 Met Val Arg Gly Val Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 115 120 125
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Tyr
 130 135

205

<210> 25
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

<210> 26
 <211> 144
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg His
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Leu Ile Ala Val Arg Pro Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

<210> 27
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27
 Glu Met Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

206

```

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50          55          60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65          70          75          80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
          85          90          95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100         105         110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115         120         125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130         135         140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
145          150          155

```

```

<210> 28
<211> 141
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 28
Cys Pro Gly Ala Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser
 1          5          10          15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser
          20          25          30
Gly Gly Thr Tyr Tyr Trp Ile Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly
          35          40          45
Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Tyr Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn
          50          55          60
Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn
65          70          75          80
Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val
          85          90          95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ile Thr Met Val Arg Gly Ile Ser Gly
          100         105         110
Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala
          115         120         125
Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Lys Gly Pro Ser Val Phe
          130         135         140

```

```

<210> 29
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 29
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 1          5          10          15
Ile Ser Ser His Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          20          25          30
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
          35          40          45
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser
          50          55          60
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Tyr
65          70          75          80
Ser Ile Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Thr Arg
          85          90          95
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

```

207

```

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

```

```

<210> 30
<211> 139
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 30
Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
 1          5          10          15
Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala
          20          25          30
Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
          35          40          45
Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala Val Ser
          50          55          60
Val Lys Ser Arg Met Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65          70          75          80
Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
          85          90          95
Cys Ala Arg Glu Arg Leu Gly Glu Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
          100          105          110
Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
          115          120          125
Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
          130          135

```

```

<210> 31
<211> 128
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 31
Leu Gln Val Gln Pro Glu Cys Leu Tyr Thr Val Ser Asp Lys Asn Asn
 1          5          10          15
Phe Leu Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
          20          25          30
Met Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
          35          40          45
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
          50          55          60
Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Pro
65          70          75          80
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
          85          90          95
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
          100          105          110
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
          115          120          125

```

```

<210> 32
<211> 141

```

208

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

```

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

```

<210> 33

<211> 162

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 33

```

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

```

<210> 34

<211> 445

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

```

gtggcagcac ccagatgggt cctgtcccag gtgcagctgc aggagtcggg cccaggactg 60

```

209

```

gtgaagcctt cacagaccct gtccctcacc tgcactgtct ctggtggctc catcagcagt 120
ggtgggttact actggatctg gatccgccag caccagggga agggcctgga gtggattggg 180
tacatctatt acaatgggaa cacctactac aaccgcgtccc tcaagagtcg agttaccatg 240
tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc ctgaagctga gctctgtgac tgccgcggac 300
acggccgtgt attactgtgc gagagatggg attactatga tacgcggcta ctactacggg 360
atggacgtct ggggccaaag gaccacgggc accgtctcct cagcctccac caagggccca 420
tcggtcaagg gcccatcggg cttca 445

```

<210> 35

<211> 148

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

```

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

```

<210> 36

<211> 466

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> misc_feature

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

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

<400> 36

```

cagctgacnc agtctccatc ttccgtgtct gcatctgtag gagacagagt caccatcact 60
tgtcggggcga gtcgggggat tagcagctgg ttagcctggg atcagcagaa accagggaaa 120
gcccctaagc tcctgatcta tactgcatcc agtttgcaaa gtggagtccc atcaagggtc 180
agcggcagtg gttctgggac agatttcact ctcaccatca gcagcctgca gcctgaagat 240
tttgcaactt actattgtca acaggccttac agtttccctc ggacgttcgg ccaagggacc 300
aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca ccatctgtct tcattctccc gccatctgat 360
gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga 420
gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggta 466

```

<210> 37

<211> 155

<212> PRT

<213> Homo sapiens

210

<400> 37

```

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

```

<210> 38

<211> 409

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 38

```

cagtgtgtgg cagcaccag atgggtcctg tcccagggtgc agctgcagga gtcgggcca 60
ggactggtga agccttcaca gaccctgtcc ctcacctgca ctgtctctgg tggctccatc 120
agcagtgggtg gttactactg gagctggatc cgccagcacc cagggaaggg cctggagtgg 180
attgggtaca tatattacag tgggagcacc tactacaacc cgccctcaa gagtcgagtt 240
accatatcag tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgactgcc 300
gcgacacgg ccgtgtatta ctgtgcgaga gatcgaatta ctatggttcg gggaggtatt 360
cccagtggta tggacgtctg gggccaaggg accacggtca ccgtctcct 409

```

<210> 39

<211> 136

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

```

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

```

211

130

135

<210> 40
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 40
 tcaccattca cttgccgggc aagtcagagc attaccaact atttaaattg gtatcagcag 60
 aaaccagggg aagcccctaa gtcctgata catgttgcat ccagtttgca aagtggggtc 120
 ccatcaagggt tcagtggcag tggatctggg agagatttca ctctcaccat cagcagtctg 180
 caacctgaag attttgcaac ttactactgt caacagagtc acagtatccc tcggacgttc 240
 ggccaaggga ccaagggtga aatcaaacga actgtggctg caccatctgt cttcatcttc 300
 ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac 360
 ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg aagggtggata acgccctcca atcgggt 417

<210> 41
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41
 Ser Pro Phe Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Thr Asn Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Glu Ala Pro Lys Leu Leu Ile His Val
 20 25 30
 Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 35 40 45
 Ser Gly Arg Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 50 55 60
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser His Ser Ile Pro Arg Thr Phe
 65 70 75 80
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser
 85 90 95
 Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
 100 105 110
 Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
 115 120 125
 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 130 135

<210> 42
 <211> 416
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 42
 caggtgcatac tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtccttcagt ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccggggaagg gactggagtg gattggggaa atcaatcata gtggaagcac cagctacaag 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccgtatca gtggacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct atgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgagag agataggggt 300
 gactacggtg acttcctctt tgactactgg ggccaggga cctgtgtcac cgtctcctca 360
 gcctccacca agggcccata ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag caccta 416

<210> 43
 <211> 138
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

212

<400> 43

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

<210> 44

<211> 425

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 44

tctccagggg aaagagccac cctctcctgc agggccagtc agagtattgg cagcacctac 60
 ttagcctggg accagcagaa acctggccag gctcccaggc tcctcatcta tgggtgcatcc 120
 agcagggcca ctggcatccc agaaaggttc agtggcagtg ggtctggggac agacttcact 180
 ctcaccatca gcggactgga gcctgaagat tttgcagtggt tttactgtca acagtgtggt 240
 agctcacctc cgacgttcgg ccaagggacc aaggtggaaa tcaaacgaac tgtggctgca 300
 ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt 360
 gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag tacagtggaa ggtggataac 420
 gccct 425

<210> 45

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

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

213

<210> 46
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 46
 ggtctgcagt gtgtggcagc acccagatgg gtcctgtccc aggtgcagct acagcagtgg 60
 ggcgaggac tgttgaagcc ttcggagacc ctgtccctca cctgcgctgt ctatgggtggg 120
 tccttcagtg gtaactactg gagctggatc cgccagcccc cagggaaagg gctggagtgg 180
 attggggaaa tcaatcatag tggaagcacc aactacaacc cgtccctcaa gagtcgagtc 240
 accatatcag tagacacgtc caagaaccag ttctccctga agctgagctc tgtgaccgcc 300
 gcggacacgg ctgtgtatta ctgtgcgaga ggggggagct acaactactt tgactactgg 360
 ggccagggaa ccctgggtcac cgtctcctca gcctccacca agggcccatc ggtcaag 417

<210> 47
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 47
 Gly Leu Gln Cys Val Ala Ala Pro Arg Trp Val Leu Ser Gln Val Gln
 1 5 10 15
 Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Asn Tyr Trp Ser
 35 40 45
 Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu Ile
 50 55 60
 Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val
 65 70 75 80
 Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser
 85 90 95
 Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Gly
 100 105 110
 Ser Tyr Asn Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 115 120 125
 Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Lys
 130 135

<210> 48
 <211> 933
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 48
 aaaaaagtca gtcccaacca ggacacagca tggacatgag ggtccctgct cagctcctgg 60
 ggctcctgct gctctggctc tcaggtgccat gatgtgacat ccagatgact cagtctccat 120
 cctccctgtc tgcactgtga ggagacagag tcaccatcac ttgccaggcg agtcaggaca 180
 ttagcaacta tttgaattgg tatcagcaga gtcccgggaa agcccctaag ttcctgatct 240
 ccgatgcac caatttaaaa acaggggtcc catcaagggt cagtggaaat ggatctggga 300
 cagatTTTTT tttcaccatc agcagcctac agcctgaaga tattgcgacc tattgctgtc 360
 aacagtatga tagtctccca ttcactttcg gccctgggac caaagtggat atcaaacgaa 420
 ctgtggctgc accatctgtc ttcactttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa 480
 ctgcctctgt tgtgtgcctg ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg 540
 aggtggataa cgccctccaa tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca 600
 aggacagcac ctacagcctc agcagcacc tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac 660
 acaaagtcta cgctgcgaa gtcacccatc agggcctgag ctcgcccgtc acaaagagct 720
 tcaacagggg agagtgttag agggagaagt gccccacct gctcctcagt tccagcctga 780

214

ccccctccca tcctttggcc tctgaccctt tttccacagg ggacctaccc ctattgcggt 840
 cctccagctc atctttcacc tcacccccct cctcctcctt ggctttaatt atgctaattgt 900
 tggaggagaa tgaataaata aagtgaatct ttg 933

<210> 49
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49
 Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
 1 5 10 15
 Leu Ser Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
 20 25 30
 Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser
 35 40 45
 Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ser Pro Gly Lys
 50 55 60
 Ala Pro Lys Phe Leu Ile Ser Asp Ala Ser Asn Leu Lys Thr Gly Val
 65 70 75 80
 Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Phe Thr
 85 90 95
 Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Cys Cys Gln Gln
 100 105 110
 Tyr Asp Ser Leu Pro Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile
 115 120 125
 Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 130 135 140
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
 145 150 155 160
 Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu
 165 170 175
 Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp
 180 185 190
 Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr
 195 200 205
 Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser
 210 215 220
 Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 225 230 235

<210> 50
 <211> 968
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 50
 aaagatcagg actcctcagt tcaccttctc acaatgaggc tccctgctca gctcctgggg 60
 ctgctaattgc tctgggtctc tggatccagt ggggatattg tgatgactca gtctccactc 120
 tccttgcccg tcacccctgg agagccggcc tccatctcct gcaggctctag tcagagcctc 180
 ctacatagta atggatacaa ctatttggtt tggtagctgc agaagccagg acagtctcca 240
 cagctcctga tctatttggg ttctattcgg gcctccgggg tccctgacag gttcagtggc 300
 agtggatcag gcacagattt tacactgaaa atcagcagag tggaggctga ggatgttggg 360
 gtttattact gcatgcaacc tctacaaact ccatcacct tccgccaagg gacacgactg 420
 gagattaaac gaactgtggc tgcaccatct gtcttcatct tcccgccatc tgatgagcag 480
 ttgaaatctg gaactgcctc tgttgtgtgc ctgctgaata acttctatcc cagagaggcc 540
 aaagtacagt ggaagggtgga taacgcctc caatcgggta actcccagga gagtgtcaca 600
 gagcaggaca gcaaggacag cacctacagc ctcagcagca ccctgacgct gagcaaagca 660
 gactacgaga aacacaaagt ctacgcctgc gaagtcaccc atcagggcct gagctcgccc 720
 gtcacaaaga gcttcaacag gggagagtgt tagagggaga agtgcccca cctgtcctc 780

215

```

agttccagcc tgacccccctc ccatacctttg gcctctgacc ctttttccac aggggaccta 840
cccctattgc ggtcctccag ctcatctttc acctcacccc cctcctcctc cttggcttta 900
attatgctaa tgttggagga gaatgaataa ataaagtgaa tctttgcaaa aaaaaaaaaa 960
aaaaaaaaa                                     968

```

```

<210> 51
<211> 239
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 51
Met Arg Leu Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Met Leu Trp Val Ser
 1           5           10          15
Gly Ser Ser Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro
 20          25          30
Val Thr Pro Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser
 35          40          45
Leu Leu His Ser Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Val Trp Tyr Leu Gln Lys
 50          55          60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Ile Arg Ala
 65          70          75          80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 85          90          95
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100         105         110
Cys Met Gln Pro Leu Gln Thr Pro Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg
115         120         125
Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130         135         140
Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145         150         155         160
Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165         170         175
Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180         185         190
Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195         200         205
Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210         215         220
Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225         230         235

```

```

<210> 52
<211> 425
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 52
caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcca tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga cttggatcagg 120
cagtcctccat cgagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtgggat 180
aatggttatg cagtatctgt gaaaagtcga atgaccatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagagaggt taggggaggt atacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
accta                                           425

```

```

<210> 53
<211> 141
<212> PRT

```

216

<213> Homo sapiens

<400> 53

```

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

```

<210> 54

<211> 484

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 54

```

cagctgacgc agtctccaga ctccctggct gtgtctctgg gcgagagggc caccatcaac 60
tgcaagtcca gccagaatat ttatacagg tccagcaaga agaaccactt agtttggtac 120
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctact gggcatctac ccgggaatcc 180
ggggtccctg cccgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcactct caccatcagc 240
accctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc aatattatag tactcctccc 300
accttcggcc aagggacacg actggagatt aaacgaactg tggctgcacc atctgtcttc 360
atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg 420
aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc cctccaatcg 480
ggta

```

<210> 55

<211> 161

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

```

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

```

217

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly

<210> 56
 <211> 409
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

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

<400> 56
 ggcccaggac nggngaagcc ttcacagacc tgtccctcac cggcactgtc tctgggtggcc 60
 catcagcagt ggtggttatt actggagctg gatccgccag caccagggga agggcctgga 120
 gtggattggg aacatctatt acagtgggag cacctactac aaccggtccc tcaagagtcg 180
 agttaccata tcagtagaca cgtctaagaa ccagttctcc ctgaagctga gcgctgtgac 240
 tgccgcggac acggccgtgt attactgtgc gagagataat attactatgg ttcggggagt 300
 ctactacggt atggacgtct ggggccaagg gaccacggtc accgtctcct cagcctccac 360
 caagggccca tcggtcttcc ccttggcacc ctctccaag agcacctat 409

<210> 57
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (0)...(0)
 <223> Xaa = Any amino acid

<400> 57
 Ala Gln Asp Xaa Xaa Ser Leu His Arg Pro Val Pro His Arg His Cys
 1 5 10 15
 Leu Trp Trp Pro Ile Ser Ser Gly Gly Tyr Tyr Trp Ser Trp Ile Arg
 20 25 30
 Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Tyr Tyr Ser
 35 40 45
 Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser
 50 55 60
 Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ala Val Thr
 65 70 75 80
 Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Asn Ile Thr Met
 85 90 95
 Val Arg Gly Val Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
 115 120 125
 Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Tyr
 130 135

<210> 58
 <211> 321
 <212> DNA

218

<213> Homo sapiens

<400> 58

```
tatgcagcat ccagtttgca aagtgggggc ccatcaaggt tcagcggcag tggatctgga 60
acagacttca ctctcaccat cagcagcctg cagcctgaag attttgcaac ttactattgt 120
caacaggctc acagtctccc tcggacgttc ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacga 180
actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 240
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gaaaggccaa agtacagtgg 300
aaggtggata acaccctcca a 321
```

<210> 59

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

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

<210> 60

<211> 433

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 60

```
caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cgtccggatt caccttcagt cgccatggcg tgcaactgggt ccgccaggct 120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaagtaa taaatactat 180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cagcgtgtat 240
ctgcaaataa acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagaggaggc 300
cttatagcag ttcgtccggg gtactactac tacggtatgg acgtctgggg ccaagggacc 360
acggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc 420
tccaagagca cct 433
```

<210> 61

<211> 144

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

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

219

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Leu Ile Ala Val Arg Pro Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly
 100 105 110
 Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
 115 120 125
 Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135 140

<210> 62
 <211> 471
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 62
 gaaatgcagc tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

 aggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgctcac tttcggcgga 300
 gggaccaagg tggagatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca 360
 tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat 420
 cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg t 471

<210> 63
 <211> 157
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 63
 Glu Met Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly
 145 150 155

<210> 64
 <211> 424
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

220

<400> 64

```

tgtccaggtg cactgcagga gtcggggccca ggactgggtga ggccttcaca gaccctgtcc 60
ctcacctgca ctgtctctgg tggctccatc agcagtgggtg gtacttacta ctggatctgg 120
atccgccagc acccagggaa gggcctggag tggattgggt acatctatta cagtgggagc 180
acctactaca acccgctccct caagagtcga gttaccatat cagtagacac gtctaagaac 240
cagttctccc tgaagctgag ctctgtgact gccgcggaca cggccgtgta ttactgtgcg 300
agagatggaa ttactatggg tcggggaatt agcgggggca tggacgtctg gggccaaggg 360
accacggtca ccgtctcctc agcctccacc aaggggcccat cgggtcaaggg cccatcggtc 420
ttca 424

```

<210> 65

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 65

```

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

```

<210> 66

<211> 436

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 66

```

gcatctgtag gagacagagt caccatcact tgccgggcaa gtcagagcat tagtagtcat 60
ttaaattggg atcagcagaa accagggaaa gccctaagc tcctgatcta tgctgcttcc 120
agtttgcaaa gtgggggtccc atcaagggtc agtggcagtg gatctgggac agatttcact 180
ctctccatca gcagtctgca acctgaagat ttgcaactt acttctgtca acagagttac 240
agtatccctc ggacgttcgg ccaagggacc aagggtggaaa tcacacgaac tgttgctgca 300
ccatctgtct tcatcttccc gccatctgat gagcagttga aatctggaac tgcctctgtt 360
gtgtgcctgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaaag tacagtggaa ggtggataac 420
gccctccaat cgggta 436

```

<210> 67

<211> 145

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 67

```

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 1          5          10          15
Ile Ser Ser His Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
          20          25          30

```

221

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

<210> 68
 <211> 417
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<400> 68
 cagctgcagc agtcagggtcc aggactgggtg aagccctcgc agaccctctc actcacctgt 60
 gccatctccg gggacagtgt ctctagcaac agtgctgctt ggaactggat caggcagtcc 120
 ccatacgagag gccttgagtg gctgggaagg acatactaca ggtccaagtg gtataatgaa 180
 tatgcagtat ctgtgaaaag tcgaatgacc atcaaccag acacatccaa gaaccagttc 240
 tccctgcagc tgaactctgt gactcccag gacacggctg tgtattactg tgcaagagag 300
 aggttagggg agttatacgg tatggacgtc tggggccaag ggaccatggt caccgtctcc 360
 tcagcctcca ccaagggccc atcgggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacc 417

<210> 69
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69
 Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala
 20 25 30
 Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Arg Thr Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Glu Tyr Ala Val Ser
 50 55 60
 Val Lys Ser Arg Met Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Ala Arg Glu Arg Leu Gly Glu Leu Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser
 115 120 125
 Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
 130 135

<210> 70
 <211> 384
 <212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 70

```

ctgcaagtcc agccagagtg tctttatataca gtgtccgaca agaacaactt cttatgttgg 60
taccagcaga aaccaggaca gcctcctaaa ctgctcatgt actggggcatc tatccgggaa 120
tccgggggtcc ctgaccgatt cagtggcagc ggggtctggga cagatttcac tctcaccatc 180
agcagcctgc aggctgaaga tgtggcagtt tattactgtc agcaatatta tagtactcct 240
cccaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacgaa ctgtgggctgc accatctgtc 300
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 360
ctgaataact tctatcccag agag                                     384

```

<210> 71

<211> 128

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 71

```

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

