

(11) Número de Publicação: **PT 1244705 E**

(51) Classificação Internacional:

C07K 14/72 (2007.10) **C07K 16/30** (2007.10)
C12N 15/12 (2007.10) **A01K 67/27** (2007.10)
G01N 33/50 (2007.10) **C12Q 1/68** (2007.10)
A61K 38/17 (2007.10) **A61K 48/00** (2007.10)
A61K 39/395 (2007.10) **A61P 35/00** (2007.10)

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

(22) Data de pedido: **2000.12.06**

(30) Prioridade(s): **1999.12.06 US 455486**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.10.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.01.27**
085/2010

(73) Titular(es):

AGENSYS, INC.

1545 17TH STREET SANTA MONICA, CA 90404
US

(72) Inventor(es):

ARTHUR B. RAITANO

US

MARY FARIS

US

RENE S. HUBERT

US

DANIEL E. H. AFAR

US

AYA JAKOBOVITS

US

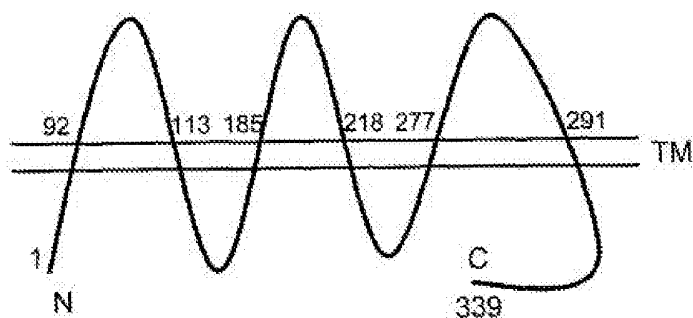
(74) Mandatário:

ANTÓNIO JOÃO COIMBRA DA CUNHA FERREIRA
RUA DAS FLORES, Nº 74, 4º AND 1249-235 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTIGÉNIOS TRANSMEMBRANARES EM SERPENTINA EXPRESSOS EM CANCROS DA PRÓSTATA HUMANOS E SUAS UTILIZAÇÕES**

(57) Resumo:

RESUMO**"Antigénios transmembranares em serpentina expressos em
cancros da próstata humanos e suas utilizações"****Extracelular****Intracelular**

Descreve-se uma nova família de antigénios transmembranares em serpentina da superfície celular. Duas das proteínas desta família são exclusiva ou predominantemente expressas na próstata, assim como no cancro da próstata, e assim, os membros desta família foram denominados 'STEAP' (do inglês "Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate", antigénio epitelial de seis domínios transmembranares da próstata). Quatro STEAP humanos em particular estão aqui descritos e caracterizados. Os STEAP humanos exibem um grau elevado de conservação estrutural entre si mas não apresentam homologia estrutural significativa com quaisquer proteínas humanas conhecidas. O membro protótipo da família STEAP, STEAP-1, parece ser uma proteína membranar de tipo IIIa expressa predominantemente em células da próstata em tecidos humanos normais. Estruturalmente, a STEAP-1 é uma proteína de 339 aminoácidos caracterizada por uma topologia molecular de seis domínios transmembranares e terminais N e C intracelulares, sugerindo que se dobra numa 'serpentina' em três voltas extracelulares e duas intracelulares. A expressão da proteína STEAP-1 é mantida em níveis elevados ao longo de vários estágios do cancro da próstata. Adicionalmente, a STEAP-1 é altamente sobre-expressa em determinados outros cancros humanos.

DESCRIÇÃO

"Antigénios transmembranares em serpentina expressos em cancros da próstata humanos e suas utilizações"

O presente pedido reivindica prioridade relativamente ao pedido de patente dos Estados Unidos número 09/455486, apresentado em 6 de Dezembro, 1999.

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção aqui descrita refere-se a um novo gene e à proteína codificada, e antigénio tumoral, denominada STEAP-2, e a métodos de diagnóstico e terapêuticos e a composições úteis na gestão de vários cancros, incluindo particularmente o cancro da próstata, o cancro do cólon, o cancro da bexiga, o cancro do pulmão, o cancro ovariano e o cancro pancreático.

ANTERIORIDADE DA INVENÇÃO

O cancro é a segunda principal causa de morte humana a seguir à doença coronária. Em todo o mundo, milhões de pessoas morrem de cancro todos os anos. Só nos Estados Unidos, o cancro causa a morte de bem mais de meio milhão de pessoas por ano, com cerca de 1,4 milhões de novos casos diagnosticados por ano. Enquanto as mortes por doença cardíaca têm vindo a diminuir significativamente, as resultantes do cancro estão geralmente a aumentar. Prevê-se que no início do próximo século, o cancro se torne a principal causa de morte.

Em todo o mundo, vários cancros surgem como os mais mortíferos. Em particular, os carcinomas do pulmão, da próstata, da mama, do cólon, do pâncreas e do ovário, representam as principais causas de morte por cancro. Estes e virtualmente todos os outros carcinomas partilham uma característica letal comum. Com muito poucas excepções, a doença metastática originária de um carcinoma é fatal. Adicionalmente, mesmo para os pacientes de cancro que inicialmente sobrevivem aos seus cancros primários, a experiência comum tem mostrado que as suas vidas são drasticamente alteradas. Muitos pacientes de cancro sentem

fortes ansiedades devidas à consciência do potencial para recorrência ou falha do tratamento. Muitos pacientes de cancro sofrem debilitações físicas após o tratamento. Muitos pacientes de cancro sofrem uma recorrência.