```

<210> 72

<211> 425

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 72

```

caggtacagc tgcagcagtc aggtccagga ctgggtgaagc cctcgcagac cctctcactc 60
acctgtgcc a tctccgggga cagtgtctct agcaacagtg ctgcttgga ctggatcagg 120
cagtcccat ggagaggcct tgagtggctg ggaaggacat actacaggtc caagtggat 180
aatgaatatg cagtatctgt gaaaagtcga atgacatca acccagacac atccaagaac 240
cagttctccc tgcagctgaa ctctgtgact cccgaggaca cggctgtgta ttactgtgca 300
agagagaggt taggggagtt atacggtatg gacgtctggg gccaaaggac cacggtcacc 360
gtctcctcag cctccaccaa gggcccatcg gtcttcccc tggcaccctc ctccaagagc 420
accta                                           425

```

<210> 73

<211> 141

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 73

```

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1              5              10              15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
 20              25              30

```

223

```

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

```

```

<210> 74
<211> 487
<212> DNA
<213> Homo sapiens

```

```

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

```

```

<400> 74
atgcagctga cncagtctcc agactccctg gctgtgtctc tgggcgagag ggccaccatc 60
aactgcaagt ccagccagaa tgttttatac aggtccaaca agaagaactt cttagtttgg 120
taccagcaga aaccaggaca gcctcctaag ctgctcattt actgggcatc tatccgggaa 180
tccgggggtcc ctgaccgatt cagtggcagc gggctctggga cagatttcac tctcaccatc 240
agcagcctgc agactgaaga tgtggcagtt tattactgtc agcaatatta tagtactcct 300
cccaccttcg gccaaaggac acgactggag attaaacgaa ctgtggctgc accatctgtc 360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg 420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggg aggtggataa cgccctccaa 480
tcgggta                                         487

```

```

<210> 75
<211> 162
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 75
Met Gln Leu Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Glu
  1          5          10          15
Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Asn Val Leu Tyr Arg Ser
    20          25          30
Asn Lys Lys Asn Phe Leu Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro
    35          40          45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Ile Arg Glu Ser Gly Val Pro
    50          55          60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
    65          70          75          80
Ser Ser Leu Gln Thr Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
    85          90          95
Tyr Ser Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
    100         105         110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
    115         120         125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130         135         140

```

224

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly

<210> 76
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Flag Tag

<400> 76
 gattacaagg atgacgacga taag 24

<210> 77
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Control sequence

<400> 77
 aagggacgaa gacgaacacu uctt 24

<210> 78
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Control sequence

<400> 78
 aactgaagac ctgaagacaa taa 23

P A T E N T K R A V

1. Monoklonalt antistoff eller et antigenbindende fragment derav, karakterisert ved at det omfatter et antigenbindingssete som binder spesifikt til et PSCA protein omfattende aminosyresekvensen SEKV ID NR: 2 og hvor det monoklonale antistoffet omfatter aminosyresekvensen til V_H regionen av SEKV ID NR: 47 og V_L regionen av SEKV ID NR: 51.
2. Monoklonalt antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge krav 1, karakterisert ved at det monoklonale antistoffet er produsert av hybridomen deponert under American Type Culture Collection (ATCC) Accession No. PTA-6701.
3. Antistoff eller fragment ifølge krav 1 eller 2, karakterisert ved at fragmentet er et Fab, F(ab')₂, Fv eller Sfv fragment.
4. Antistoff eller fragment ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3, karakterisert ved at antistoffet eller fragmentet blir koblet til en detekterbar markør, et toksin, et terapeutisk middel eller et kjemoterapeutisk middel.
5. Hybridom, karakterisert ved at den produserer det monoklonale antistoffet ifølge krav 1 eller 2.
6. Hybridom ifølge krav 5, karakterisert ved at hybridomet er deponert under American Type Culture Collection (ATCC) Accession No. PTA-6701.
7. Polynukleotid, karakterisert ved at det koder for en sekvens som omfatter en lettjede variabel region av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3.
8. Polynukleotid ifølge krav 7, karakterisert ved at det koder for den lette kjeden av antistoffer ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3.
9. Peptid, karakterisert ved at det koder for en sekvens som omfatter en tungkjede variabel region av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3.

10. Polynukleotid ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det koder for den tunge kjeden av antistoffet ifølge et hvilket som helst av kravene 1, 2 eller 3.
11. Vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter polynukleotidet ifølge krav 7, krav 9 eller begge.
12. Celle, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den er transfektert med vektoren ifølge krav 11.
13. Fremgangsmåte for produsering av et antistoff eller et antigenbindende fragment derav, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter:
 dyrking av en celle, hvor:
 (a) cellen er blitt transfektert med en vektor som omfatter et polynukleotid ifølge krav 7 som koder for en sekvens som omfatter en lettkjede variabel region og en vektor som omfatter et polynukleotid ifølge krav 9 som koder for en sekvens som omfatter en tungkjede variabel region; eller
 (b) cellen er blitt transfektert med en vektor som omfatter både et polynukleotid ifølge krav 7 som koder for en sekvens som omfatter en lettkjede variabel region og et polynukleotid ifølge krav 9 som koder for en sekvens som omfatter en tungkjede variabel region;
 hvorved antistoffet eller et antigenbindende fragment derav blir produsert.
14. Farmasøytisk sammensetning, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den omfatter antistoffet, eller Fab, F(ab')₂, Fv eller Sfv fragmentet derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4.
15. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 14, k a r a k t e r i s e r t v e d a t sammensetningen er for behandling av kreft.
16. Farmasøytisk sammensetning ifølge krav 15, k a r a k t e r i s e r t v e d a t kreften er prostata, pankreas, blære, nyre, kolon, lunge, eggstokk eller brystkreftcelle.

17. Anti-cancermiddel for redusering av tumorvekst, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte anti-cancermiddel omfatter en kombinasjon av antistoffet, eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 3 og et kjemoterapeutisk middel.
18. Anti-cancermiddel ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t tumoren er en prostata, pankreas, blære, nyre, kolon, lunge, eggstokk eller brystkrefttumor.
19. Anti-cancermiddel ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte antistoff eller fragment blir koblet til en detekterbar markør som er en radioisotop, en metall chelator, et enzym, en fluorescence forbindelse, en bioluminescence forbindelse eller en kjemiluminescence forbindelse.
20. Anti-cancermiddel ifølge krav 19, k a r a k t e r i s e r t v e d a t radioisotopen er ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{211}At , ^{125}I , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{213}Bi , ^{32}P eller Lu.
21. Anti-cancermiddel ifølge krav 17, k a r a k t e r i s e r t v e d a t det kjemoterapeutiske middelet er ricin, ricin A-kjede, doxorubicin, daunorubicin, et maytansinoid, taxol, etidiumbromid, mitimycin, etoposid, tenoposid, vincristin, vinblastin, colchicine, dihydroksy antracin dion, aktinomycin, difteri toksin, Pseudomonas exotoksin (PE) A, PE40, abrin, abrin A kjede, modeccin A kjede, alfa-sarcin, gelonin, mitogellin, retstriktosin, fenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, sapaonaria officinalis inhibitor, glukokortikoid, auristatiner, auromycin, yttrium, bismut, combrestatin, duokarmyciner, dolostatin, cc1065 eller et cisplatin.
22. Anvendelse av et antistoff eller antigenbindende fragment derav ifølge et hvilket som helst av kravene 1 til 4 for fremstilling av et medikament for anvendelse i en fremgangsmåte for hemming av veksten av en cancercelle som uttrykker et PSCA protein som omfatter aminosyresekvensen SEKV ID NR: 2 i et individ.
23. Anvendelse ifølge krav 22, hvor antistoffet eller det antigenbindende fragmentet derav er koblet til et cytotoksisk middel eller en detekterbar markør.

24. Anvendelse ifølge krav 23, hvor nevnte antistoff eller fragment er koblet til en detekterbar markør som er en radioisotop, en metall chelator, et enzym, en fluorescensforbindelse, en bioluminiscensforbindelse, eller en kjemoluminiscensforbindelse.
25. Anvendelse ifølge krav 24, k a r a k t e r i s e r t v e d a t nevnte radioisotop er ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{211}At , ^{125}I , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{213}Bi , ^{32}P eller Lu.
26. Anvendelse ifølge krav 25, hvor det cytotoksiske middelet er ricin, ricin A-kjede, doxorubicin, daunorubicin, et maytansinoid, taxol, etidiumbromid, mitimycin, etoposid, tenoposid, vincristin, vinblastin, colchicine, dihydroksy antracin dion, aktinomycin, difteri toksin, Pseudomonas exotoksin (PE) A, PE40, abrin, abrin A kjede, modeccin A kjede, alfa-sarcin, gelonin, mitogellin, retstriktosin, fenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, sapaonaria officinalis inhibitor, glukokortikoid, auristatiner, auromycin, yttrium, bismut, combrestatin, duokarmyciner, dolostatin, cc1065 eller et cisplatin.
27. Anvendelse ifølge et hvilket som helst av kravene 22 til 26, hvor kreftcellen er en prostata, pankreas, blære, nyre, kolon, lunge, ovarie eller brystkreftcelle.

Figure 1:

Figur 1A. cDNAet (SEKV ID NR: 1) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 2) for PSCA-v.1. Kozak-sekvensen er vist i halvfet, startmetioninen er underlinjet. Den åbne leserammen strekker seg over nukleinsyre 18-389 omfattende stoppkodonet.

```

1           M K A V L L A L L M A G L A L
1 agggagaggcagtgaccATGAAGGCTGTGCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGCCCC
16  Q P G T A L L C Y S C K A Q V S N E D C
61 TGCAGCCAGGCACCTGCCCTGCTGTGCTACTCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACT
36  L Q V E N C T Q L G E Q C W T A R I R A
121 GCCTGCAGGTGGAGAACTGCACCCAGCTGGGGGAGCAGTGCTGGACCGCGCGCATCCGCG
56  V G L L T V I S K G C S L N C V D D S Q
181 CAGTTGGCCTCCTGACCGTCATCAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAGTGCCTGGATGACTCAC
76  D Y Y V G K K N I T C C D T D L C N A S
241 AGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAATCAGCTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCA
96  G A H A L Q P A A A I L A L L P A L G L
301 GCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGGCTGCTCCCTGCACTCGGCC
116 L L W G P G Q L *
361 TGCTGCTCTGGGGACCCGCCAGCTATAGgctctggggggccccgctgcagccacactg
421 ggtgtggtgccccaggcctttgtgectactcctcacagaacctggcccagtgaggacctgt
481 cctggttcttgaggcacatcctaagcaagtttgaccatgtatgtttgaccccttttcc
541 ccnaacctgacettcccatgggccttttccaggattcccacccggcagatcagttttag
601 tgacacagatccgctgcagatggccctccaacctttctgttgctgtttccatggccc
661 agcattttccaccttaacctgtgttcaggcacttcttccccaggaagccttccctgc
721 ccaccccatattatgaattgagccaggtttggtcgtggtgtcccccgacccagcagggg
781 acaggcaatcaggagggccagtaaggctgagatgaagtggactgagtagaactggagg
841 acaagagttgacgtgagttcctgggagtttccagagatggggcctggaggcctggaggaa
901 ggggccaggcctcacatttgtggggctccgaatggcagcctgagcacagcgtaggccct
961 taataaacacctgttgataagcnaaaaaa

```

Figur 1B. cDNAet (SEKV ID NR: 3) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 4) for PSCA-v.2. Kozak-sekvensen er vist i halvfet, startmetioninen er underlinjet. Den åbne leserammen strekker seg over nukleinsyre 56-427 omfattende stoppkodonet.

```

1           M K
1 tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccATGAA
3  A V L L A L L M A G L A L Q P G T A L L
61 GGCTGTGCTGCTTGCCCTGTTGATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACCTGCCCTGCT
23  C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC
43  Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I

```

181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGTCTGGACCGCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
 63 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K R
 241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAAC TGGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
 83 N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
 301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCCATGCCCTGCAGCC
 103 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
 361 GGCTGCGGCCATCCTTGGCGCTGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
 123 L *
 421 GCTATAGctctctggggggccccgctgcagccacactgggtgtggtgccccaggectctg
 481 tgccactcctcacacacccggccagtgaggagcctgtcctggttcttgaggcacatccta
 541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgcgccctgtccccaccctgaccctcccatggccc
 601 tctccaggactccacccggcagatcggtctattgacacagatccgcctgcagatggcc
 661 cctccaaccctctctgctgctgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
 721 tcaggcacctcttccccaggaagccttccctgcccaccccatctatgacttgagccagg
 781 tctggtccgtggtgtcccccgacccagcaggggacaggcactcaggagggccccggtaaa
 841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga
 901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggc
 961 tccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttggataagcca

Figur 1C. cDNAet (SEKV ID NR: 5) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 6) for PSCA-v.3. Kozak-sekvensen er vist i halvfet, startmetioninen er underlinjet. Den åbne leserammen strekker seg over nukleinsyre 423-707 omfattende stoppkodonet.

1 tttgaggccatataaagtcacctgaggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaa
 61 ggctgtgctgcttggccctgttgatggcaggcttggccctgcagccaggcactgccctgct
 121 gtgctaactcctgcaaagcccaggcgagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgc
 181 agcttgaactgcgtggatgactcacaggactactacgtgggcaagaagaacatcacgtgc
 241 tgtgacaccgacttgtgcactcggcctgctgctctggggacccggccagctataggctct
 301 gggggggccccgctgcagccacactgggtgtggtgccccaggectctgtgccactcctca
 361 cacaccggcccagtgaggagcctgtcctggttccctgaggcacatcctaacgcaagtctga
 1 M Y V C A P V P H P D P P M A L S R T P
 421 ccATGTATGTCTGCGCCCCCTGTCCCCCACCCTGACCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTC
 21 T R Q I G S I D T D P P A D G P S N P L
 481 CCACCCGGCAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCTGCAGATGGCCCCCTCCAACCTC
 41 C C C F H G P A F S T L N P V L R H L F
 541 TCTGCTGCTGTTCCATGGCCCAGCATTCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCT
 61 P Q E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V
 601 TCCCCCAGGAAGCCTTCCCTGCCCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGG
 81 S P A P S R G Q A L R R A R *
 661 TGTCCCCCGCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCCGGTAAaggctgagatgaa
 721 gtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagtcctccagagat

781 ggggcctggaggcctggaggaagggccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggc
 841 agcctcagcacagcgtagggcccttaataaacacctgttggataagcca

Figur 1D. cDNAet (SEKV ID NR: 7) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 8) for PSCA-v.4. Startmetioninen er underlinjet. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 424-9993 omfattende stoppkodonet.

1 gacagtgaaccctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
 61 cccaggggttctgtgccgatcagcccaggacgggtcttcccgggtgcagtttctgatgcgggg
 121 agggcagtgctgccttccgggtcaccaggaccagtgctcagcccgcctgcttgacccctt
 181 acttagctgggggtccaatccatacccaatttagatgattcagacgatgggatttgaaact
 241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccctgctgtgctactcctgcaaagcccagggtga
 301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgaccccagctgggggagcagtgctggaccg
 361 cgcgcacccgcgcagttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttgaactgcg
 1 M T H R T T T W A R R T S R A V T P T
 421 tggATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCACGTGCTGTGACACCGACT
 20 C A T P A G P M P C S R L P P S L R C S
 481 TGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGCTGCTCC
 40 L H S A C C S G D P A S Y R L W G A P L
 541 CTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCCCCGCTG
 60 Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P A Q
 601 CAGCCACACTGGGTGTGGTGCCCGAGGCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCGGCCAG
 80 W E P V L V P E A H P N A S L T M Y V C
 661 TGGGAGCCTGTCTGTTCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTATGTCTGC
 100 A P V P H P D P P M A L S R T P T R Q I
 721 GCCCCTGTCCCCACCCCTGACCCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGGCAGATC
 120 G S I D T D P P A D G P S N P L C C C F
 781 GGCTCTATTGACACAGATCCGCTGCAGATGGCCCTCCAACCTCTCTGCTGCTGTTTC
 140 H G P A F S T L N P V L R H L P P Q E A
 841 CATGGCCAGCATTCTCCACCCCTTAACCTGTGCTCAGGCACCTCTCCCCCAGGAAGCC
 160 F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P A P
 901 TTCCCTGCCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCCCGCACCC
 180 S R G Q A L R R A R *
 961 AGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAAaggctgagatgaagtggactgagtaga
 1021 actggaggacaggagtcgacgtgagtctcctgggagtctccagagatggggcctggaggcc
 1081 tggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcagcacagc
 1141 gtagggcccttaataaacacctgttggataagcca

Figur 1E. cDNAet (SEKV ID NR: 9) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 10) for PSCA-v.5. Startmetioninen er underlinjet. Den åpne leserammen strekker seg over nukleinsyre 910-1479 omfattende stoppkodonet.

1 gacagtgaaccctgcgctgaaggcgttggggctcctgcagttctggggcagccacaggcg
 61 cccaggggttctgtgccgatcagcccaggacgggtcttcccgggtgcagtttctgatgcgggg

121 agggcagtgccttcgggtcaccaggaccagtgtcagcccgctgcttgacccccctt
 181 acttagctggggtccaatccatacccaatttagatgattcagacgatgggatttgaaact
 241 tttgaactgggtgcgacttaagcactgccttgcctgtgtgctactcctgcaaagcccaggtga
 301 gcaacgaggactgcctgcaggtggagaactgcacccagctgggggagcagtgcctggaccg
 361 cgcgcacccgtgagtggtgggggacgacagccgcccaggtcctaggtctctgcccactgaactat
 421 taatctttctggccatctgtccgcacatctgtgtgctgttttcttccacctgtccccgacc
 481 cgtcccgccactgcaccccccaacaatcaccagcatctgtccctccagccatcctcctcc
 541 atctgccactcctccactcatctgtccctcccccatcctccatcttccactcctccaccca
 601 tctgtccctcccccatcctgagctcacttactcactcaccctatttctgacgtcagcgg
 661 gtggtccatctgcctcggacatctggatagggctgagaccagggccgagaccagggccctc
 721 gcactgcttgcaatcctgagggcagcccagggggactctagagcattaggcaggggtggga
 781 caggaggaggcctggggcaggtcagggcaggtgagcacacagggcagccccatccccggat
 841 cccgctgctccccagggcaggttggcctcctgaccgtcatcagcaaaggctgcagcttga
 1 M T H R T T T W A R R T S R A V T
 901 actgcgtggATGACTCAGGACTACTACGTGGGCAAGAAGAACATCAGTGTGTGACA
 18 P T C A T P A G P M P C S R L P P S L R
 961 CCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCCATGCCCTGCAGCCGGCTGCCGCCATCCTTGCGC
 38 C S L H S A C C S G D P A S Y R L W G A
 1021 TGCTCCCTGCACTCGGCCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCAGCTATAGGCTCTGGGGGGCC
 58 P L Q P T L G V V P Q A S V P L L T H P
 1081 CCGCTGCAGCCACACTGGGTGTGGTGCCCCAGGCCTCTGTGCCACTCCTCACACACCCG
 78 A Q W E P V L V P E A H P N A S L T M Y
 1141 GCCCAGTGGGAGCCTGTCTGGTTCCTGAGGCACATCCTAACGCAAGTCTGACCATGTAT
 98 V C A P V P H P D P P M A L S R T P T R
 1201 GTCTGCGCCCTGTCCCCACCCTGAGCCTCCCATGGCCCTCTCCAGGACTCCCACCCGG
 118 Q I G S I D T D P P A D G P S N P L C C
 1261 CAGATCGGCTCTATTGACACAGATCCGCCTGCAGATGGCCCTCCAACCTCTCTGTCTGC
 138 C P H G P A F S T L N P V L R H L F P Q
 1321 TGTTTCCATGGCCAGCATTCCTCCACCCTTAACCCTGTGCTCAGGCACCTCTTCCCCCAG
 158 E A F P A H P I Y D L S Q V W S V V S P
 1381 GAAGCCTTCCCTGCCACCCCATCTATGACTTGAGCCAGGTCTGGTCCGTGGTGTCCCC
 178 A P S R G Q A L R R A R *
 1441 GCACCCAGCAGGGGACAGGCACTCAGGAGGGCCCGGTAAaggctgagatgaagtggactg
 1501 agtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctgggagctctccagagatggggcctg
 1561 gaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcgtggggctccctgaatggcagcctcag
 1621 cacaocotagcccttaataaacaccttattgataaacca

Figur 1F. cDNAet (SEKV ID NR: 11) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 12) for PSCA-v.6. Kozak-sekvensen er vist i halvfet, startmetioninen er underlinjet. Den åbne leserammen strekker seg over nukleinsyre 83-427 omfattende stoppkodonet.

```

1 tttgaggccatataaagtcacctgagggccctctccaccacagcccaccagtgaccatgaa
1      M A G L A L Q P G T A L L
61 ggctgtgctgcttgccctgttgATGGCAGGCTTGGCCCTGCAGCCAGGCACTGCCCTGCT
14 C Y S C K A Q V S N E D C L Q V E N C T
121 GTGCTACTCCTGCAAAGCCCAGGTGAGCAACGAGGACTGCCTGCAGGTGGAGAACTGCAC
34 Q L G E Q C W T A R I R A V G L L T V I
181 CCAGCTGGGGGAGCAGTGTCTGGACCGCGCGCATCCGCGCAGTTGGCCTCCTGACCGTCAT
54 S K G C S L N C V D D S Q D Y Y V G K K
241 CAGCAAAGGCTGCAGCTTGAACCTGCGTGGATGACTCACAGGACTACTACGTGGGCAAGAA
74 N I T C C D T D L C N A S G A H A L Q P
301 GAACATCACGTGCTGTGACACCGACTTGTGCAACGCCAGCGGGGCCCATGCCCTGCAGCC
94 A A A I L A L L P A L G L L L W G P G Q
361 GGCTGCCGCCATCCTTGGCGTGTCTCCCTGCACTCGGCTGCTGCTCTGGGGACCCGGCCA
114 L *
421 GCTATAGGctcttggggggccccgctgcagccacactgggtgtggtgccccaggcctctg
481 tgccactcctcacacaccggccagtgaggagcctgtcctgggttctctgaggcacatccta
541 acgcaagtctgaccatgtatgtctgcgcccctgtccccaccctgaccctcccatggccc
601 tctccaggactcccaccggcagatcggtctattgacacagatccgctgcagatggcc
661 cctccaaccctctctgtgtgtgtttccatggcccagcattctccacccttaaccctgtgc
721 tcaggcacctcttccccaggaagccttccctgcccaccctctatgacttgagccagg
781 tctgggtccgtggtgtcccccgacccagcaggggacaggcactcaggagggcccggtaaa
841 ggctgagatgaagtggactgagtagaactggaggacaggagtcgacgtgagttcctggga
901 gtctccagagatggggcctggaggcctggaggaaggggcccaggcctcacattcggtggggc
961 tccctgaatggcagcctcagcacagcgtaggcccttaataaacacctgttgataagcca

```

Figur 1G. SNP-varianter til PSCA-v.2, PSCA-v.7 til og med v.18. PSCA-v.7 til og med v.18-proteinene har 123 aminosyrer. Varianter PSCA-v.7 til og med v.18 er varianter med enkel nukleotidforskjell fra PSCA-v.2, og koder for det samme proteinet som v.2. Selv om disse SNP-variantene er vist separat kan de også forekomme hvilke som helst kombinasjoner og i hvilke som helst av transkripsjonsvariantene listet ovenfor i figur 2A til og med 2F.

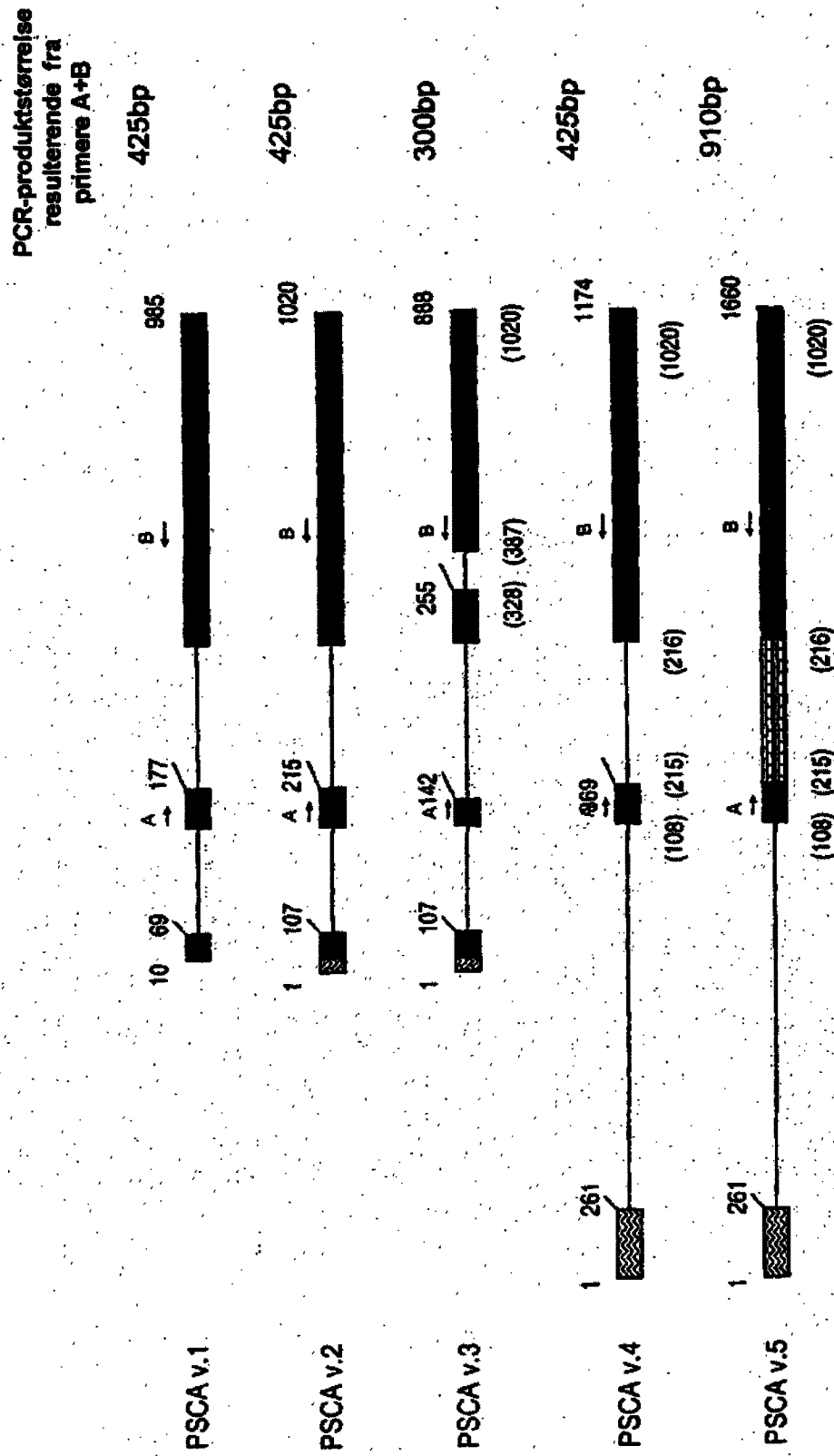
Variant	Nukleotidposisjon	Nukleotidvariant	Aminosyrevariant
PSCA-v.7	367	C/T	stum variant
PSCA-v.8	424	A/C	stum variant
PSCA-v.9	495	C/G	stum variant
PSCA-v.10	499	C/T	stum variant
PSCA-v.11	563	C/T	stum variant
PSCA-v.12	567	G/A	stum variant

Variant	Nukleinsyre- posisjon	Nukleinsyre- variasjon	Aminosyre- variasjon
PSCA-v.13	627	G/A	stum variant
PSCA-v.14	634	T/G	stum variant
PSCA-v.15	835	G/A	stum variant
PSCA-v.16	847	G/A	stum variant
PSCA-v.17	878	G/A	stum variant
PSCA-v.18	978	C/G	stum variant

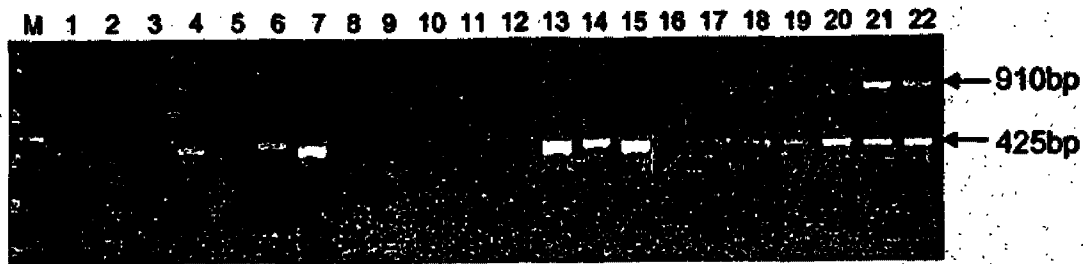
Figur 1H. SNP-varianter til PSCA-v.4, PSCA-v.19 til og med v.30. PSCA-v.19 til og med v.30-proteinene har 189 aminosyrer. Varianter PSCA-v.19 til og med v.30 er varianter med enkel nukleotidforskjell fra PSCA-v.4. PSCA-v.9-, v.10-, v.11-, v.24- og v.25-proteiner er ulike fra PSCA-v.1 i en aminosyre. PSCA-v.23, v.28, v.29 og v.30 koder for det samme proteinet som v.4. Selv om disse SNP-variantene er vist separat kan de også forekomme hvilke som helst kombinasjoner og i hvilke som helst av transkripsjonsvariantene v.3 og v.4.

Variant	Nukleinsyre- posisjon	Nukleinsyre- variasjon	Aminosyre- posisjon	Aminosyre- variasjon
PSCA-v.19	521	C/T	33	P/L
PSCA-v.20	578	A/C	52	Y/S
PSCA-v.21	649	C/G	76	H/D
PSCA-v.22	653	C/T	77	P/L
PSCA-v.23	717	C/T	98	stum variant
PSCA-v.24	721	G/A	100	A/T
PSCA-v.25	781	G/A	120	G/S
PSCA-v.26	788	T/G	122	I/S
PSCA-v.27	989	G/A	189	R/Q
PSCA-v.28	1001	G/A		stum variant
PSCA-v.29	1032	G/A		stum variant
PSCA-v.30	1132	C/G		stum variant

Figur 1(a).



Ekspressjon av PSCA-varianter. Figur 1(a): Primere ble utformet for å differensiere mellom PSCA-v.1/v.2/v.4, PSCA-v.3 og PSCA-v.5. PSCA-v.1/v.2/v.4 ledet til et PCR-produkt på 425 bp, mens PSCA-v.3 ledet til et PCR-produkt på 300 bp, mens PSCA-v.5 ledet til et PCR-produkt på 910 bp i størrelse.

Figur 1I(b).

M = Markør

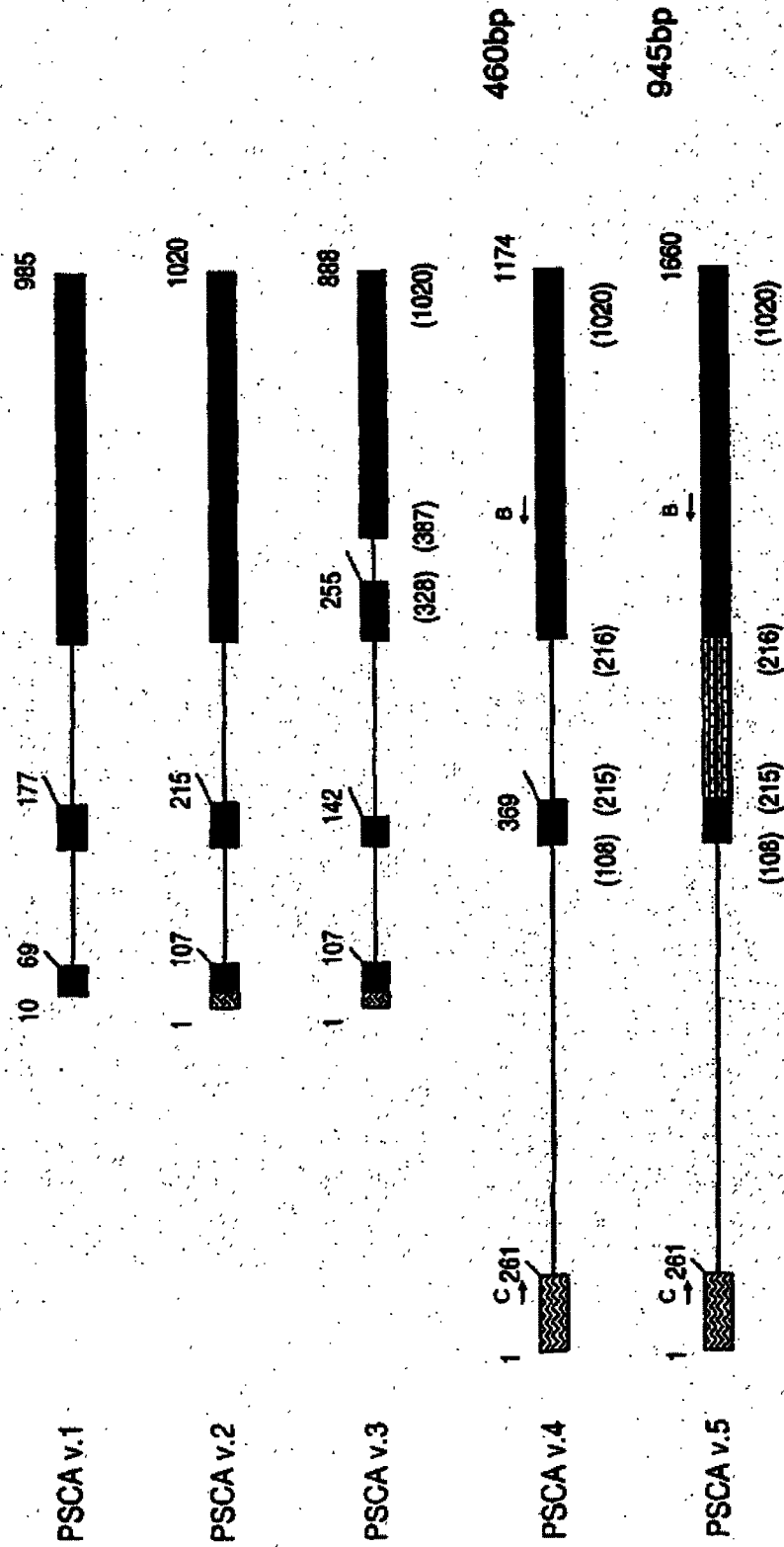
- Blære
- Hjerne
- Hjerte
- Nyre
- Lever
- Lunge
- Prostata
- Milt
- Skjelettmuskel
- Testikkel
- Bukspyttkjertel
- Kolon
- Mage

- Prostatakraft
- Blærekraft
- Nyrekraft
- Kolonkraft
- Lungekraft
- Eggstokkraft
- Brystkraft
- Kreftmetastase
- Bukspyttkjertelkraft.

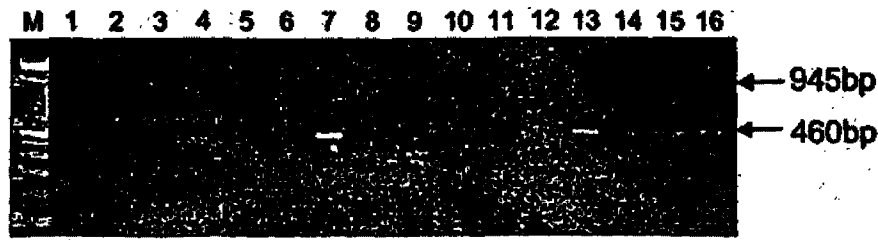
Ekspressjon av PSCA-varianter. Figur 1I(b): Første tråds cDNA ble fremstilt fra normal blære, hjerne, hjerte, nyre, lever, lunge, prostata, milt, skjelettmuskel, testikkel, bukspyttkjertel, kolon, mage, samlinger av prostatakraft, blærekraft, nyrekraft, kolonkraft, lungekraft, eggstokkraft, brystkraft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkraft. Normalisering ble utført med PCR ved anvendelse av primere til aktin. Semikvantitativ PCR ved anvendelse av de variantspesifikke primerne ble utført ved 30 syklar av amplifisering. Resultatar viser ekspresjon av PSCA-v.5 hovedsakelig i brystkraft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkraft og ved lavere nivå i kolonkraft og lungekraft. PSCA-v.1/v.2/v.4-PCR-produkt ble detektert i prostatakraft, blærekraft, nyrekraft, kolonkraft, lungekraft, eggstokkraft, brystkraft, kreftmetastase og bukspyttkjertelkraft. Blant normalt vev ble PSCA-v.1/v.2/v.4-PCR-produkt detektert bare i prostata, mage og ved lavere nivå i nyre og lunge, mens PSCA-v.5 ikke ble detektert i noen som helst normale vev. PSCA-v.3-PCR-detektert produkt ble ikke detektert i noen som helst av de testete prøvene.

Figur 1J(a).

PCR-produktstørrelse
resulterende fra primere
C+B



Ekspressjon av PSCA-v.4 og PSCA-v.5. Figur 1J(a) Primere ble utformet for å differensiere mellom PSCA-v.4 og PSCA-v.5. PSCA-v.4 ledet til et PCR-produkt på 460 bp, mens PSCA-v.5 ledet til et PCR-produkt på 945 bp i størrelse.

Figur 1J(b).

M = Markør

- Blære
- Hjerne
- Hjerte
- Nyre
- Lever
- Lunge
- Prostata
- Milt
- Skjelettmuskel
- Testikkel
- Bukspyttkjertel
- Kolon
- Mage

- Prostatakreft
- Blærekreft
- Multi-xenograftsamling

Ekspresjon av PSCA-v.4 og PSCA-v.5. Figur 1J(a): Første tråds cDNA ble fremstilt fra normal blære, hjerne, hjerte, nyre, lever, lunge, prostata, milt, skjelettmuskel, testikkel, bukspyttkjertel, kolon, mage, samlinger av prostatakreft, blærekreft og multi-xenograftsamling (prostatakreft-, nyrekreft- og blærekreft-xenograft). Normalisering ble utført med PCR ved anvendelse av primere til aktin. Semikvantitativ PCR ved anvendelse av de variantspesifikke primerne ble utført ved 30 syklar av amplifisering. Resultater viser ekspresjon av PSCA-v.4 i prostatakreft-, blærekreft- og multi-xenograftsamling, normal nyre og prostata. PSCA-v.5 ble detektert bare i normal prostata og blærekreft.

Figur 2:

Figur 2A. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 13) til Ha1-4.117-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

1 VAAPRWLSQ VQLQESGPG L VKPSQTLST CTVSGGSISS GGYWIWIRQ HPGKGLEWIG
61 YIYYNGNTYY NPSLKSRVTM SVDTSKNQFS LKLSVTAAD TAVYICARDG ITMIRGYIYG
121 MDVWGQGTTV TVSSASTKGP SVEGPSVF

Figur 2B. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 14) til Ha1-4.117-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 QLTQSPSSVS ASVGDRVTIT CRASRGISSW LAWYQOKPGK APKLLIYTAS SLQSGVPSRF
61 SGSGSGTDFT LTISLQPED FATYYCQAY SFPRTFGQGT KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD
121 EQLKSGTASV VCLLNNFYPR EAKVQKVDN ALQSG

Figur 2C. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 15) til Ha1-4.120-VH.