Em todo o mundo, o cancro da próstata é o quarto cancro mais prevalecente nos homens. Na América do Norte e na Europa do Norte, é de longe o mais comum cancro no sexo masculino e é a segunda principal causa de morte por cancro nos homens. Só nos Estados Unidos, bem mais de 40 000 homens morrem anualmente desta doença - secundária apenas ao cancro do pulmão. Apesar da magnitude destes números, não existe ainda nenhum tratamento eficaz para o cancro da próstata metastático. A prostatectomia cirúrgica, a terapia de radiação, a terapia de ablação hormonal e a quimioterapia continuam a ser as principais modalidades de tratamento. Infelizmente, estes tratamentos são ineficazes para muitos e estão frequentemente associados a consequências indesejáveis.

Na frente do diagnóstico, a falta de um marcador do tumor da próstata que possa detectar com precisão tumores localizados em estágio inicial, permanece uma limitação significativa na gestão desta doença. Embora o ensaio do PSA sérico tenha sido uma ferramenta muito útil, a sua especificidade e utilidade geral são amplamente consideradas ausentes em muitos aspectos importantes.

O progresso na identificação de marcadores específicos adicionais para o cancro da próstata foi melhorado através da geração de xenoinxertos de cancro da próstata que podem recapitular diferentes estádios da doença em ratinhos. Os xenoinxertos LAPC (do inglês "Los Angeles Prostate Cancer", cancro da próstata de Los Angeles) são xenoinxertos de cancro da próstata que sobreviveram à passagem em ratinhos deficientes imunitários combinados graves (SCID, do inglês "severe combined immune deficient") e exibiram a capacidade de imitar a progressão da doença, incluindo a transição de dependência de androgénios para independência de androgénios e o desenvolvimento de lesões metastáticas (Patente U.S. 6107540; Klein et al., 1997, Nat. Med. 3:402). Os marcadores de cancro da próstata mais recentemente identificados incluem PCTA-1 (Su et al., 1996, Proc. Natl.

Acad. Sci. USA 93: 7252), o antigénio de células estaminais da próstata (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 1735), e STEAP (Hubert *et al.*, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14523).

Embora os marcadores anteriormente identificados tais como PSA, PSM, PCTA e PSCA, tenham facilitado os esforços para diagnosticar e tratar o cancro da próstata, existe a necessidade da identificação de marcadores e alvos terapêuticos adicionais para o cancro da próstata e cancros relacionados de modo a melhorar mais o diagnóstico e a terapia.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção é como definida nas reivindicações anexas.

A presente divulgação refere-se a uma nova família de antigénios transmembranares em serpentina da superfície celular. Duas das proteínas desta família são exclusiva ou predominantemente expressas na próstata, assim como no cancro da próstata, e assim, os membros desta família foram denominados "STEAP" (do inglês "Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate", antigénio epitelial de seis domínios transmembranares da próstata). Quatro STEAP humanos em particular são aqui descritos e caracterizados. Os STEAP humanos exibem um grau elevado de conservação estrutural entre si mas não apresentam homologia estrutural significativa com quaisquer proteínas humanas conhecidas.

O membro protótipo da família STEAP, STEAP-1, parece ser uma proteína membrana de tipo IIIa expressa predominantemente em células da próstata em tecidos humanos normais. Estruturalmente, a STEAP-1 é uma proteína de 339 aminoácidos caracterizada por uma topologia molecular de seis domínios transmembranares e terminais N e C intracelulares, sugerindo que se dobra numa "serpentina" em três voltas extracelulares e duas intracelulares. A expressão da proteína STEAP-1 é mantida em níveis elevados ao longo de vários estágios do cancro da próstata. Adicionalmente, a STEAP-1 é altamente sobre-expressa em determinados outros cancros humanos. Em particular, a expressão na superfície celular de STEAP-1 foi definitivamente

confirmada numa variedade de células da próstata e de cancro da próstata, cancro do pulmão, células de cancro da bexiga e células de cancro do cólon. Estas características indicam que a STEAP-1 é um antigénio tumoral da superfície celular específico expresso em níveis elevados nos cancros da próstata, da bexiga, do cólon e em outros cancros.

Um segundo membro da família, STEAP-2, é uma proteína de 454 aminoácidos com uma topologia molecular prevista similar à da STEAP-1. A STEAP-2, como a STEAP-1, é específica da próstata em tecidos humanos normais e é também expressa no cancro da próstata. O alinhamento dos ORF de STEAP-2 e de STEAP-1 apresenta 54,9% de identidade ao longo de uma sobreposição de 237 resíduos de aminoácido, e as localizações dos seis domínios transmembranares putativos em STEAP-2 coincidem com as localizações dos domínios transmembranares em STEAP-1 (FIG.11A-B).