1 QCVAAPRWVL SQVQLQESGP GLVKPSQTL S LTCTVSGGSI SSGGYWSWI RQHPGKGLEW
61 IGYIYYSGST YYNPSLKSRV TISVDTSKNQ FSLKLSSVTA ADTAVYICAR DRITMVRGGI
121 PSGMDVWGQG TTVTVS

Figur 2D. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 16) til Ha1-4.120-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 SPFTCRASQS ITNYLNWYQQ KPGEAPKLLI HVASSLQSGV PSRFSGSGSG RDTTLTISSL
61 QPEDFATYYC QQSHSIPRTF GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLNN
121 FYPREAKVQW KVDNALQSG

Figur 2E. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 17) til Ha1-5.99-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

1 QVHLQQWGAG LLKPSETLSL TCAVYGGSPS GYWSWIRQP PGKGLEWIGE INHSGSTSYK
61 PSLKSRVTVS VDTSKNQFSL KLSYVTAADT AVYICARDRG DYGDPLFDYW GQGLTVTVSS
121 ASTKGPSVFP LAPSSKST

Figur 2F. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 18) til Ha1-5.99-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 SPGERATLSC RASQSIGSTY LAWYQOKPGQ APRLLIYGAS SRATGIPERF SGSGSGTDFT
61 LTISGLEPED FAVFYCQCG SSPPTFGQGT KVEIKRTVAA PSVFIFPPSD EQLKSGTASV
121 VCLLNNFYPR EAKVQKVDN A

Figur 2 G. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 19) til Ha1-4.121-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

1 GLQCVAAPRW VLSQVLOQW GAGLLKPSET LSLTCAVYGG SPSGNYWSWI RQPPGKGLEW
61 IGEINHSGST NYNPSLKSRV TISVDTSKNQ FSLKLSSVTA ADTAVYYCAR GGSYNYFDYW
121 GQGTLVTVSS ASTKGPSVK

Figur 2H. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 20) til Ha1-4.121-VL-c.5. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 MDMRVPAQLL GLLLLWLGA RCDIQMTQSP SLSASVGDR VTITQASQD ISNYLWYQQ
61 SPGKAPKFLI SDASNLKTV PSRFSGSGSG TDFSFTISL QPEDIATYCC QQYDSLPTTF
121 GPGTKVDIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCCLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN
181 SOESVTEQDS KDSYSLST LTLKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC

Figur 2I. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 21) til Ha1-4.121-VL-c.26. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 MRLPAQLLGL LMLWVSGSG DIVMTQSPLS LPVTPGEPAS ISCRSSQSLH HSNLYNLVW
61 YLQKPGQSPQ LLIYLGSIK SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCMQPLQTP
121 ITFGQTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCLL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ
181 SGNSQESVTE QDSKDSYSL SSTLTLKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC

Figur 2J. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 22) til Ha1-1.16-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

1 QVQLQQSGPG LVKPSQTLSL TCAISGDSVS SNSAAMNWIR QSPSRGLEWL GRTYYRSKWY
61 NGYAVSVKSR MTINPDTSK QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA RERLGELYGM DVMGQGTIVT
121 VSSASTKGPS VFPLAPSSKS T

Figur 2K. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 23) til Ha1-1.16-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 QLTQSPDSL A VSLGERATIN CKSSQNIYR SSKRNHLVWY QQKPGQPPKL LIYWASTRES
61 GVPARFSGSG SGTDFTLTIS TLQAEDVAVY YCQYYSTPP TFGQTRLEI KRTVAAPSVF
121 IFPPSDEQLK SGTASVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS G

Figur 2L. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 24) til Ha1-4.5-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

1 GPGXXKPSQX LSLTGTVSGG SSSGGYYWS WIRQHPGKGL EWIGNIYYSG
51 STYYNPSLKS RVTISVDTSK NQFSLKLSAV TAADTAVYYC ARDNITMVRG
101 VYVGMDVWGQ GTTVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTY

Figur 2M. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 25) til Ha1-4.5-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1   YAASSLQSGV PSRPSGSGSG TDFTLTISSL QPEDFATYYC QQAHS�PRTF
51  GQGTKVEIKR TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVCLLN FYPRKAKVQW
101 KVDNTLQ

```

Figur 2N. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 26) til Ha1-4.40-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1   QVQLVESGGG VVQGRSLRL SCAASGFTFS RHGVHWRQA PGKLEWVAV
51  IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSLRAED TAVYYCARGG
101 LIAVRPGYYY YGMDVWGQGT TTTVSSASTK GPSVFPLAPS SKST

```

Figur 2O. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 27) til Ha1-4.40-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1   EMQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQIS SYLNWYQKP GKAPKLLIYA
51  ASSLQSGVPS RPSGSGSGTD FTLTISSLQF EDFATYYCQ SYSTPLTFGG
101 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
151 DNALQSG

```

Figur 2P. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 28) til Ha1-4.37-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1   CPGALQESGP GLVRPSQTL S LCTVSGGSI SSGGTYWIW IRQHPGKGLE
51  WIGYIIYSGS TTYNPSLKSR VTISVDTSKN QPSLKLSSVT AADTAVYYCA
101 RDGITHVRGI SGGMDVWGQGT TTTVSSAST KGPSVKGPSV F

```

Figur 2Q. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 29) til Ha1-4.37-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1   ASVGDRVTIT CRASQSISSH LNWYQKPKG APKLLIYAAS SLQSGVPSRF
51  SGSGSGTDFT LSISLQPED FATYFCQSY SIPRTFGQGT KVEITRTVAA
101 PSVFIFPPSD EQLKSGTASV VCLLNIFYPR EAKVQWKVDN ALQSG

```

Figur 2R. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 30) til Ha1-1.43-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1   QLQSGPGLV KPSQTLSTC AISGDSVSSN SAAWNWIQS PSRGLEWLGR
51  TTYRSKWYNE YAVSVKSRMT INPDTSKNQF SLQNSVTPE DTAVYYCARE
101 RLGELYGMDV WGQGTMTVS SASTKGPSVF PLAPSSKST

```

Figur 2S. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 31) til Ha1-1.43-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1   LQVQPECLYT VSDKNNELCW YQKPGQPPK LLMYWASIRE SGVPDRFSGS
51  GSGTDFTLTI SSLQAEDVAV YYCQYYSTP PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV
101 FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPRE

```

Figur 2T. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 32) til Ha1-1.152-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1   QVQLQSGPG LVKPSQTLTL TCAISGDSVS SNSAANNWIR QSPWRGLEWL
51  GRYYRSKWY NEYAVSVKSR MTINPDTSKN QFSLQLNSVT PEDTAVYYCA
101 RERLGELYGM DWGQGTTVT VSSASTKGPS VFPLAPSSKS T

```

Figur 2U. Aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 33) til Ha1-1.152-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1   MQLTQSPDSL AVSLGERATI NCKSSQNVLY RSNKKNFLW YQKPGQPPK
51  LLIYWASIRE SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQTEDVAV YYCQYYSTP
101 PTFGQGTRLE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SG

```

Figur 3:

Figur 3A. cDNAet (SEKV ID NR: 34) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 35) til Ha1-4.117-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P G L
1 gtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggcccaggactg
21 V K P S Q T L S L T C T V S G G S I S S
61 gtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgggtggctccatcagcagt
41 G G Y Y W I W I R Q H P G K G L E W I G
121 ggtgggttactactggatctggatccgccagcaccaggggaagggcctggagtggattggg
61 Y I Y Y N G N T Y Y N P S L K S R V T M
181 tacatctattacaatgggaacacctactacaacccgtccctcaagagtcgagttaccatg
81 S V D T S K N Q F S L K L S S V T A A D
241 tcagtagacacgtctaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgcggac
101 T A V Y Y C A R D G I T M I R G Y Y Y G
301 acggccgtgtattactgtgcgagagatgggtattactatgatacggcgctactactacggt
121 M D V W G Q G T T V T V S S A S T K G P
361 atggacgtctggggccaagggaccacggtcacctctcctcagcctccaccaagggccca
141 S V K G P S V F
421 tcgggtcaagggcccatcggtcttca

```

Figur 3B. cDNAet (SEKV ID NR: 36) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 37) til Ha1-4.117-VL.

Understreket er lettikjedens konstante region.

```

1 Q L T Q S P S S V S A S V G D R V T I T
1 cagctgaacnagtcctccatcttccgtgtctgcacatctgtaggagacagagtcaccatcact
21 C R A S R G I S S W L A W Y Q Q K P G K
61 tgtcgggagcagtcgggggtattagcagctggtagcctggatcagcagaaaccagggaaa
41 A P K L L I Y T A S S L Q S G V P S R F
121 gcccctaagctcctgatctatactgtcatccagtttgcaaagtgagtcaccatcaaggttc
61 S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D
181 agcggcagtggttctgtgggacagatttcactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagat
81 F A T Y Y C Q Q A Y S F P R T F G Q G T
241 tttgcaacttactattgtcaacaggcttacagtttccctcggacgttcggccaagggacc
101 K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D
301 aaggtggaaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcctatctgat
121 E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P R
361 gagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgectgctgaataacttctatcccaga
141 E A K V Q W K V D N A L Q S G
421 gaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggta

```

Figur 3C. cDNAet (SEKV ID NR: 38) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 39) til Ha1-4.120-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 Q C V A A P R W V L S Q V Q L Q E S G P
1 cagtgtgtggcagcaccagatgggtcctgtcccaggtgcagctgcaggagtcgggcccga
21 G L V K P S Q T L S L T C T V S G G S I
61 ggactgggtgaagccttcacagaccctgtccctcacctgcactgtctctgggtggctccatc
41 S S G G Y Y W S W I R Q H P G K G L E W
121 agcagtggtgggttactactggagctggatccgccagcaccaggggaagggcctggagtgg
61 I G Y I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R V
181 attgggtacatatattacagtgaggacactactacaacccgtccctcaagagtcgagtt
81 T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
241 accatatcagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgactgcc
101 A D T A V Y Y C A R D R I T M V R G G I
301 gcggacacggcgtgtattactgtgcgagagatcgaattactatgggttcggggaggtatt
121 P S G M D V W G Q G T T V T V S
361 cccagtggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcacctgtctcct

```

Figur 3D. cDNAet (SEKV ID NR: 40) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 41) til Ha1-4.120-VL.

Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1 S P F T C R A S Q S I T N Y L N W Y Q Q
1 tcaccattcacttgcgggcaagtcagagcattaccaactatttaaattgggtatcagcag
21 K P G E A P K L L I H V A S S L Q S G V
61 aaaccagggggaagccctaagctcctgatccatgttgcacagtttgcaaagtggttc
41 P S R F S G S G S G R D F T L T I S S L
121 ccatcaaggttcagtggcagtgatctgggagagatttcactctcaccatcagcagctcg
61 Q P E D F A T Y Y C Q Q S H S I P R T F
181 caacctgaagatttgcaacttactactgtcaacagagtcacagtatccctcggacgttc
81 G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F
241 ggccaagggaccaaggtggaatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcattcttc
101 P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N
301 ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctggaataac
121 F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
361 ttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggt

```

Figur 3E. cDNAet (SEKV ID NR: 42) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 43) til Ha1-5.99-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 Q V H L Q Q W G A G L L K P S E T L S L
1 caggtgcatctacagcagtggtggcgaggactgttgaagccttcggagaccctgtccttc
21 T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q P
61 acctgcgctgtctatggtgggtccttcagtggttactactggagctggatccgagccc
41 P G K G L E W I G E I N H S G S T S Y K
121 ccggggaagggactggagtggttggggaatcaatcatagtggaagcaccagctacaag
61 P S L K S R V T V S V D T S K N Q F S L
181 ccgtccctcaagagtcagtcacgtatcagtggaacagctccaagaaccagttctccttg
81 K L S Y V T A A D T A V Y Y C A R D R G
241 aagctgagctatgtgaccgcgcggacagggctgtgtattactgtgcgagagataggggt
101 D Y G D F L F P Y W G Q G T L V T V S S
301 gactacgggtgacttctcttctgactactggggccagggaaacctggtcacgtctcctca
121 A S T K G P S V F P L A P S S K S T
361 gcctccaccaagggcccatcggtcttccctctggcacctcctccaagagcaccta

```

Figur 3F. cDNAet (SEKV ID NR: 44) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 45) til Ha1-5.99-VL.

Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1 S P G E R A T L S C R A S Q S I G S T Y
1 tctccaggggaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtattggcagcacctac
21 L A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S
61 ttagcctgggtaccagcagaaacctggccaggtcccaggtcctcatctatgggtgcatcc
41 S R A T G I P E R F S G S G S G T D F T
121 agcagggccactggcatcccagaaaggttcagtggcagtggtctgggacagacttcaact
61 L T I S G L E P E D F A V F Y C Q Q C G
181 ctccaccatcagcggactggagcctgaagattttgcagtggtttactgtcaacagtggtgt
81 S S P P T F G Q G T K V E I K R T V A A
241 agctcacctccgacgttcggccaagggaccaaggtggaatcaaacgaactgtggctgca
101 P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
301 ccattctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
121 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N
361 gtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac
141 A
421 gccct

```

Figur 3 G. cDNAet (SEKV ID NR: 46) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 47) til Ha1-4.121-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 G L Q C V A A P R W V L S Q V Q L Q Q W
1 ggtctgcagtggtggcagcacccagatgggtcctgtcccaggtgcagctacagcagtggt
21 G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G

```

61 ggcgaggactgttgaagccttcggagaccctgtccctcacctgcgtgtctatgggtggg
 41 S F S G N Y W S W I R Q P P G K G L E W
 121 tccttcagtggttaactactggagctggatccgccagccccaggggaaggggctggagtg
 61 I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V
 181 attggggaaatcaatcatagtggagcaccactacaacccgtccctcaagagtcgagtc
 81 T I S V D T S K N Q F S L K L S S V T A
 241 accatatcagtagacacgtccaagaaccagttctccctgaagctgagctctgtgaccgcc
 101 A D T A V Y Y C A R G G S Y N Y F D Y W
 301 gcggacacggctgtgtattactgtgcgagaggggggagctacaactactttgactactgg
 121 G Q G T L V T V S S A S T K G P S V K
 361 ggccaggggaaccctggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcaag

Figur 3H. cDNAet (SEKV ID NR: 48) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 49) til Ha1-4.121-VL-c.5. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 N D M R V P A Q L L G
 1 aaaaaagtcagtcaccaaccaggacacagcATGGACATGAGGGTCCCTGCTCAGTCTCTGG
 12 L L L L W L S G A R C D I Q M T Q S P S
 61 GGCTCCTGCTGCTCTGGCTCTCAGGTGCCAGATGTGACATCCAGATGACTCAGTCTCCAT
 32 S L S A S V G D R V T I T C Q A S Q D I
 121 CCTCCCTGCTGCTGCTCTGAGGAGACAGAGTACCATCACTTCCAGGCGAGTCAGGACA
 52 S N Y L N W Y Q Q S P G K A P K F L I S
 181 TTAGCAACTATTTGAATTGGTATCAGCAGAGTCCCGGGAAGCCCTAAGTTCCTGATCT
 72 D A S N L K T G V P S R F S G S G T
 241 CCGATGCATCCAATTTAAAAACAGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGTGGAGTGGATCTGGGA
 92 D F S F T I S S L Q P E D I A T Y C G Q
 301 CAGATTTTCTTTTACCATCAGCAGCCTACAGCCTGAAGATATTGCGACCTATTGCTGTC
 112 Q Y D S L P F T F G P G T K V D I K R T
 361 AACAGTATGATAGTCTCCCATTCACCTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAACGAA
 132 V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T
 421 CTGTGCTGCAACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
 152 A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W K
 481 CTGCCCTGTTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
 172 V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K
 541 AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA
 192 D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H
 601 AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTCAGAGAAAC
 212 K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F
 661 ACAAGTCTACGCCCTCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCT
 232 N R G E C
 721 TCAACAGGGGAGAGTGTAGaggggagaagtgcacccacctgctcctcagttccagcctga
 781 cccctccctcctcttggcctctgaccccttttccacaggggacctaaccctattgaggt
 841 cctccagctcatcttcacctaaccctcctcctccttggctttaattatgctaattg
 901 tggaggagaatgaataaataaagtgaatctttg

Figur 3I. cDNAet (SEKV ID NR: 50) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 51) til Ha1-4.121-VL-c.26. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 M R L P A Q L L G
 1 aaagatcaggactcctcagttcaccttctcacaATGAGGCTCCCTGCTCAGTCTCTGGGG
 10 L L M L W V S G S S G D I V M T Q S P L
 61 CTGCTAATGCTCTGGGTCTCTGGATCCAGATGGGGATATTGTGATGACTCAGTCTCCACTC
 30 S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L
 121 TCCCTGCCCGTCACCCCTGGAGAGCCGGCCTCCATCTCCTGCAGGTCTAGTCAGAGCCTC
 50 L H S N G Y N Y L V W Y L Q K P G Q S P
 181 CTACATAGTAATGGATACAACCTATTTGGTTTGGTACCTGCAGAAGCCAGGACAGTCTCCA
 70 Q L L I Y L G S I R A S G V P D R F S G
 241 CAGTCTCTGATCTATTTGGGTCTATTCCGGGCTCCGGGGTCCCTGACAGGTTCAAGTGGC
 90 S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G
 301 AGTGGATCAGGCACAGATTTTACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGG
 110 V Y Y C M Q P L Q T P I T F G Q G T R L
 361 GTTTATTACTGCATGCAACCTCTACAAACTCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACAGACTG
 130 E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q

421 GAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
 150 L K S G T A S V V C L L N N F Y P R E A
 481 TTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCC
 170 K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T
 541 AAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCCAGGAGAGTGTACA
 190 E Q D S K D S T Y S L S S T L T L S K A
 601 GAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCA
 210 D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P
 661 GACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
 230 V T K S F N R G E C *
 721 GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGaggaggagaagtgcacccacctgctcctc
 781 agttccagcctgacccccctcccatcctttggcctctgacccctttttccacaggggaacta
 841 ccccatttgcggtcctccagctcatctttcacctcacccccctcctcctccttggttta
 901 attatgctaattgttgaggagaatgaataaataaagtgaatctttgcaaaaaaaaaaaaa
 961 aaaaaaa

Figur 3J. cDNAet (SEKV ID NR: 52) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 53) til Hal-1.16-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

1 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L
 1 caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactgggtgaagccctcgagacccctcctcactc
 21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
 61 acctgtgccatctccggggacagtgctctctagcaacagtgctgcttggaaactggatcagg
 41 Q S P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
 121 cagtcacccatcgagaggcccttgagtggtgggaaggacatactacaggtccaagtggat
 61 N G Y A V S V K S R M T I N P D T S K N
 181 aatgggtatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaac
 81 Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A
 241 cagttctccctgcagctgaactctgtgactcccgaggacacggctgtgtattactgtgca
 101 R E R L G E L Y G M D V W G Q G T T V T
 301 agagagaggttagggagttatagcgtatggacgtctggggccaagggaccacgggcacc
 121 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
 361 gtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagc
 141 T
 421 accta

Figur 3K. cDNAet (SEKV ID NR: 54) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 55) til Hal-1.16-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

1 Q L T Q S P D S L A V S L G E R A T I N
 1 cagctgacgcagctctccagactccctggctgtgtctctggtggcgagagggccaccatcaac
 21 C K S S Q N I L Y R S S K K N H L V W Y
 61 tgcaagtcagccagaatattttatacaggtccagcaagaagaaccacttagtttggtac
 41 Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S T R E S
 121 cagcagaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctaccgggaatcc
 61 G V P A R F S G S G S G T D F T L T I S
 181 ggggtccctgcccagttcagtgccagcgggtctgggacagatttcactctcaccatcagc
 81 T L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P P
 241 accctgcaggtgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtactcctccc
 101 T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V F
 301 accttcggccaagggacagcactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttc
 121 I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L
 361 atcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctg
 141 N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S
 421 aataacttctatcccagagagggccaaggtacagtggaaggtggataacgccctccaatcg
 161 G
 481 ggca

Figur 3L. cDNAet (SEKV ID NR: 56) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 57) til Hal-4.5-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 A Q D X X S L H R P V P H R H C L W W P
1 Ggcccaggacngngaagccttcacagacctgtccctcaccggcactgtctctggtggcc
21 I S S G G Y Y W S W I R Q H P G K G L E
61 catcagcagtggtggttattactggagctggatccgccagcaccaggggaagggcctgga
41 W I G N I Y Y S G S T Y Y N P S L K S R
121 gtggattgggaacatctattacagtgaggacacctaactacaaccgcctcaagagtcg
61 V T I S V D T S K N Q F S L K L S A V T
181 agttaccatcagtagacagctctaagaaccagttctccctgaagctgagcgtgtgac
81 A A D T A V Y Y C A R D N I T M V R G V
241 tgccgaggacacggccgtgtattactgtgcgagagataatattactatggttcggggagt
101 Y Y G M D V W G Q G T T V T V S S A S T
301 ctactacggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcaccgtctcctcagcctccac
121 K G P S V F P L A P S S K S T Y
361 caagggcccacgtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctat

```

Figur 3M. cDNAet (SEKV ID NR: 58) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 59) til Hal-4.5-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1 Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G
1 tatgcagcatccagtttgcaaagtggggtcccacaaaggttcagcggcagtggtctgga
21 T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C
61 acagacttactctcaccatcagcagcctgcagcctgaagattttgcaacttactattgt
41 Q Q A H S L P R T F G Q G T K V E I K R
121 caacagggtcacagctctccctcggcagcttcggccaagggaccaaggtggaaaatcaaacga
61 T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G
181 actgtggtgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctgga
81 T A S V V C L L N N F Y P R K A K V Q W
241 actgcctctgtgtgtgcctgctgaataacttctatcccagaaaggccaaagtacagtgg
101 K V D N T L Q
301 aaggtggataaacaccctccaa

```

Figur 3N. cDNAet (SEKV ID NR: 60) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 61) til Hal-4.40-VH. Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 Q V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
1 Caggtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggtccctgagactc
21 S C A A S G F T F S R H G V H W V R Q A
61 tcctgtgcagcgtccggattcaccttcagtcgccatggcgtgcactgggtccgccaggtc
41 P G K G L E W V A V I W Y D G S N K Y Y
121 ccaggcaaggggctggagtgggtggcagttatatggtatgatggaagtaataataactat
61 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
181 gcagactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat
81 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R G G
241 ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcgagaggagggc
101 L I A V R P G Y Y Y Y G M D V W G Q G T
301 cttatagcagttcgtccgggtactactactacggtatggacgtctggggccaagggacc
121 T V T V S S A S T K G P S V F P L A P S
361 acggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccacgtcttccccctggcaccctcc
141 S K S T
421 tccaagagcacct

```

Figur 3O. cDNAet (SEKV ID NR: 62) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 63) til Ha1-4.40-VL.
Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1 E M Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T
1 Gaaatgcagctgacccagtcctccctcctcctgtctgcatctgtaggagacagagtcacc
21 I T C R A S Q S I S S Y L N W Y Q Q K P
61 atcacttgccgggcaagtcagagcattagcagctatttaaattggtatcagcagaaacca
41 G K A P K L L I Y A A S S L Q S G V P S
121 gggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatca
61 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P
181 aggttcagtgccagtggtctgggacagatttcactctcaccatcagcagctgcaacct
81 E D F A T Y Y C Q Q S Y S T P L T F G G
241 gaagattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccccgctcactttcggcgga
101 G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P
301 gggaccaagtgagatcaaacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgcca
121 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y
361 tctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgctgctgaataacttctat
141 P R E A K V Q W K V D N A L Q S G
421 cccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaatcgggt

```

Figur 3P. cDNAet (SEKV ID NR: 64) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 65) til Ha1-4.37-VH.
Understreket er tungkjedens konstante region.

```

1 C P G A L Q E S G P G L V R P S Q T L S
1 tgtccaggtgcactgcaggagtcgggcccaggactggtgaggecttcacagaccctgtcc
21 L T C T V S G G S I S S G G T Y Y W I W
61 ctacactgcactgtctctgtggtccatcagcagtggtggtacttactactggatctgg
41 I R Q H P G K G L E W I G Y I Y Y S G S
121 atccgccagcaccaggggaagggcctggagtggttggtacatctattacagtgaggagc
61 T Y Y N P S L K S R V T I S V D T S K N
181 acctactacaaccgcctcctcaagagtcgagttaccatattcagtagacacgtcctaagaac
81 Q F S L K L S S V T A A D T A V Y Y C A
241 cagttctccctgaagctgagctctgtgactgccgcggacacggcggtgtattactgtcg
101 R D G I T M V R G I S G G M D V W G Q G
301 agagatggaattactatggttcgggggaattagcggggcatggacgtctggggccaaggg
121 T T V T V S S A S T K G P S V K G P S V
361 accacggtcaccgtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcaagggcccatcggtc
141 F
421 ttca

```

Figur 3Q. cDNAet (SEKV ID NR: 66) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 67) til Ha1-4.37-VL.
Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1 A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S H
1 Gcatctgtaggagacagagtcaccatcacttgccgggcaagtcagagcattagtagtcat
21 L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S
61 ttaaattggtatcagcagaaaccagggaaagcccctaagctcctgatctatgctgcttcc
41 S L Q S G V P S R P S G S G S G T D F T
121 agtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtgccagtggtctgggacagatttcact
61 L S I S S L Q P E D F A T Y F C Q Q S Y
181 ctctccatcagcagctgtgcaacctgaagattttgcaacttacttctgtcaacagagttac
81 S I P R T F G Q G T K V E I T R T V A A
241 agtatccctcggacgttcggccaagggaccaaggtggaaatcacacgaactgtggctgca
101 P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V
301 ccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtt
121 V C L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N
361 gtgtgctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataac

```

141 A L Q S G
421 gccctccaatcgggta

Figur 3R. cDNAet (SEKV ID NR: 68) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 69) til Ha1-1.43-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region.

1 Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L T C
1 Cagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgagaccctctcactcactgt
21 A I S G D S V S S N S A A W N W I R Q S
61 gccatctccggggacagtgctcttagcaacagtgctgcttggaactggatcaggcagtc
41 P S R G L E W L G R T Y Y R S K W Y N E
121 ccacgcagaggccttgagtggtggaaggacatactacaggtccaagtggtataatgaa
61 Y A V S V K S R M T I N P D T S K N Q F
181 tatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaaccagttc
81 S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A R E
241 tccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtattactgtgcaagagag
101 R L G E L Y G M D V W G Q G T M V T V S
301 aggttaggggagttatacgggtatggacgtctggggccaagggaccatggtcaccgtctcc
121 S A S T K G P S V F P L A P S S K S T
361 tcagctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagcacc

Figur 3S. cDNAet (SEKV ID NR: 70) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 71) til Ha1-1.43-VL.

Understreket er lettkjedens konstante region.

1 L Q V Q P E C L Y T V S D K N N F L C W
1 Ctgcaagtcagccagagtgctctttatacagtggtccgacaagaacaactcttatgttgg
21 Y Q Q K P G Q P P K L L M Y W A S I R E
61 taccagcagaaccaggacagcctcctaaactgctcatgtactgggcatctatccgggaa
41 S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I
121 tccggggctccctgaccgattcagtggtcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatc
61 S S L Q A E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P
181 agcagcctgcaggctgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagtaactct
81 P T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V
241 cccaccttcggccaagggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
101 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
301 ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctg
121 L N N F Y P R E
361 ctgaataacttctatcccagagag

Figur 3T. cDNAet (SEKV ID NR: 72) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 73) til Ha1-1.152-VH.

Understreket er tungkjedens konstante region.

1 Q V Q L Q Q S G P G L V K P S Q T L S L
1 caggtacagctgcagcagtcaggtccaggactggtgaagccctcgagaccctctcactc
21 T C A I S G D S V S S N S A A W N W I R
61 acctgtgccatctccggggacagtgctcttagcaacagtgctgcttggaactggatcagg
41 Q S P W R G L E W L G R T Y Y R S K W Y
121 cagtcctccatggagaggccttgagtggtggaaggacatactacaggtccaagtggtat
61 N E Y A V S V K S R M T I N P D T S K N
181 aatgaatatgcagtatctgtgaaaagtcgaatgaccatcaaccagacacatccaagaac
81 Q F S L Q L N S V T P E D T A V Y Y C A
241 cagttctccctgcagctgaactctgtgactcccaggacacggctgtgtattactgtgca
101 R E R L G E L Y G M D V W G Q G T T V T
301 agagagaggttaggggagttatacgggtatggacgtctggggccaagggaccacggtcacc
121 V S S A S T K G P S V F P L A P S S K S
361 gtctcctcagcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctctccaagagc
141 T
421 accta

Figur 3U. cDNAet (SEKV ID NR: 74) og aminosyresekvensen (SEKV ID NR: 75) til Ha1-1.152-VL. Understreket er lettkjedens konstante region.

```

1 M Q L T Q S P D S L A V S L G E R A T I
1 atgcagctgacncagtcctccagactccctggctgtgtctctgggagagaggccaccatc
21 N C K S S Q N V L Y R S N K K N F L V W
61 aactgcaagtccagccagaatgtttttatacaggtccaacaagaagaacttcttagtttg
41 Y Q Q K P G Q P P K L L I Y W A S I R E
121 taccagcagaaaccaggacagcctcctaagctgctcatttactgggcatctatccgggaa
61 S G V P D R F S G S G S G T D F T L T I
181 tcgggggtccctgaccgattcagtggcagcgggtctgggacagatttcactctcaccatc
81 S S L Q T E D V A V Y Y C Q Q Y Y S T P
241 agcagcctgcagactgaagatgtggcagtttattactgtcagcaatattatagttactcct
101 P T F G Q G T R L E I K R T V A A P S V
301 cccaccttcggccaaggacacgactggagattaaacgaactgtggctgcaccatctgtc
121 F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L
361 ttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgtgtgtgcctg
141 L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q
421 ctgaataacttctatccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgcctccaa
161 S G
481 tcgggta

```

Figur 4A Oppstilling av Ha1-4.117-VH til human VH4-31

Figur 4B Oppstilling av Ha1-4.117-VL til human L19

```

Hal-4.117 VL 1  --QLTQSPSSVSASVGDRVTTC  RASRGISS-WLA  WYQOKPKAKPILLY  TASSLQS  GVFRFSQSQSQTQFTLTISLSQ  77
(L19/JK1)

L19 1  DI.M..... .Q..... A..... 79
L19

Hal-4.117 VL 78  PEDPATYYC  QQAY SFF  RTFGQCTAVEIK  RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(L19/JK1)

L19 80  .....N .....

```

Figur 4C Oppstilling av Ha1-4.120-VH til human VH4-31

```

<-----FWR1-----> <--CDR1> <-----FWR2-----> <-----CDR2-----> <----
Ha1-4.120 VH 12 QVQLQESGPGLVKPQSTLSLTCTVSGSGSIS SCGYTWS WIRQHPQKGLSWI-G YIY---YSG-S-T-Y--YNPSLKS RVTI 82
(VH4-31/D3-10/JH6)
VH4-31 1 ..... 71
<-----FWR3-----> <-----CDR3-----> <konstant region>
Ha1-4.120 VH 83 SVDTSEKQPSLKLSVTAADTAIVYCAR DRITMRCQIPSGMDV WCQGTITVTVSS ASTKGPSVKGPSVF
(VH4-31/D3-10/JH6)
VH4-31 72 .....

```

Figur 4D Oppstilling av Ha1-4.120-VL til human O2

```

<-----FWR1-----> <--CDR1--> <-----FWR2-----> <--CDR2> <-----FWR3----->
Ha1-4.120 VL 4 .....TC RASQSTN-VLN WYQKGEAPKLLIH VASSLOS QVPSFSGSGSGORDPTLTSSIQ 61
(O2/JK1)
O2 1 DIQWTQSPSSLSASVGRVTI .....SS-.....K.....Y A.....T..... 79
<-----> <--CDR3> <konstant region>
Ha1-4.120 VL 62 PEDPATYTC QQSHSIP RFGQGTAVEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(O2/JK1)
O2 80 .....Y.T.

```

Figur 4E Oppstilling av Ha1-5.99-VH til human VH4-34

```

<-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
Ha1-5.99 VH 1 QVHLQOMAGLLKPSSETLSLTCAYVGGSPS --Q--Y-Y--N--S WIRPPGKLEWIG EIN---HS-Q-S--T-S-YKPS 62
(VH4-34/D4-17/JH4)
VH4-34 1 .Q.....-N-.N.. 62

--> <-----FWR3-----> <-----CDR3-----> <konstant region>
Ha1-5.99 VH 63 LKS KVTTSVDTSKNQPSLKLSYTAADTAIVYCAR DRGDYCDLFDY NGQOTLTVSS ASTKGPSVUKGPSVF
(VH4-34/D4-17/JH4)
VH4-34 63 .Y.....S..... 63

```

Figur 4F Oppstilling av Ha1-5.99-VL til human A27

```

<-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2-----> <-----FWR
Ha1-5.99 VL 1 -----SPGERATLSC RASQSI-----GSTYLA WYQKPGQAPRLLIY GASSRAT GIPERFSGSGGTDTLT 62
(A27/JK1)
A27 1 EIVLTQSPGTLSL.....V-----S.S.....D..... 75

3-----> <CDR3--> <konstant region>
Ha1-5.99 VL 63 ISGLEPEDFAVFC QCGSSPP TFGQTKVEIK RTVAAPSVFIFPPSDQ
(A27/JK1)
A27 76 .R.....Y..Y----- 76

```

Figur 4G Oppstilling av Hal-4.121-VH til human VH4-34

```

<-----FWR1-----> <---CR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
Hal-4.121 VH 14 QVQLQOMGAGLKPSETSLACAVYQSFS --G-N--Y--W--S WIROPFGKLEWIG EI--N---HS-G-S--T-N-Y 72
(VH4-34/D1-26/JH4)
VH4-34 1 .....Y----- 59

<-----FWR3-----> <---CDR3---> <konstant region>
Hal-4.121 VH 73 N-PSLAS RTTISVDTSKNQPSLKLSVTAADTAVYCAR QGSYNYFDY WQOGLTVTVSS ASTKGPSVKGPSVT
(VH4-34/D1-26/JH4)
VH4-34 60 ..... 59

```

Figur 4H Oppstilling av Hal-4.121-c.5-VL til human O8

```

<-----FWR1-----> <---CDR1--> <-----FWR2-----> <---CDR2---> <-----FWR3----->
Hal-4.121c5 VL 21 DIQNTQSPSLASVQDRVTTC QASQDISN-YLN WYQSPKAPKAPFLIS DAEMLAT GVPSRPSGSGSGTQFTISSLQ 101
(O8/JK3)
O8 1 .....K.....L..Y.....E.....T..... 79

<-----FWR3-----> <---CDR3---> <konstant region>
Hal-4.121c5 VL 102 PEDIAITYCC QQYDSLP FTQFGTKVDIK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(O8/JK3)
O8 80 .....Y.....N..... 80

```

Figur 4I Oppstilling av Hal-4.121-c.26-VL til human A3

```

<-----FWR1-----> <---CDR1-----> <-----FWR2-----> <---CDR2---> <-----FW
Hal-4.121c26 VL 21 DIVMTQSPSLSPVTFGEPAISIC RSSQSLHS-N-QYNYLV WYLOKPGQSPQLLIY LGSINAS GVPDRPSGSGSGTQFTL 98
(A3/JK6)
A3 1 .....D.....N..... 78

<-----FWR3-----> <---CDR3---> <konstant region>
Hal-4.121c26 VL 99 KISRVEADGVVYC WQPLQTF ITFGQGRLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(A3/JK6)

```

A3 79 A.....

Figur 4J Oppstilling av Ha1-1.16-VH til human VH6-1

```

<-----FWR1-----> <-CDR1-> <-----FWR2-----> <-----CDR2----->
Ha1-1.16 VH 1 QVQLQQSGPGLVKPSTLSLTCAISDSVS SNAAN-N WIRQSPSRGLENL-----G R-TYTRSKMY-NG-----YAVS 66
(VH6-1/D3-10/JH6)
VH6-1 1 .....D----- 66

--> <-----FWR3-----> <-----CDR3----->
Ha1-1.16 VH 67 VKS RMTINPTSKQPSLQNSVTPEDTAVYCAR ERLGELYGNDV WGQGTIVT 120
(VH6-1/D3-10/JH6)
VH6-1 67 ..... 101

```

Figur 4K Oppstilling av Ha1-1.16-VL til human B3

```

-----FWR1-----> <-----CDR1-----> <-----FWR2-----> <-----CDR2-----> <-----FWR3----->
Ha1-1.16 VL 1 QL/QSPDSDSLAVSIGLERATINC KSSNILYRSEKKHVLV WYQKPGQPPKLLIY WASTRES GVPARFSGSGSGTDFTLTIS 80
(B3/JK5)
B3 4 -M.....SV..S.NN..Y.A .....D..... 82

-----> <-CDR3->
Ha1-1.16 VL 81 TLQAEDEVAVYC QYYSTPP TFGQGTREIK RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(B3/JK5)
B3 83 S.....