A STEAP-3 e a STEAP-4 são também aqui descritas. Estas são também estruturalmente relacionadas, e apresentam perfis de expressão únicos. Em particular, a STEAP-3 e a STEAP-4 parecem apresentar padrões de restrição em tecidos diferentes. Um alinhamento das sequências de aminoácidos de todas as quatro STEAP é apresentado na FIG. 11A-B.

A invenção proporciona polinucleótidos correspondentes ou complementares à totalidade ou a parte do gene de STEAP-2 como aqui descrito, ARNm e/ou sequências de codificação, preferivelmente numa forma isolada, incluindo polinucleótidos que codificam proteínas STEAP-2 e seus fragmentos, ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN e moléculas relacionadas, polinucleótidos ou oligonucleótidos complementares ao gene de STEAP-2 ou sequências de ARNm ou suas partes, e polinucleótidos ou oligonucleótidos que hibridam com o gene de STEAP-2, ARNm ou com polinucleótidos que codificam STEAP-2. São igualmente proporcionados meios para o isolamento de ADNc e dos genes que codificam STEAP-2. São igualmente proporcionadas moléculas de ADN recombinante contendo polinucleótidos de STEAP-2, células transformadas ou transduzidas com estas moléculas, e sistemas vector-hospedeiro para a expressão de produtos do gene de STEAP-2.

A invenção proporciona proteínas STEAP-2 e seus fragmentos polipeptídicos. A invenção proporciona ainda anticorpos que se ligam a proteínas STEAP como reivindicado e seus fragmentos polipeptídicos, incluindo anticorpos policlonais e monoclonais, anticorpos murinos e de outros mamíferos, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados e completamente humanos e anticorpos marcados com um marcador detectável, e anticorpos conjugados com radionuclídeos/radioisótopos, toxinas ou outras composições terapêuticas. A invenção proporciona ainda métodos para a detecção da presença de polinucleótidos de STEAP-2 e proteínas STEAP-2 em várias amostras biológicas, assim como métodos para a identificação de células que expressam uma STEAP-2. A invenção proporciona ainda várias composições e estratégias terapêuticas para o tratamento de câncros da próstata e outros câncros, incluindo particularmente, terapia com anticorpos, vacinas e moléculas pequenas.

A invenção proporciona ainda métodos para a detecção da presença de polinucleótidos de STEAP-2 e proteínas STEAP-2 em várias amostras biológicas, assim como métodos para a identificação de células que expressam STEAP-2. A invenção proporciona ainda várias composições e estratégias terapêuticas, incluindo particularmente, terapia com anticorpos, vacinas e moléculas pequenas, para o tratamento de câncros da próstata. A natureza extracelular desta proteína apresenta um número de abordagens terapêuticas utilizando moléculas que têm como alvo a STEAP-2 e a sua função, assim como moléculas que têm como alvo outras proteínas, factores e ligandos que interactivam com a STEAP-2. Estas abordagens terapêuticas incluem terapia com anticorpos com anticorpos anti-STEAP-2, terapias com moléculas pequenas e terapias com vacinas. Em adição, dada a sua expressão supra-regulada no cancro da próstata, a STEAP-2 é útil como um marcador de diagnóstico, da determinação do estágio e/ou do prognóstico para o cancro da próstata e, similarmente, pode ser um marcador para outros câncros que expressam esta proteína. A STEAP-1 proporciona também um excelente marcador para a identificação de metástases do cancro da próstata.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

FIG. 1. Estrutura de STEAP-1. 1A-B: Sequências de nucleótidos e de aminoácidos deduzida do ADNc do clone 10 de STEAP-1 (8P1B4) (SEQ ID NO:1 e 2, respectivamente). A metionina de partida está indicada a negrito na posição de resíduo de aminoácido 1 e seis domínios transmembranares putativos estão indicados a negrito e estão sublinhados. 1C: Representação esquemática da orientação transmembranar de STEAP-1; resíduos de aminoácido que fazem fronteira com os domínios extracelulares previstos estão indicados e correspondem ao esquema de numeração da FIG. 1A-B. 1D: sequência não codificante a 5' rica em G/C do gene de STEAP-1 (SEQ ID NO:3) como determinada por sobreposição de sequências do clone 10 e do clone 3.

FIG. 2. Expressão predominante de STEAP-1 em tecido da próstata. O ADNc da primeira cadeia foi preparado a partir de 16 tecidos normais, dos xenoenxertos LAPC (4AD, 4AI e 9AD) e de células HeLa. A normalização foi realizada por PCR utilizando iniciadores para actina e GAPDH. A PCR semi-quantitativa, utilizando iniciadores derivados de ADNc de STEAP-1 (8P1D4) (FIG. 1A-B), mostra a expressão predominante de STEAP-1 em próstata normal e nos xenoenxertos LAPC. Utilizaram-se os seguintes iniciadores para amplificar STEAP-1:

8P1D4.1 5' ACTTTGTTGATGACCAGGATTGGA 3' (SEQ ID NO:4)

8P1D4.2 5' CAGAACTTCAGCACACACAGGAAC 3' (SEQ ID NO:5).

FIG. 2A. As pistas são como se segue: 1 cérebro; 2 próstata; 3 LAPC-4 AD; 4 LAPC-4 AI; 5 LAPC-9 AD; 6 HeLa; 7 ADNc murino; 8 controlo negativo.