```

	<-----FWR1----->	<CDR1->	<-----FWR2----->	<-----CDR2----->	<-->
HA1-4.37 VH 5	---LQSGPOLVPSQTLNLTCTVSQGIS	SGQTYWI	-WTRHPQNGLEWIG	YIY---YSQ-S-T-Y--YNPSLKS	RVT 72
(VH4-31/D3-10/JH6)					
VH4-31	1 QVQ	S			70

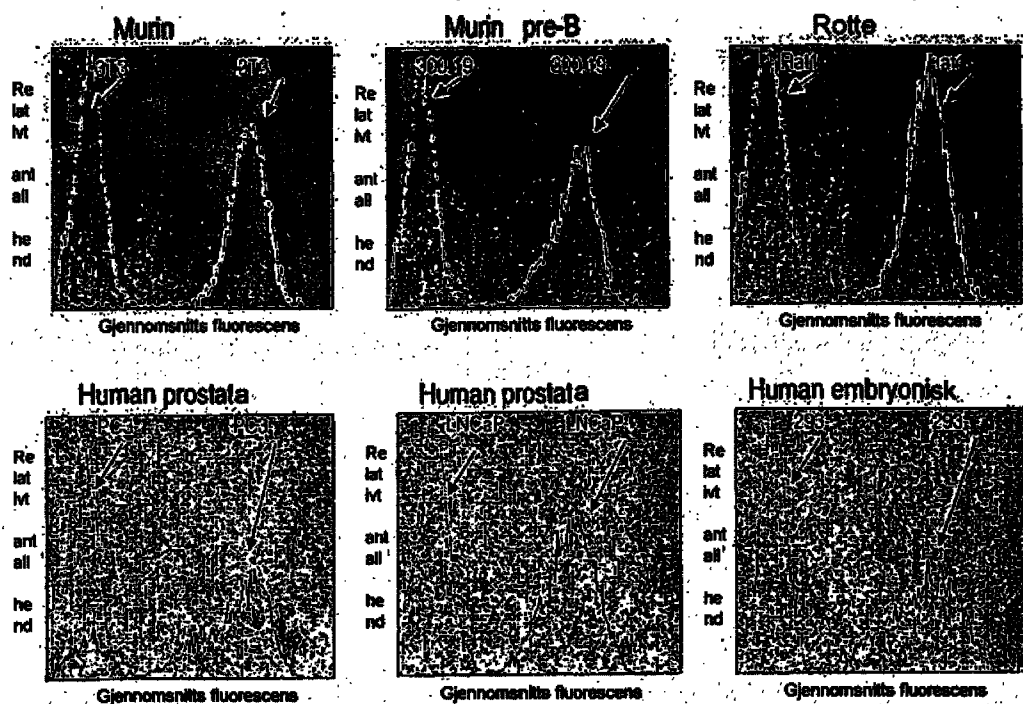
	-----FWR3-----	<-----CDR3----->	<constant region>
Ha1-4-37 VH 73	ISVDTSKQFSLKLSVVAADTAVVYCAR	DGITWROISQMDV WGQCTVTIVSS	ASTKGPSVKGPSVF
(VH4-31/D3-10/JH6)			
VH4-31 71			

	<-----FWR1----->	<----CDR1---->	<-----FWR2----->	<---CDR2---	<-----FWR3-----		
Ha1-4.37 VL	1	ASVDNRVITC	RASQISS-HLW	WYQKPKAKLLLY	AASSLOS	GVPNFGSGSGDTLSISLQ	67
(O2/JKL1)							
O2	1	DIDMTSPSSLS	-Y-				79

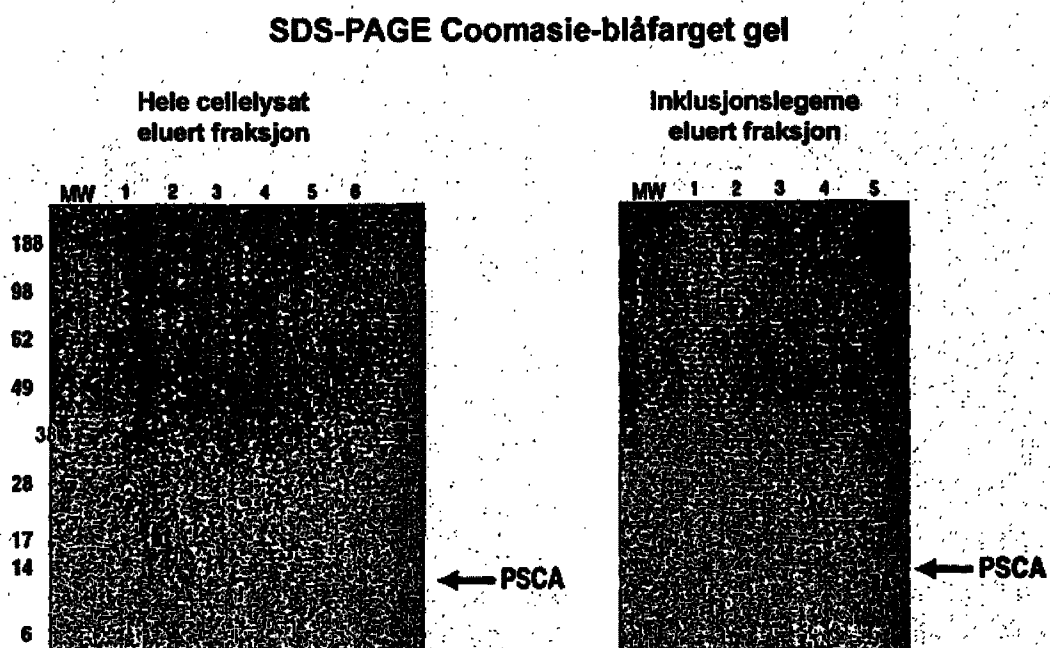
```

Hal-4.37 VL 68 PEDATYFC QQ--SYSIP RTFGQTKVEIT RTVAAPSVFIFPPSDEQ
(O2/JK1)
O2 80 .....Y.....T.....
<CDR3>
<konstant region>

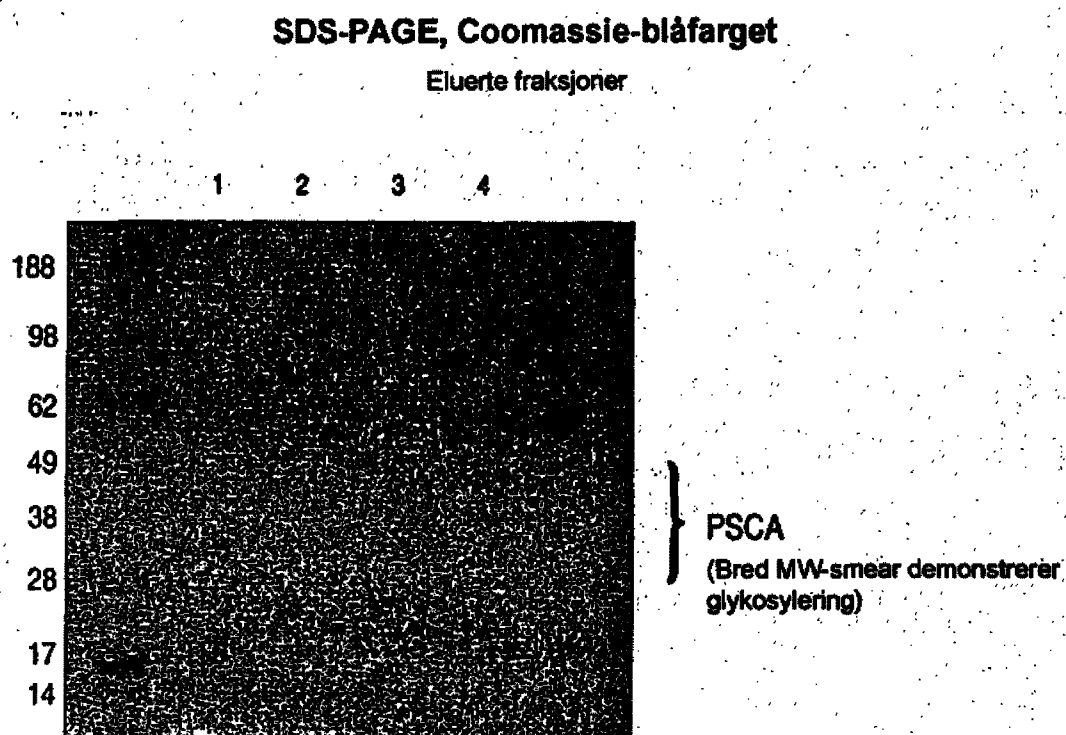
```



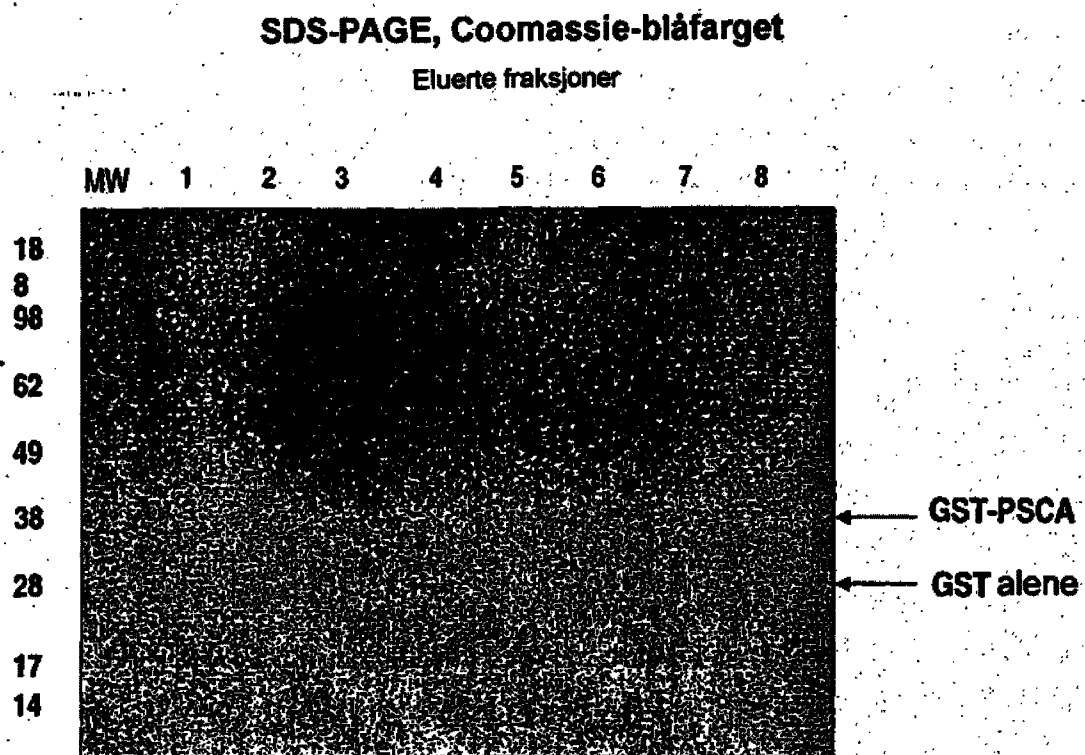
Figur 5
Ekspresjon av PSCA i rekombinant murine, rotte og humane celler



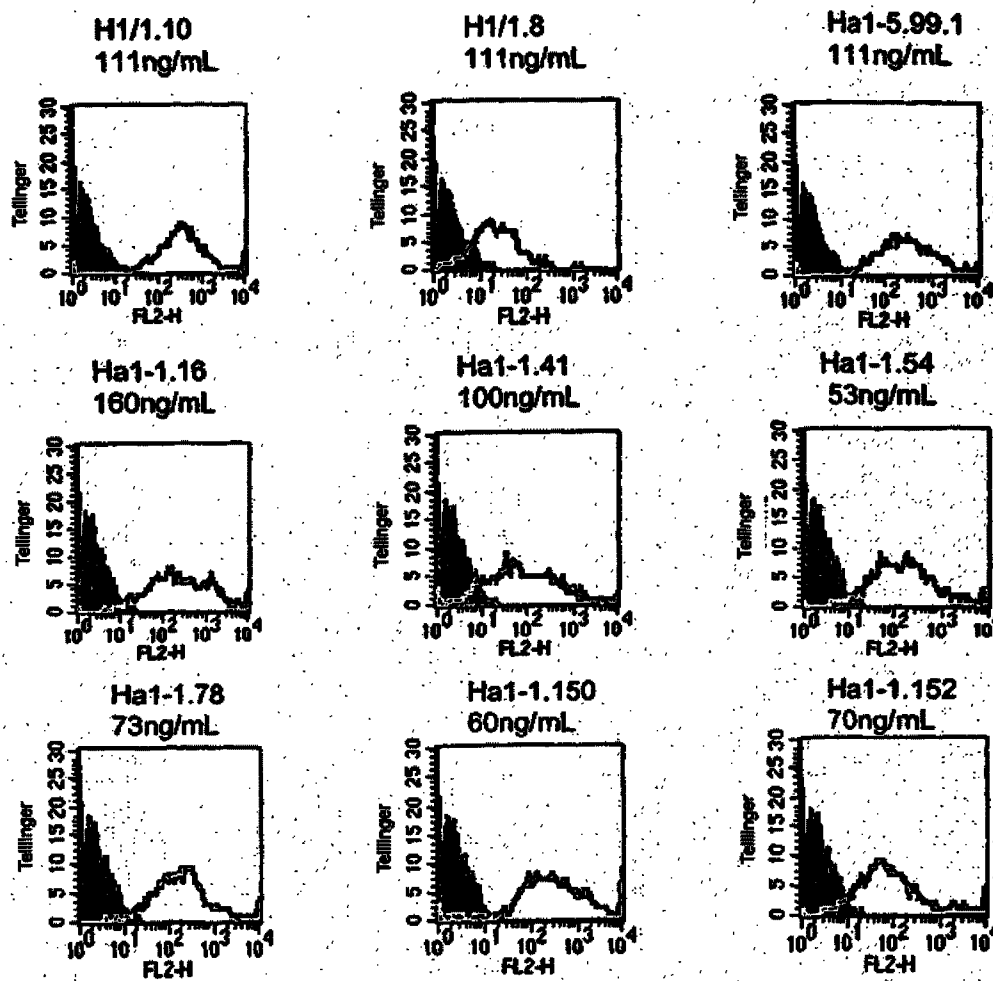
Figur 6
Rensning av PSCA *E. coli*
(pET-21b-vektor som koder for aminosyrer 21-94)



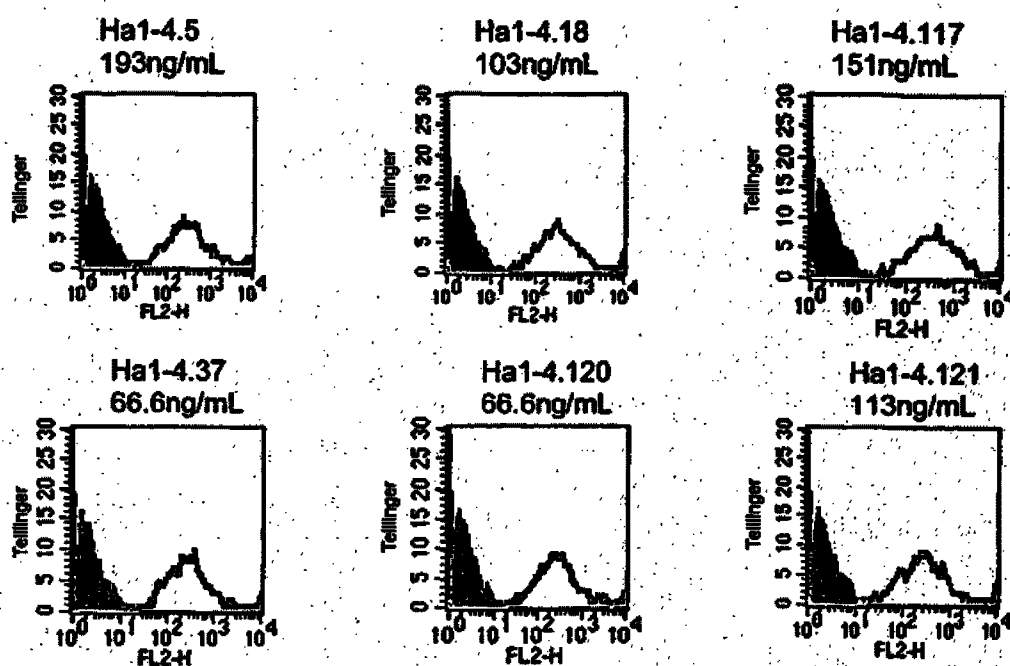
Figur 7
Rensning av rekombinant glykosylert PSCA
uttrykt fra 293T-celler



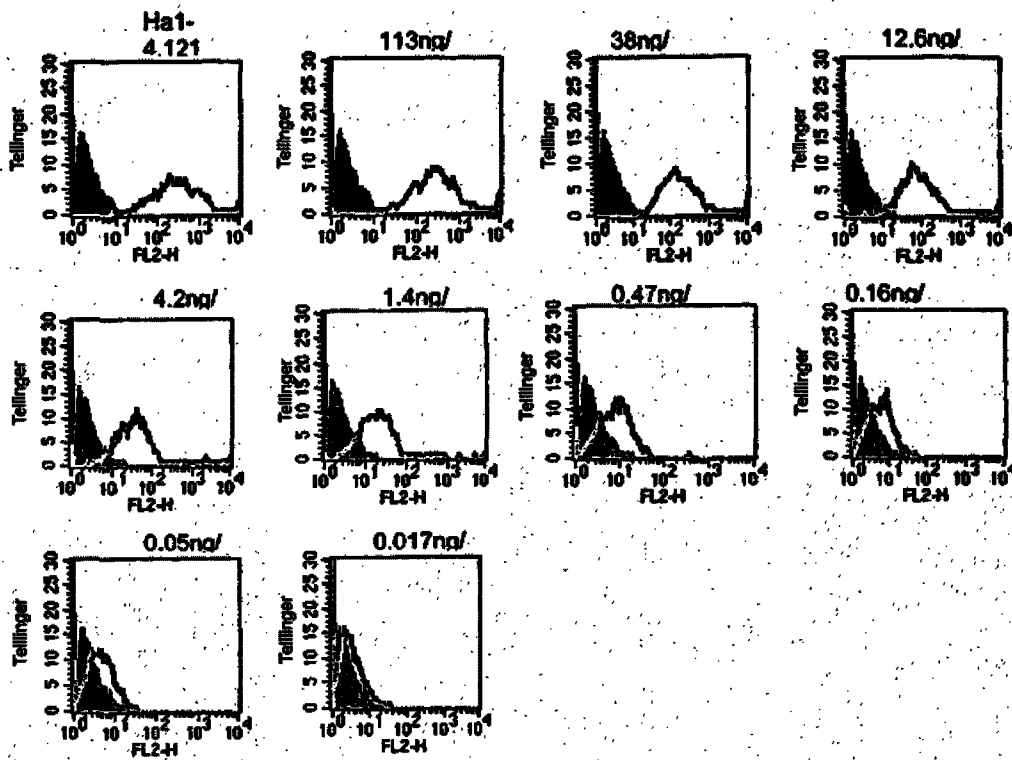
Figur 8
Rensning av GST-PSCA fra *E. coli*
(aminosyrer 18-98)



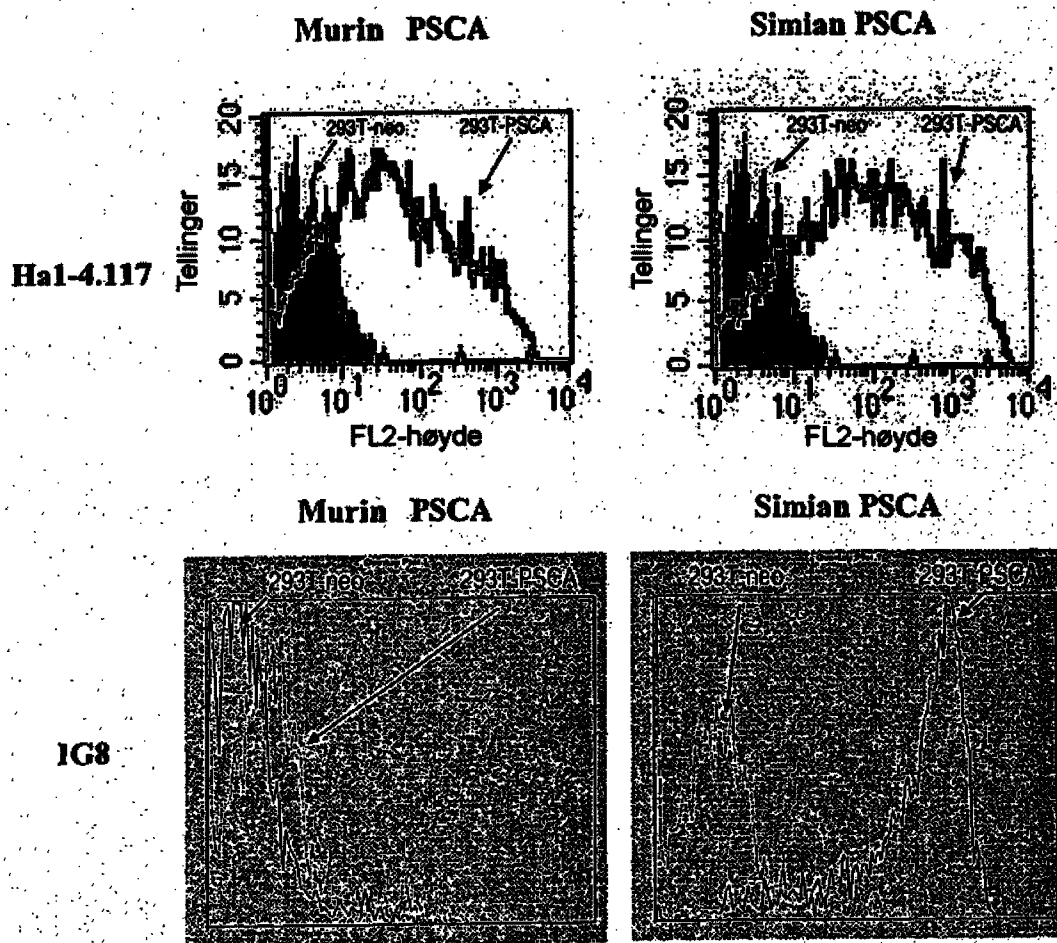
Figur 9A
FACS-analyse av PSCA-antistoffer
(LAPC9AD)



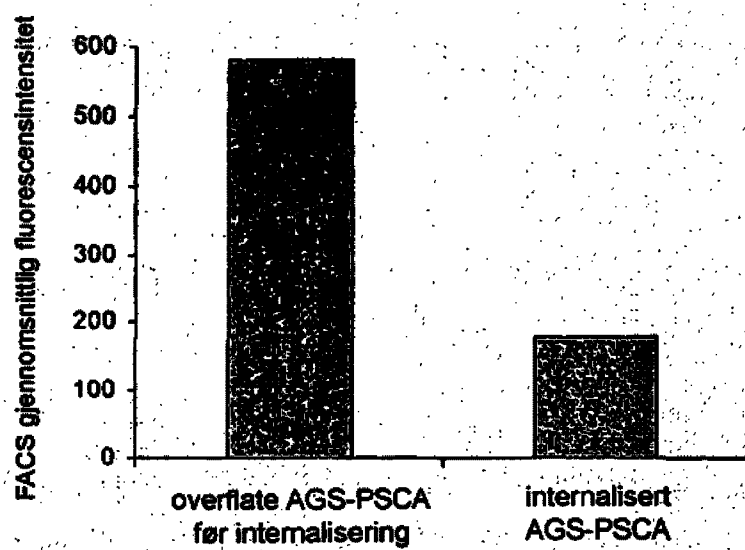
Figur 9B
FACS-analyse av PSCA-antistoffer
(LAPC9AD)



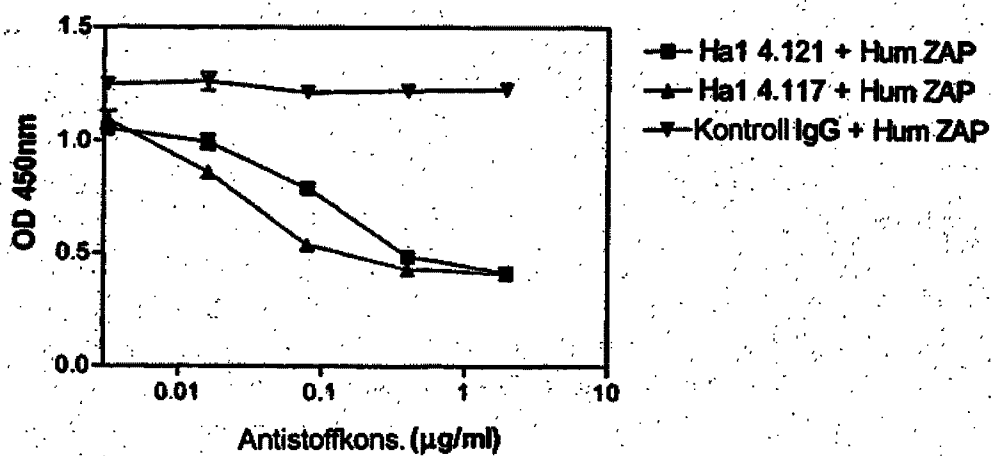
Figur 10
Affinitetsanalyse av PSCA-mAb-4.121 ved FACS



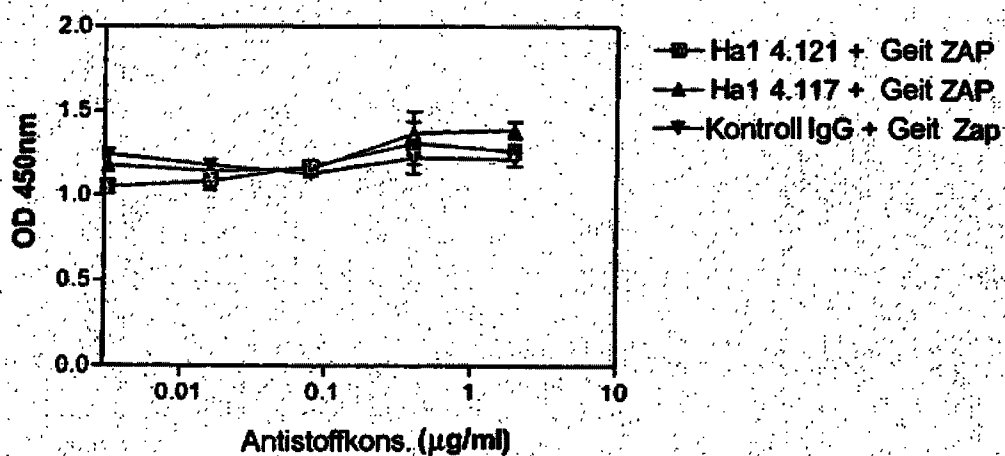
Figur 11
Ekspresjon av murin- og simian-PSCA i 293T-celler:
gjenkjennelse ved antihumane PSCA-Mabs



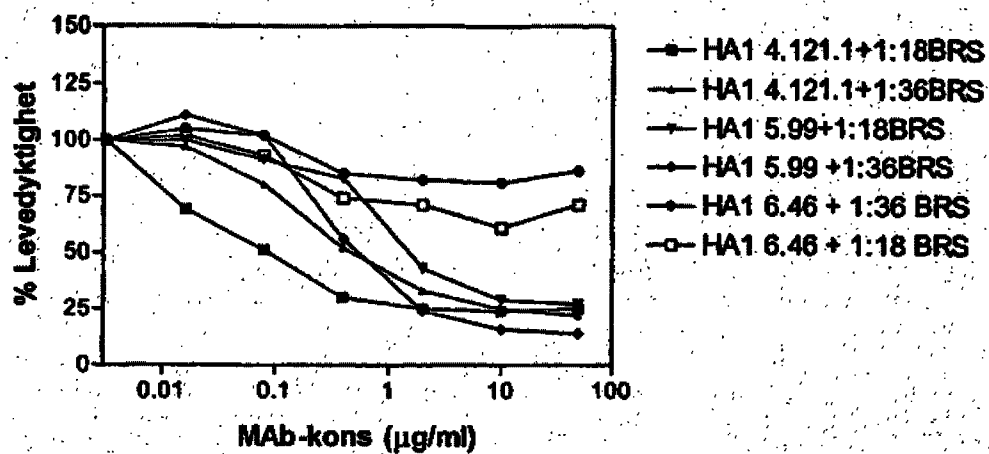
Figur 12
PSCA-4.121 internalisering i PC3-PSCA-celler
etter 2 timers innkubering ved 37°C



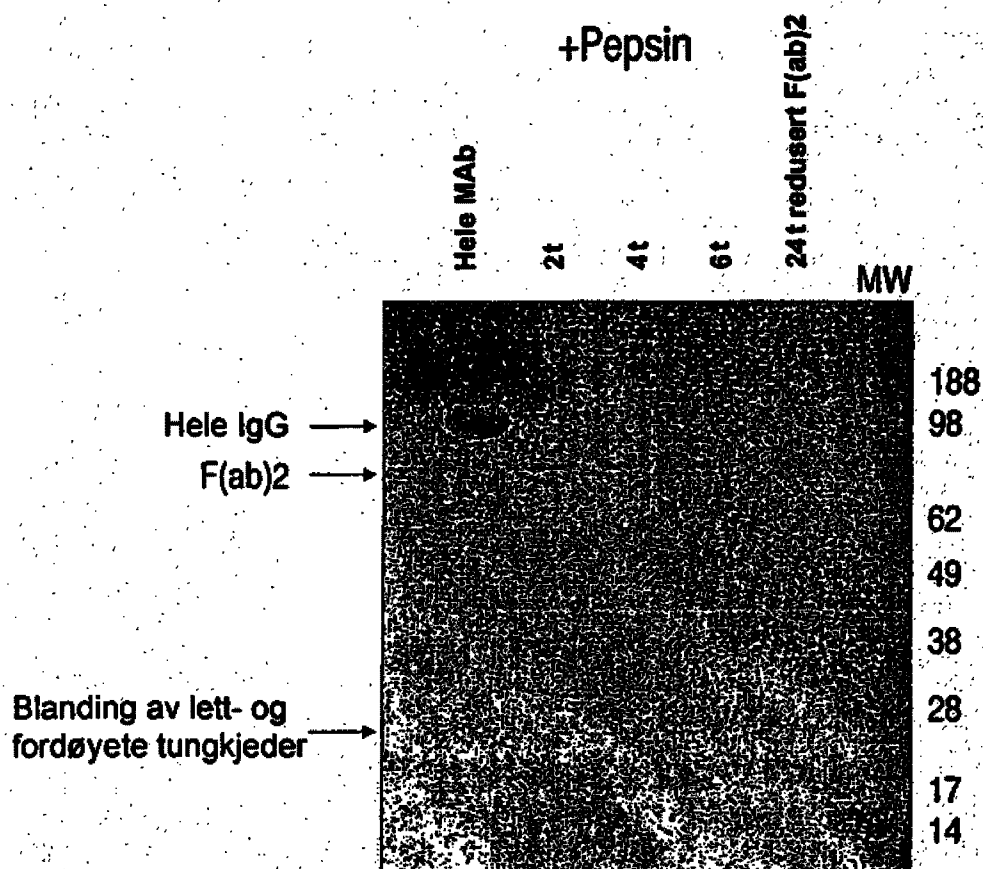
Figur 13A
Antistoffer mot PSCA-mediert saporinavhengig drap
i PSCA-uttrykkende celler



Figur 13A
Antistoffer mot PSCA-mediert saporinavhengig drap
i PSCA-uttrykkende celler

**Figur 14**

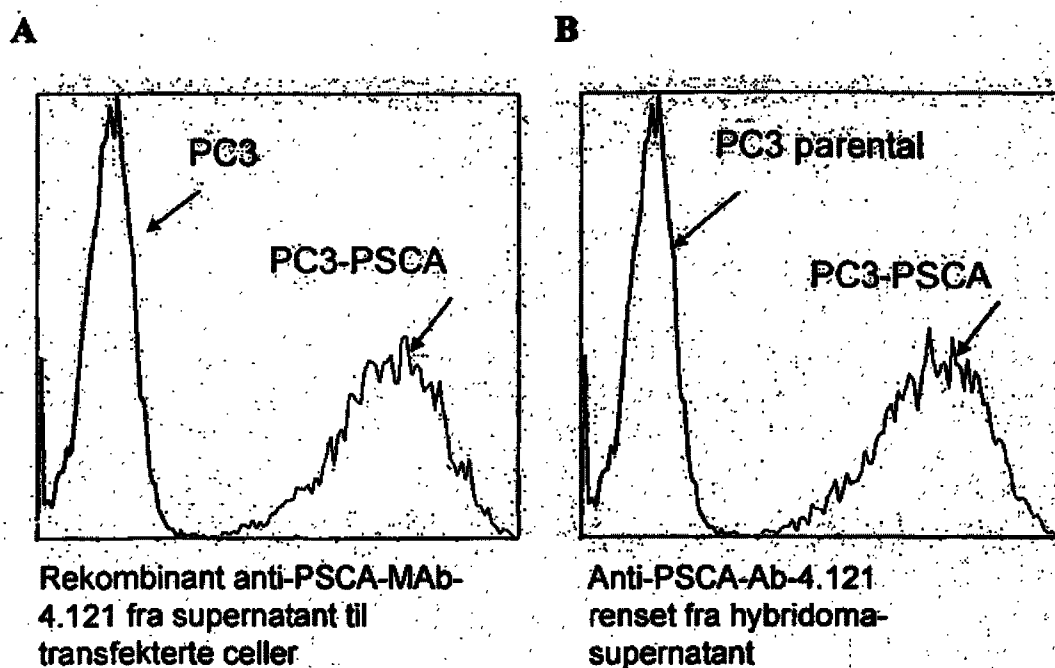
**Babykanin komplementmediert cytotoxicitet i B300.19-PSCA
(100.000 celler/brønn)**



Dannelse av F(ab')₂-fragmenter av mAb-Ha1-4.121 ved pepsinfordøyelse.

20 mg av MAb-Ha1-4.121 i 20 mM natriumacetatbuffer pH 4,5 ble innkubert med og uten immobilisert pepsin (Pierce, Rockford IL) i de angitte tidene. Intakt MAb og fordøyete Fc-fragmenter ble fjernet ved protein-A-kromatografi. Vist er en SDS-PAGE Coomassie-farget gel av intakt ufordøyet uredusert MAb, ureduserte aliquoter av fordøyet materiale tatt ved de angitte tidene og en redusert prøve av det endelige fordøyete F(ab')₂-produktet.

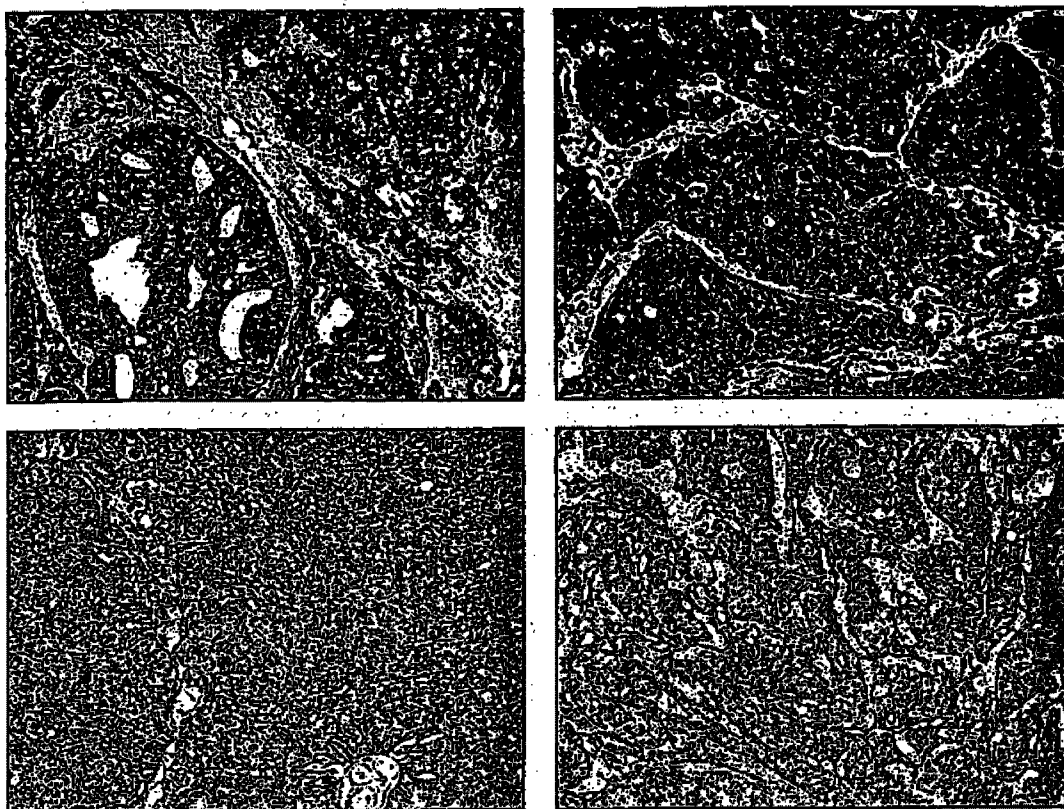
Figur 15
Dannelse av F(ab')₂-fragmenter av mAb-Ha1-4.121
ved pepsinfordøyelse



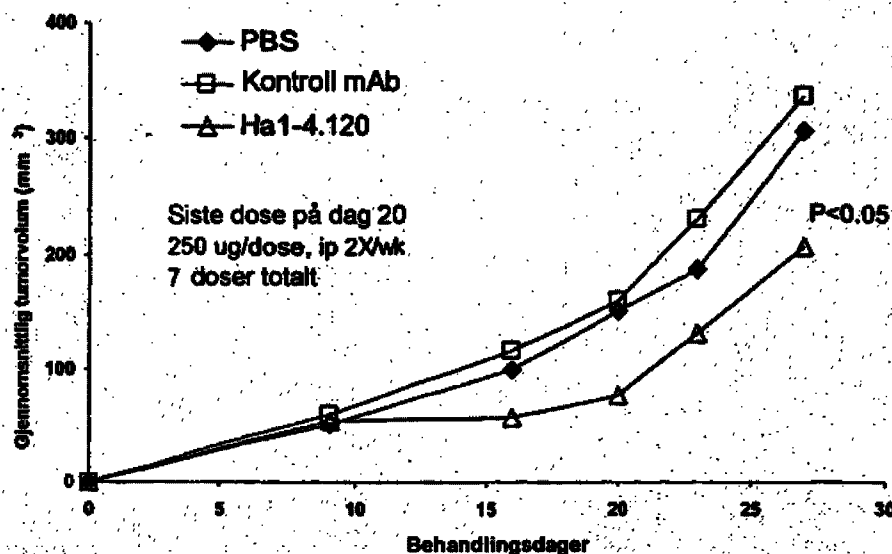
(A) 293T-celler ble transfektert med ekspresjonskonstruksjoner som koder for tung- og lettkjedene til anti-PSCA humant mAb. Supernatant ble oppsamlet etter 48 timer og undersøkt for binding til PSCA.

(B) Anti-PSCA humant mAb ble renset fra hybridom supernatant og anvendt for PSCA-bindingsforsøk. PSCA-binding ble testet som følger. PC3-parentale eller PC3-PSCA-celler ble innkubert med de anti-PSCA humane mAbs beskrevet ovenfor i 30 minutter på is. Cellene ble vasket og innkubert med PE-konjugert antihuman Ig i 30 minutter på is. Cellene ble vasket og deretter undersøkt ved flowcytometri.

Figur 16
Binding av rekombinant anti-PSCA humant mAb til PSCA ved flowcytometri



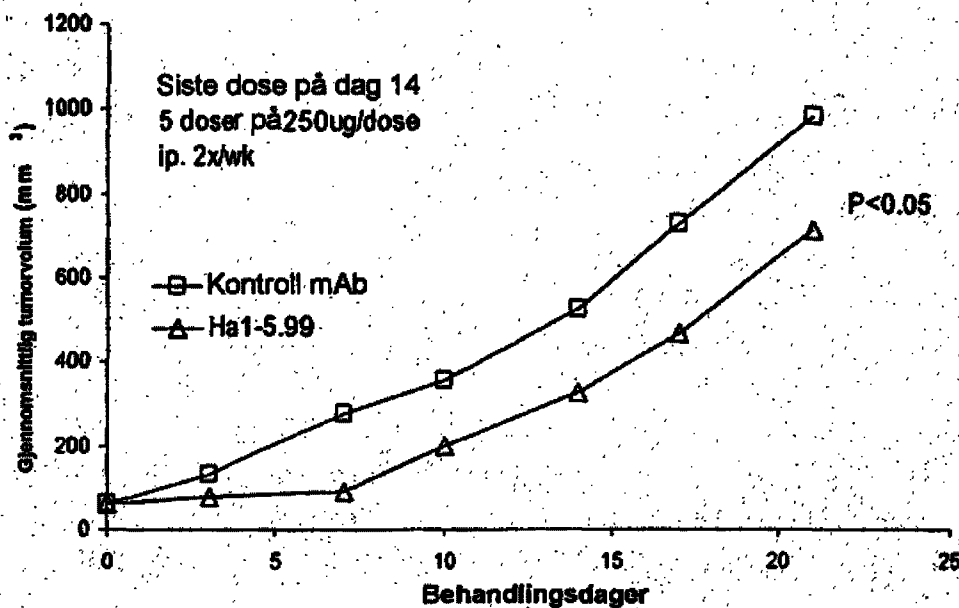
Figur 17
Deteksjon av PSCA-protein ved immunohistokjemi i ulike
kreftpasientprøver



Materialer og fremgangsmåter: LAPC-9AI-tumorceller (2.0×10^6 celler) ble injisert subkutant i mannlige SCID-mus. Musene ble randomisert i grupper ($n=10$ i hver gruppe) og behandling innledet intraperitonealt (i.p.) på dag 0 med HA1-4.120 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 7 doser inntil undersøkelsesdag 28. Tumorkvost ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmålinger hver 3 til 4 dag som angitt.