FIG. 2B. As pistas são como se segue: 1 cérebro; 2 coração; 3 rim; 4 fígado; 5 pulmão; 6 pâncreas; 7 placenta; 8 músculo esquelético.

FIG. 2C. As pistas são como se segue: 1 cólon; 2 ovário; 3 leucócitos; 4 próstata; 5 intestino delgado; 6 baço; 7 testículos; 8 timo.

FIG. 3. Análises *Northern blot* da expressão de STEAP-1 em vários tecidos humanos normais e xenoenxertos de cancro da próstata, apresentando expressão predominante de STEAP-1 em tecido da próstata.

FIG. 3A: Dois *Northern blots* (Clontech) de múltiplos tecidos sondados com um ADNc do clone 10 de STEAP de comprimento completo (FIG. 1A-B). Padrões de tamanho em quilobases (kb) estão indicados de lado. Cada pista contém 2 µg de ARNm que foi normalizado utilizando uma sonda de β-actina. A1 cérebro; A2 amígdala; A3 núcleo caudato; A4 cerebelo; A5 córtex cerebral; A6 lóbulo frontal; A7 hipocampo; A8 medula oblonga; B1 lóbulo occipital; B2 putâmen; B3 substância negra; B4 lóbulo temporal; B5 tálamo; B6 núcleo sub-talâmico; B7 medula espinal; C1 coração; C2 aorta; C3 músculo-esquelético; C4 cólon; C5 bexiga; C6 útero; C7 próstata; C8 estômago; D1 testículos; D2 ovário; D3 pâncreas; D4 glândula pituitária; D5 glândula supra-renal; D6 glândula tiróide; D7 glândula salivar; D8 glândula mamária; E1 rim; E2 fígado; E3 intestino delgado; E4 baço; E5 timo; E6 leucócitos periféricos; E7 nódulo linfático; E8 medula óssea; F1 apêndice; **F2 pulmão;** **F3 traqueia;** F4 placenta; G1 cérebro fetal; G2 coração fetal; G3 rim fetal; **G4 fígado fetal;** G5 baço fetal; G6 timo fetal; G7 pulmão fetal.

FIG. 3B: *Dot blot* de ARN de múltiplos tecidos (Clontech, Human Master Blot n.º de cat. 7770-1) sondado com ADNc do clone 10 de STEAP-1 (FIG. 1A-B), apresentando aproximadamente cinco vezes mais expressão na próstata relativamente a outros tecidos com expressão detectável significativa.

FIG. 4A-B. Sequência de nucleótidos (SEQ ID NO:6) do clone GTH9 de STEAP-1 correspondente à mensagem de 4 kb em *Northern blots* (FIG. 3A). A sequência contém um intrão de 2399 pares de bases relativo à sequência do clone 10 de STEAP-1 da FIG. 1A-B; as regiões de codificação são os nucleótidos 96-857 e 3257-3510 (indicados a negrito). O ATG de iniciação está a negrito e sublinhado, o codão STOP está a negrito e sublinhado, e as fronteiras intrão-exão estão sublinhadas.

FIG. 5. Expressão de STEAP-1 em linhas celulares da próstata e de múltiplos cancros e xenoenxertos de cancro da próstata. O xenoenxerto e os filtros de linhas celulares foram preparados com 10 µg de ARN total por pista. Os *blots* foram analisados utilizando o clone 10 de STEAP-1 como sonda. Todas as amostras de ARN foram normalizadas por coloração com brometo de etídio e subsequente análise com uma sonda de β-actina. FIG. 5A: Expressão em várias linhas celulares de cancro e xenoenxertos e próstata. As pistas são como se segue: (1) células PrEC, (2) tecido normal da próstata, (3) xenoenxerto LAPC-4 AD, (4) xenoenxerto LAPC-4 AI, (5) xenoenxerto LAPC-9 AD, (6) xenoenxerto LAPC-9 AI, (7) células LNCaP, (8) células PC-3, (9) células DU145, (10) células PANC-1, (11) células BxPC-3, (12) células HPAC, (13) células Capan-1, (14) células CACO-2, (15) células LOVO, (16) células T84, (17) células COLO-205, (18) células KCL-22 (leucemia linfocítica aguda, LLA), (19) células HT1197, (20) células SCABER, (21) células UM-UC-3, (22) células TCCSUP, (23) células J82, (24) células 5637, (25) células RD-ES (sarcoma de Ewing, EWS), (26) células CAMA-1, (27) células DU4475, (28) células MCF-7, (29) células MDA-MB-435s, (30) células NTERA-2, (31) células NCCIT, (32) células TERRA-1, (33) células TERA-2, (34) células A431, (35) células HeLa, (36) células OV-1063, (37) células PA-1, (38) células SW 626, (39) células CAO-3. FIG. 5B: A expressão de STEAP-1 em xenoenxertos LAPC crescidos subcutaneamente (sc) comparada com a expressão em xenoenxertos LAPC-4 e LAPC-9 crescidos na tíbia (it) de ratinhos.

FIG. 6A-B. Análise *Western blot* da expressão de proteína STEAP-1 em tecidos e múltiplas linhas celulares. Sondaram-se *Western blots* de lisados celulares preparados a partir de xenoenxertos e linhas celulares de cancro da próstata com uma preparação de anticorpo policlonal anti-STEAP-1. As amostras contêm 20 µg de proteína e foram normalizadas com sondagem anti-Grb-2 dos *Western blots*.

FIG. 7A-B. Biotinilação da superfície celular de STEAP-1. FIG. 7A: Biotinilação da superfície celular de células 293T transfectadas com apenas vector ou com vector contendo ADNc que codifica STEAP-1 marcada com 6His. Os lisados celulares foram imunoprecipitados com anticorpos específicos,

transferidos para uma membrana e sondados com estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano. As pistas 1-4 e 6 correspondem a imunoprecipitados de lisados preparados a partir de células 293T que expressam STEAP-1. As pistas 5 e 7 são imunoprecipitados de células transfectadas com vector. As imunoprecipitações foram realizadas utilizando os seguintes anticorpos: (1) de ovelha não imune, (2) anti-antigénio T grande, (3) anti-CD71 (receptor da transferrina), (4) anti-His, (5) anti-His, (6) anti-STEAP-1, (7) anti-STEAP-1. FIG. 7B: Linhas celulares de cancro da próstata (LNCaP, PC-3, DU145), cancro da bexiga (UM-UC-3, TCCSUP) e cancro do cólon (LOVO, COLO) foram (+) ou não (-) biotiniladas antes da lise. Os *Western blots* de proteínas purificadas em gel com estreptavidina foram sondadas com anticorpos anti-STEAP-1. Os marcadores de peso molecular estão indicados em quilodaltons (kD).

FIG. 8. Análise imuno-histoquímica da expressão de STEAP-1 utilizando anticorpo policlonal anti-STEAP-1. Fixaram-se os tecidos em formalina a 10% e embeberam-se em parafina. Coraram-se secções de tecido utilizando anticorpos policlonais anti-STEAP-1 dirigidos no sentido do péptido N-terminal. FIG. 8A: Células LNCaP sondadas na presença de péptido 1 N-terminal de STEAP-1, FIG. 8B: LNCaP mais um péptido 2 específico, FIG. 8C: tecido normal da próstata, FIG. 8D: carcinoma da próstata de grau 3, FIG. 8E: carcinoma da próstata de grau 2, Gleason 7, FIG. 8F: xenoenxerto LAPC-9 AD, FIG. 8G: bexiga normal, FIG. 8H: cólon normal. Todas as imagens têm 400x de ampliação.

FIG. 9A-D. Sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:7) e de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO:8) de ADNc do clone GTD3 de STEAP-2 (98P4B6). A metionina de iniciação e a sequência de Kozak estão indicadas a negrito, e os domínios transmembranares putativos estão sublinhados a negrito. O UTR a 5' exhibe um teor elevado de GC de 72%.

FIG. 10A-E. Sequências de nucleótidos (SEQ ID NO:9) e de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO:10) de STEAP-3. A região Kozak está a negrito.

FIG. 10F. Sequências de nucleótidos (SEQ ID NOS:11-14, respectivamente) de entradas na base de dados dbEST correspondentes a membros adicionais da família STEAP obtidos por pesquisa com a sequência proteínica de STEAP-1.

FIG. 11. Comparações estruturais primárias de proteínas da família STEAP:

FIG. 11A-B. Alinhamento de sequências de aminoácidos das STEAP 1-4 (SEQ ID NOS: 2, 8, 10 e 15, respectivamente) utilizando o programa PIMA (programa PIMA 1.4 no endereço de *Internet*:<<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>>); domínios transmembranares identificados pelo programa SOSUI (disponível no endereço de *Internet* www.tuat.ac.jp/mitaku/adv_sosiu/submit.html) estão a negrito. Estão mostrados os resultados do agrupamento de ligação máxima de PIMA; resíduos idênticos apresentados a negrito.

FIG. 11C. Alinhamento de sequências de aminoácido das sequências STEAP-1 (8P1D4 clone 10; SEQ ID NO:2) e STEAP-2 (98P4B6 clone GTD3; SEQ ID NO:8). O alinhamento foi realizado utilizando o programa de alinhamento SIM do *website* do Baylor College of Medicine Search Launcher. Os domínios transmembranares estão indicados a negrito. Os resultados mostram uma identidade de 54,9% numa sobreposição de 237 resíduos (Pontuação: 717,0; frequência de hiatos: 0,0%).

FIG. 11D. Alinhamento de sequências de aminoácidos das sequências de STEAP-1 (SEQ ID NO:2) e de STEAP-3 (98P4B6 clone GTD3; SEQ ID NO:10). Os resíduos idênticos estão indicados com asteriscos. Resultados SIM: 40,9% de identidade na sobreposição de 264 resíduos; Pontuação: 625,0; Frequência de hiatos: 0,0%.

FIG. 11E. Alinhamento de sequências de aminoácidos das sequências de STEAP-2 (SEQ ID NO:8) e de STEAP-3 (98P4B6 clone GTD3; SEQ ID NO:10). Os resíduos idênticos estão indicados com asteriscos. Resultados SIM: 47,8% de identidade na sobreposição de 416 resíduos; Pontuação: 1075,0; Frequência de hiatos: 0,2%.