Konklusjoner: Humant anti-PSCA monoklonalt antistoff Ha1-4.120 hemmet signifikant veksten av humane prostatakraft-xenografts implantert subkutant i SCID-mus ($p < 0.05$).

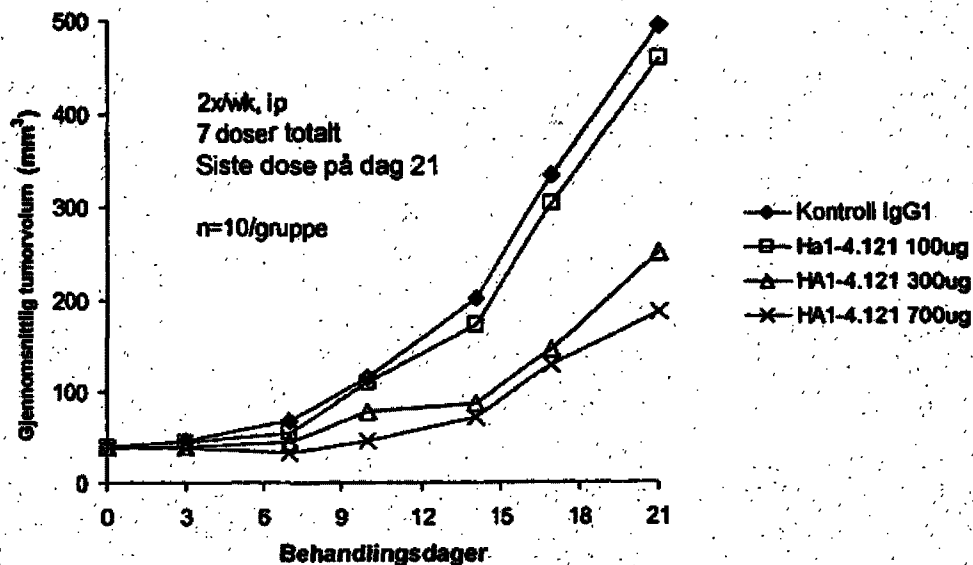
Figur 18
PSCA-MAb-Ha1-4.120 hemmer veksten av subkutane
prostatakraft-xenografts



Materialer og fremgangsmåter: LAPC-9AI-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutant i mannlige SCID-mus. Når tumorvolum nådde 50 mm³ ble musene randomisert i grupper (n=10 i hver gruppe) og behandling innledet intraperitonealt (i.p.) med HA1-5.99.1 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 5 doser inntil undersøkelsesdag 14. Tumorvekst ble overvåket ved anvendelse av skyvelmålinger hver 3 til 4 dag som angitt.

Konklusjoner: Fullstendig humant anti-PSCA monoklonalt antistoff Ha1-5.99 hemmet signifikant veksten av etablerte androgenuavhengige humane prostatakraft-xenografter implantert subkutant i SCID-mus ($p<0,05$).

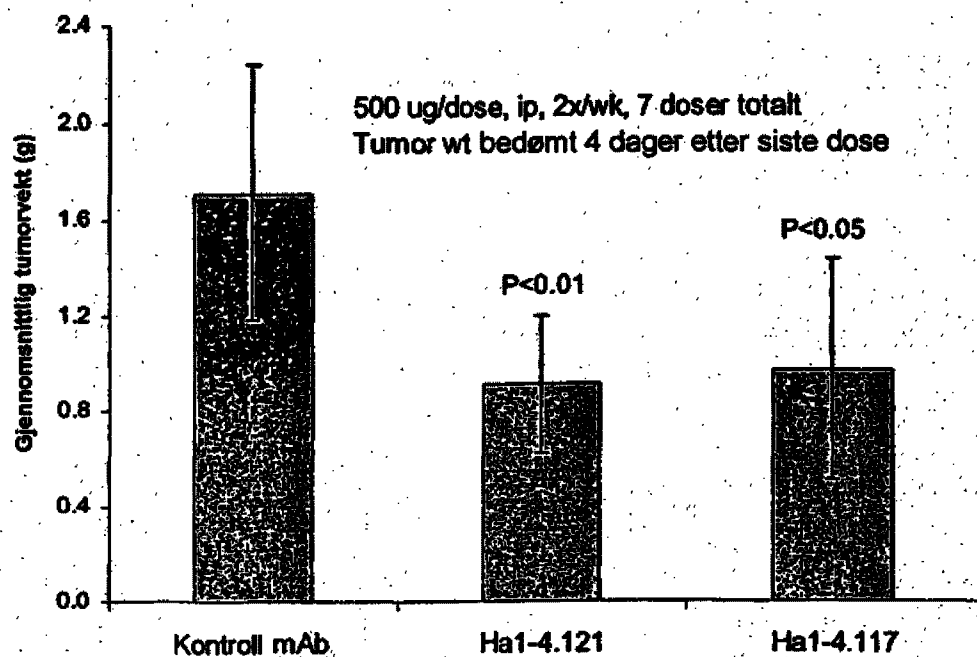
Figur 19
PSCA-mAb-Ha1-5.99 hemmer veksten av etablerte prostatakraft-xenografter i SCID-mus



Materialer og fremgangsmåter: LAPC-9AD-tumorceller ($2,5 \times 10^6$ celler) ble injisert subkutant i mannlige SCID-mus. Når tumorkvolumet nådde 40 mm³ ble musene randomisert i grupper (n=10 i hver gruppe) og behandling ble innledet intraperitonealt (i.p.) med økende konsentrasjoner av HA1-4.121 eller isotype-MAb-kontroll som angitt. Dyr ble behandlet to ganger ukentlig med totalt 7 doser inntil undersøkelsesdag 21. Tumorkvost ble overvåket ved anvendelse av skyvelærmmålinger hver 3 til 4 dag som angitt.

Konklusjoner: Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerte at HA1-4.121 hemmet veksten av etablerte subkutane humane androgenavhengige prostata-xenograft i SCID-mus. Resultatene ble statistisk signifikante for 300 ug dosegruppen på dager 14, 17 og 21 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-test, tosidig med $\alpha=0,05$) og for 700 ug dosegruppen på dager 10, 14, 17 og 21 ($p < 0,05$, Kruskal-Wallis-test, tosidig med $\alpha=0,05$).

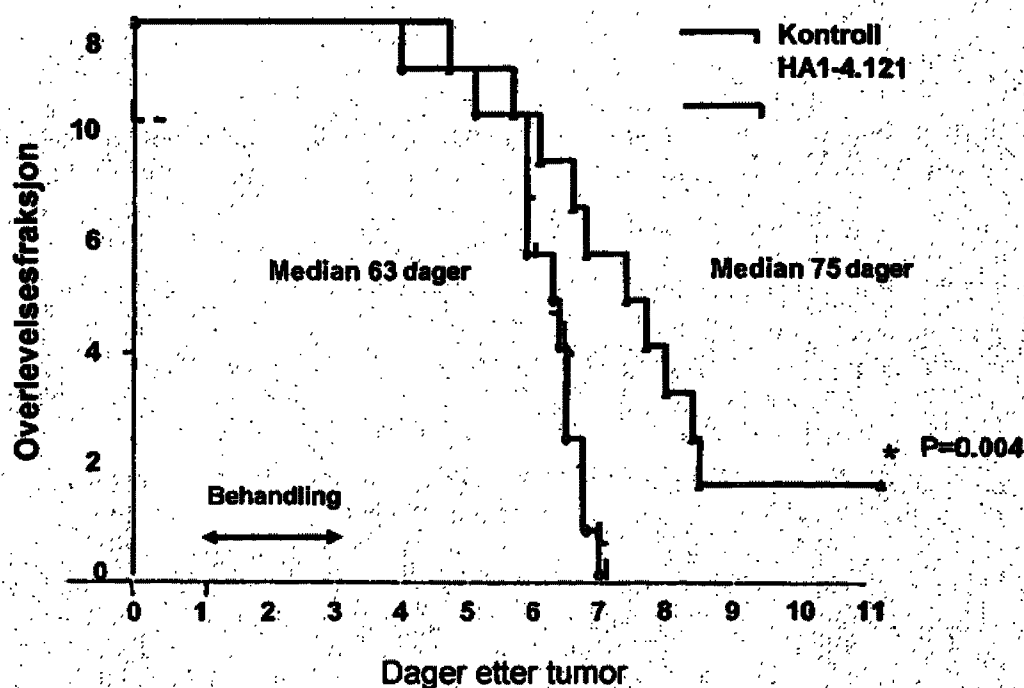
Figur 20
PSCA-mAb-HA1-4.121 hemmer veksten av etablerte androgenavhengige humane prostatakraft-xenograft



Materialer og fremgangsmåter: Pasientavledete, androgenavhengige LAPC-9AD-tumorer (2,0 x 10⁶ celler) ble injisert i de dorsale lappene av prostataer til mannlige SCID-mus. Tumorene fikk vokse i omtrent 10 dager på hvilken tid musene ble randomisert i grupper. Behandling med human 500 ug av HA1-4.117, HA1-4.121 eller isotypekontroll-MAb ble innledet 10 dager etter tumorimplantasjon. Antistoffer ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 7 doser. Fire dager etter siste dosen ble dyr avlivet og primærtumorer skåret ut og veid.

Konklusjoner: Humane anti-PSCA monoklonale antistoffer Ha1-4.121 (p < 0,01) og Ha1-4.117 (p < 0,05) hemmet signifikant veksten av LAPC-9AD-prostatakraft-xenografts ortotopisk implantert i SCID-mus.

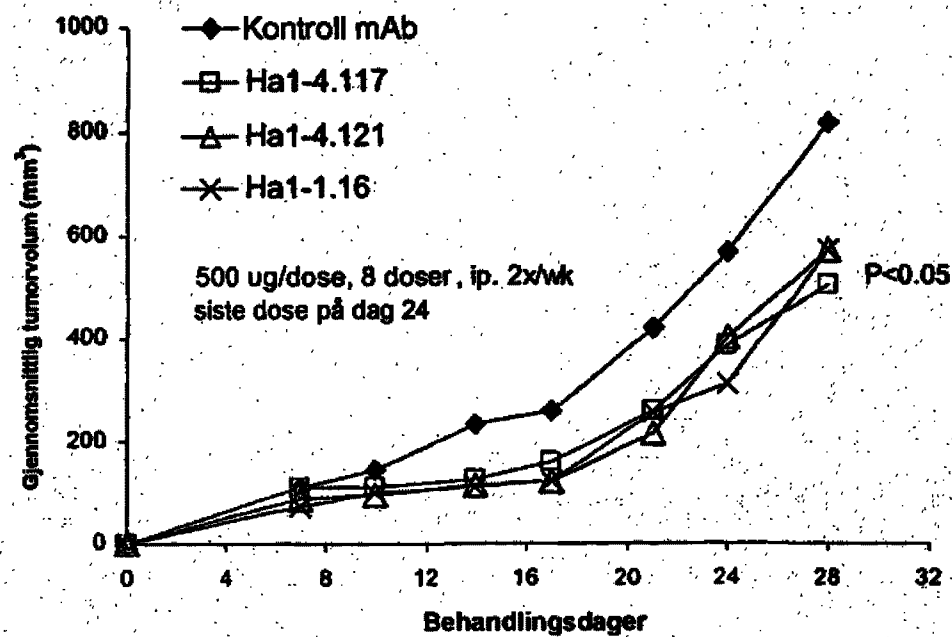
Figur 21
PSCA-MAbs Ha1-4.121 og Ha1-4.117 hemmer veksten av etablerte ortotopiske humane prostatakraft-xenografts



Materialer og fremgangsmåter: Pasientavledete, androgenavhengige LAPC-9AD-tumorceller ($2,0 \times 10^6$ celler) ble injisert i de dorsale lappene av prostataer til mannlige SCID-mus. Tumorene fikk vokse i omtrent 9 dager på hvilken tid musene ble randomisert i grupper. Dyrene randomisert i overlevelsesgruppene omfatter 11 mus i isotype-MAb-kontrollen og 12 mus i den HA1-4.121-behandlede gruppen. Dyr ble behandlet i.p. med 1000 ug Ha1-4.121 eller 1000 ug av isotype-MAb-kontroll to ganger ukentlig med totalt 9 doser.

Konklusjoner: Resultatene demonstrerte at HA1-4.121 signifikant (log-rank test: $p < 0,01$) forlenget overlevelsen av SCID-mus med humane androgenavhengige prostatatumorer. To mus i den HA1-4.121-behandlede gruppen forble frie for åpenbare tumorer 110 dager etter siste behandling.

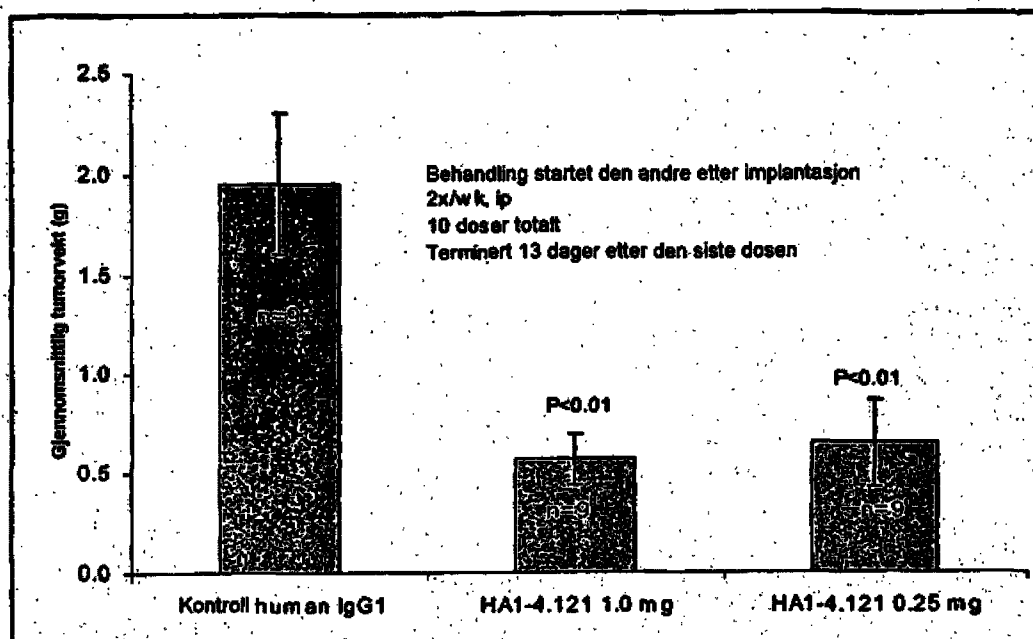
Figur 22
HA1-4.121 forlenger overlevelsen av SCID-mus med etablerte ortotopiske humane androgenavhengige prostatatumorer



Materialer og fremgangsmåter: Humane pankreatiske kreftceller (2×10^6 / mus) ble injisert subkutan i immundefekte ICR-SCID-mus (Taconic Farm, Germantown, NY). Musene ble randomisert i grupper ($n=10$ dyr/gruppe) og behandling med det angitte humane PSCA monoklonale antistoffet innledet samme dag. Antistoffer (500 mg/mus) ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 8 doser.

Konklusjoner: Resultatene demonstrerte at humane anti-PSCA monoklonale antistoffer Ha1-4.121, Ha1-4.117 og Ha1-1.16 signifikant hemmet veksten av humane pankreatiske kreft-xenograft subkutan implantert i SCID-mus. Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av en t-test (tosidig, $\alpha=0,05$).

Figur 24
Humane PSCA-MAbs hemmer veksten
av pankreatisk kreft-xenograft i SCID-mus



Materialer og fremgangsmåter: HPAC-celler ($3,0 \times 10^6$ celler) ble implantert ortotopisk inn i pankreasøyen til SCID-mus. Mus ble tilfeldig utpekt til tre grupper ($n=9$ i hver gruppe) som angitt. Behandling med HA1-4.121 (250 ug eller 1000 ug) eller isotype-MAb-kontroll (1000 ug) ble innledet på implantasjonsdagen. Antistoffer ble administrert i.p. to ganger ukentlig med totalt 10 doser. Tretten dager etter den siste dosen ble dyr avlivet og primærtumorer skåret ut og veid.

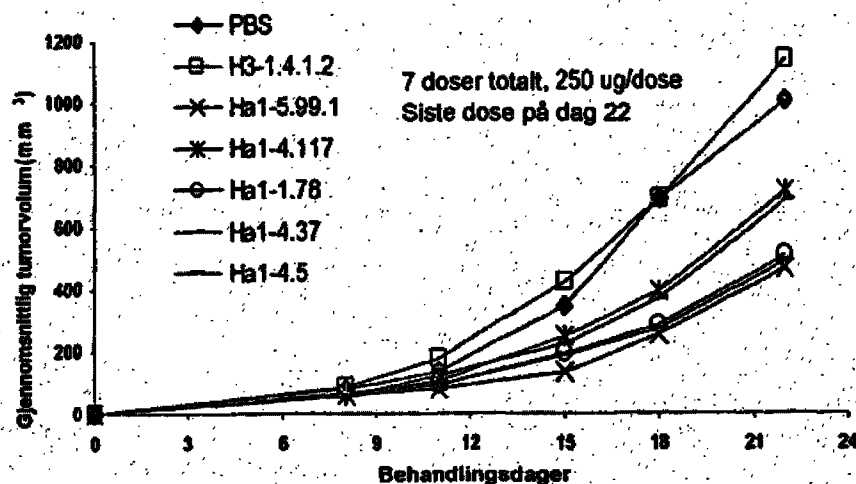
Konklusjoner: Resultatene fra denne undersøkelsen demonstrerte at HA1-4.121 signifikant hemmet den ortotopiske veksten av humane pankreatisk kreft-xenografter i SCID-mus ved begge undersøkte dosenivåer. Behandling med 250 ug og 1000 ug AGS-PSCA hemmet tumorvekst med henholdsvis 66% og 70% (Kruskal-Wallis/Tukey-test henholdsvis: $p<0,01$ og $p<0,01$).

Figur 25
HA1-4.121 hemmer veksten av pankreatiske tumorer implantert ortotopisk i SCID-mus

Oppsummering av metastaser

Gruppe	Innsidens for metastaser ved mikroskopisk bestemmelse				Innsidens for metastaser og invasjon ved grov bestemmelse	
	Lunge	p-verdi*	LN	p-verdi*	Alle steder**	p-verdi*
H3-1.4.1.2	5/8	-	7/9	-	8/9	-
HA1-4.121 1.0 mg	1/9	0,0498	1/9	0,0152	2/9	0,0152
HA1-4.121 0.25 mg	2/9	0,1534	1/9	0,0152	2/9	0,0152
LN=lymfeknute						
* Behandlet vs kontroll ved Fischers eksakte testen						
** Steder for invasjon omfattende den abdominale veggen, kolonen, milten, nyren, bukspyttkjertelen, retroperitoneum, etc.						
Steder for metastase omfattende lymfeknuter.						

Figur 26
PSCA-mAb-HA1-4.121 hemmer metastaser



Materialer og fremgangsmåter: Humane SW780-blærekreftceller (2×10^6 /mus) ble injisert subkutan i immundefekte ICR-SCID-mus (Taconic Farm, Germantown, NY). Musene ble randomisert i grupper ($n=10$ dyr/gruppe) og behandling med det angitte humane PSCA-MAb innledet samme dag. Antistoffer (250 mg/mus) ble levert intraperitonealt to ganger ukentlig med totalt 7 doser.

Konklusjoner: Resultatene demonstrerte at HA1-4.117 ($p=0,014$), HA1-4.37 ($p=0,0056$), HA1-1.78 ($p=0,001$), Ha1-5.99 ($p=0,0002$) og HA1-4.5 ($p=0,0008$) signifikant hemmet veksten av SW780-blæretumorer implantert subkutan i SCID-mus. Statistiske analyser ble utført ved anvendelse av en t-test (tosidig, $\alpha=0,05$).

Figur 27
Humane PSCA-MAbs hemmer veksten av SW780-blæretumorer i SCID-mus