FIG. 12. Expressão de ARNm de STEAP-3 em tecidos normais por *Northern blot* (FIG. 12A-B) e RT-PCR (FIG. 12B). Para a análise por RT-PCR, preparou-se ADNc da primeira cadeia a partir de 16 tecidos normais. A normalização foi realizada por PCR utilizando iniciadores para actina e GAPDH. A PCR semi-quantitativa, utilizando iniciadores para AI139607, mostra expressão predominante de AI139607 em placenta e próstata após 25 ciclos de amplificação. Utilizaram-se os seguintes iniciadores para amplificar AI139607:

AI139607.1 5'TTAGGACAACCTTGATCACCAGCA 3' (SEQ ID NO:16)

AI139607.2 5'TGTCCAGTCCAACTGGGTATTT 3' (SEQ ID NO:17).

FIG. 12A. As pistas são como se segue (da esquerda para a direita): Painel 1: coração, cérebro, placenta, pulmão, fígado, músculo-esquelético, rim e pâncreas; Painel 2: baço, timo, próstata, testículos, ovário, intestino delgado, cólon e glóbulos brancos do sangue.

FIG. 12B. As pistas são como se segue: 1 cérebro; 2 coração; 3 rim; 4 fígado; 5 pulmão; 6 pâncreas; 7 placenta; 8 músculo-esquelético.

FIG. 12C. As pistas são como se segue: 1 cólon; 2 ovário; 3 leucócitos; 4 próstata; 5 intestino delgado; 6 baço; 7 testículos; 8 timo.

FIG. 13. Expressão predominante de STEAP-4/R80991 no fígado. Preparou-se o ADNc da primeira cadeia a partir de 16 tecidos normais. A normalização foi realizada por PCR utilizando iniciadores para actina e GAPDH. A PCR semi-quantitativa, utilizando iniciadores para R80991, mostra expressão predominante de R80991 no fígado após 25 ciclos de amplificação. Utilizaram-se os seguintes iniciadores para amplificar R80991:

R80991.1 5' AGGGAGTTCAGCTTCGTTTCAGTC 3' (SEQ ID NO:18)

R80991.2 5' GGTAGAACTTGTAGCGGCTCTCCT 3' (SEQ ID NO:19).

FIG. 13A. As pistas são como se segue: 1 cérebro; 2 coração; 3 rim; 4 fígado; 5 pulmão; 6 pâncreas; 7 placenta; 8 músculo-esquelético.

FIG. 13B. As pistas são como se segue: 1 cólon; 2 ovário; 3 leucócitos; 4 próstata; 5 intestino delgado; 6 baço; 7 testículos; 8 timo.

FIG. 14. Expressão predominante de STEAP-2 (98P4B6) em tecido da próstata. Preparou-se o ADNc da primeira cadeia a partir de 8 tecidos normais, dos xenoenxertos LAPC (4AD, 4AI e 9AD) e células HeLa. A normalização foi realizada por PCR utilizando iniciadores para actina e GAPDH. A PCR semi-quantitativa, utilizando iniciadores para 98P4B6, mostra expressão predominante de 98P4B6 em próstata normal e nos xenoenxertos LAPC. Utilizaram-se os seguintes iniciadores para amplificar STEAP II:

98P4BG.1 5' GACTGAGCTGGAAGCTGGAATTTGT 3' (SEQ ID NO:20)

98P4B6.2 5' TTTGAGGAGACTTCATCTCACTGG 3' (SEQ ID NO:21).

FIG. 14A. As pistas são como se segue: 1 cérebro; 2 próstata; 3 LAPC-4 AD; 4 LAPC-4 AI; 5 LAPC-9 AD; 6 HeLa; 7 ADNc murino; 8 controlo negativo.

FIG. 14B. As pistas são como se segue: 1 cólon; 2 ovário; 3 leucócitos; 4 próstata; 5 intestino delgado; 6 baço; 7 testículos; 8 timo.

FIG. 15. Expressão do gene de STEAP-2/98P4B6 específico da próstata em tecidos normais e em xenoenxertos de cancro da próstata determinada por análise *Northern blot*. Obtiveram-se filtros de tecido humano normal (A e B) da CLONTECH que contêm 2 µg de ARNm por pista. Preparou-se o filtro do xenoenxerto (C) com 10 µg de ARN total por pista. As transferências foram analisadas utilizando o clone 98P4B6 derivado por SSH como sonda. Todas as amostras de ARN foram normalizadas por coloração com brometo de etídio.

FIG. 15A. As pistas são como se segue: 1 coração; 2 cérebro; 3 placenta; 4 pulmão; 5 fígado; 6 músculo-esquelético; 7 rim; 8 pâncreas.

FIG. 15B. As pistas são como se segue: 1 baço; 2 timo; 3 próstata; 4 testículos; 5 ovário; 6 intestino delgado; 7 cólon; 8 leucócitos.

FIG. 15C. As pistas são como se segue: 1 próstata; 2 LAPC-4 AD; 3 LAPC-4 AI; 4 LAPC-9 AD; LAPC-9AI.

FIG. 16. Expressão de STEAP-2 na próstata e em linhas celulares cancerosas seleccionadas como determinada por análise *Northern blot*. Prepararam-se os filtros de xenoenxerto e das linhas celulares com 10 µg de ARN total por pista. As transferências foram analisadas utilizando um clone 98P4B6 derivado por SSH como sonda. Todas as amostras de ARN foram normalizadas por coloração com brometo de etídio.

As pistas são como se segue: 1 próstata; 2 LAPC-4 AD; 3 LAPC-4 AI; 4 LAPC-9 AD; 5 LAPC-9 AI; 6 TsuPr1; 7 DU145; 8 LNCaP; 9 PC-3; 10 LAPC-4 CL; 11 PrEC; 12 HT1197; 13 SCABER; 14 UM-UC-3; 15 TCCSUP; 16 J82; 17 5637; 18 RD-ES; 19 293T; 20 PANC-1; 21 BxPC-3; 22 HPAC; 23 Capan-1; 24 LS180; 25 SK-CO-1; 26 CaCo-2; 27 LoVo; 28 T84; 29 Colo-205; 30 BT-20; 31 CAMA-1; 32 DU4475; 33 MCF-7; 34 MDA-MB-435s; 35 NTERA-2; 36 NCCIT; 37 TERA-1; 38 TERA-2; 39 A431; 40 HeLa; 41 OV-1063; 42 PA-1; 43 SW626; 44 CAOv-3.

FIG. 17. Localização cromossômica de membros da família STEAP. As localizações cromossômicas dos genes de STEAP aqui descritos foram determinadas utilizando o painel de híbridos de radiação GeneBridge4 (Research Genetics, Huntsville AL). O mapeamento para STEAP-2 e AI139607 foi realizado utilizando o painel de híbridos de radiação Stanford G3 (Research Genetics, Huntsville AL).

FIG. 18. Representação esquemática das fronteiras Intrão-Exão no interior do ORF do gene de STEAP-1 humana. Identificaram-se um total de 3 intrões (i) e 4 exões (e).

FIG. 19. Análise *Zooblot southern* do gene de STEAP-1 em várias espécies. Preparou-se AND genómico a partir de vários organismos diferentes incluindo o ser humano, macaco, cão, ratinho, galinha e *Drosophila*. Digeriram-se dez microgramas de cada amostra de ADN com *EcoRI*, transferiram-se para

nitrocelulose e sondaram-se com uma sonda de STEAP-1. Os padrões de tamanho estão indicados de lado em quilobases (kb).

FIG. 20. Análise *Southern blot* de BAC de ratinho com uma sonda de STEAP-1. Preparou-se o ADN a partir de células humanas para isolar ADN genómico e a partir de um clone de BAC de ratinho (12P11) que contém o gene de STEAP de ratinho. Digeriu-se cada amostra de ADN com *EcoRI*, transferiu-se para nitrocelulose e sondou-se. Compararam-se oito microgramas de ADN genómico com 250 ng de ADN de BAC de ratinho.

As pistas são como se segue: (1) escada de 1 kb; (2) genómico humano feminino; (3) 12P11 BAC mus; (4) genómico humano feminino; (5) 12P11 BAC mus; (6) 3T3.

FIG. 21A. Coloração imuno-histoquímica utilizando um anticorpo policlonal de ovelha dirigido contra STEAP-1 e apresentando coloração pericelular num espécime de cancro da bexiga.

FIG. 21B. Coloração imuno-histoquímica utilizando um anticorpo policlonal de ovelha dirigido contra STEAP-1 e apresentando coloração pericelular num segundo espécime de cancro da bexiga.

FIG. 21C. Coloração imuno-histoquímica utilizando um anticorpo policlonal de ovelha dirigido contra STEAP-1 e apresentando coloração pericelular num espécime de cancro do pulmão.

FIG. 21D. Coloração imuno-histoquímica utilizando um anticorpo policlonal de ovelha dirigido contra STEAP-1 e apresentando coloração pericelular num segundo espécime de cancro do pulmão.

FIG. 22A. Expressão de STEAP-2 em próstata normal apresentada por hibridação de ARN *in situ* com uma sonda anti-sentido.

FIG. 22B. Expressão de STEAP-2 em próstata normal por hibridação de ARN *in situ* utilizando uma sonda de sentido directo como controlo.

FIG. 23A. Expressão de STEAP-2 no cancro da próstata apresentada por hibridação de ARN *in situ* com uma sonda anti-sentido.

FIG. 23B. Expressão de STEAP-2 no cancro da próstata de controlo para Hibridação de ARN *in situ* utilizando uma sonda de sentido directo.

FIG. 24. Expressão de STEAP-2 em vários tecidos de cancro como examinado utilizando RT-PCR. A pista 1 representa uma amostra de um xenoenxerto LAPC4 AD; a pista 2 é xenoenxerto LAPC9 AD; a pista 3 é xenoenxerto LAPC9 AD² (crescido com explante de osso humano); a pista 4 é LAPC9 AD IT (crescido intratibialmente); a pista 5 é tecido reunido de pacientes de cancro do cólon; a pista 6 é tecido reunido de pacientes de cancro do pulmão; M representa uma pista marcadora; a pista 7 é tecido da próstata normal de um paciente; a pista 8 é tecido da cancro da próstata de um paciente; a pista 9 é tecido reunido de pacientes de cancro do rim; a pista 10 é tecido reunido de pacientes de cancro da bexiga; a pista 11 é células HeLa; e a pista 12 é um branco de água.

FIG. 25. Análise *dot blot* de ARN da expressão de STEAP-2 em 76 tecidos normais, apresentando expressão específica da próstata. Fontes de tecido de ARN: A1 cérebro completo; A2 cerebelo, esquerdo; A3 substância negra; A4 coração; A5 esófago; A6 cólon, transverso; A7 rim; A8 pulmão; A9 fígado; A10 HL60, leucemia; A11 cérebro fetal; B1 córtex cerebral; B2 cerebelo, direito; B3 *nucleus accumbens*; B4 aorta; B5 estômago; B6 cólon, descendente; B7 músculo-esquelético; B8 placenta; B9 pâncreas; B10 HeLa, S3; B11 coração fetal; C1 lóbulo frontal; C2 corpo caloso; C3 tálamo; C4 aurícula, esquerda; C5 duodeno; C6 recto; C7 baço; C8 bexiga; C9 glândula supra-renal; C10 K562, leucemia; C11 rim fetal; D1 lóbulo parietal; D2 amígdala; D3 glândula pituitária; D4 aurícula, direita; D5 jejuno; D6 branco; D7 timo; D8 útero; D9 glândula tiróide; D10 MOLT-4, leucemia; D11 fígado fetal; E1 lóbulo occipital; E2 núcleo caudado; E3 medula espinal; E4 ventrículo, esquerdo; E5 ílio; E6 branco; E7 leucócitos; E8 próstata; E9 glândula salivar; E10 RAJI, linfoma; E11 baço fetal; F1 lóbulo temporal;

F2 hipocampo; F3 branco; F4 ventrículo, direito; F5 ílio-cego; F6 branco; F7 nódulo linfático; F8 testículos; F9 glândula mamária; F10 DAUDI, linfoma; F11 timo fetal; G1 circunvolução paracentral; G2 medula oblonga; G3 branco; G4 septo interventricular; G5 apêndice; G6 branco; G7 medula óssea; G8 ovário; G9 branco; G10 SW480, cancro do cólon; G11 pulmão fetal; H1 ponte de Valório; H2 putâmen; H3 branco; H4 ápice do coração; H5 cólon, ascendente; H6 branco; H7 traqueia; H8 branco; H9 branco; H10 A549, cancro do pulmão; H11 branco.

FIG. 26. *Western blot* com anti-fosfotirosina (mAb 4G10) que mostra que a expressão de STEAP-2 em células PC3 é suficiente para induzir a fosforilação de várias proteínas em resíduos de tirosina, incluindo p150, p120 e p75. Uma sobreposição utilizando Ab anti-Grb2 mostra que o gel estava igualmente carregado.

FIG. 27A. *Western blot* utilizando anti-fosfo-p38 que mostra que a expressão de STEAP-1 ou STEAP-2 em células PC3 activa a quinase p38, em comparação com controlos PC3-neo. TNF-NaSaI e NaSaI, activadores conhecidos de p38, serviram como controlos positivos.

FIG. 27B. *Western blot*, como na FIG. 27A, utilizando anti-p38 para demonstrar o igual carregamento de proteína nos géis.

FIG. 28A. *Western blot* utilizando anti-fosfo-ERK para examinar a activação da via da ERK em FBS a 1%. Células PC3 que expressam Ras (controlo positivo), STEAP-1, STEAP-2 ou neo (controlo negativo), foram crescidas em FBS a 1%. Os resultados mostram que, enquanto a expressão do gene de controlo neo não teve efeito sobre a fosforilação de ERK, a expressão de STEAP-1 e de STEAP-2 induz fosforilação de ERK. Utilizou-se um anticorpo anti-ERK para confirmar a presença de ERK em todas as pistas.

FIG. 28B. *Western blot* utilizando anti-fosfo-ERK para examinar a activação da via da ERK em FBS a 0,1% e 10%. Células PC3 que expressam STEAP-1 ou neo (controlo negativo) foram crescidas em FBS a 0,1% ou a 10%. Os resultados

confirmam que a expressão de STEAP-1 é suficiente para induzir a activação da cascata de sinalização de ERK.

FIG. 29. Sinalização em células PC3-STEAP-1 mediada por odorantes.

FIG. 29A. *Western blot* anti-fosfotirosina de células PC3, que expressam de forma estável neo, foram crescidas durante a noite em FBS a 0,1% para permitir a ocupação dos receptores, e depois foram tratadas com citralva, etilvanilina ou IBMP. O tratamento com FBS a 10% foi utilizado como controlo.

FIG. 29B. *Western blot* anti-fosfotirosina de células PC3, que expressam de forma estável STEAP-1, foram tratadas como descrito para a FIG. 29A. Os resultados mostram que citralva e etilvanilina induzem especificamente a fosforilação de p136-140 em células PC3-STEAP-1. Em adição, a citralva induz a fosforilação de novo de uma proteína a 160-200kDa.

FIG. 30. Activação da cascata da ERK por odorantes. *Western blot* anti-ERK de células PC3, que expressam de forma estável neo ou STEAP-1, foram crescidas durante a noite em FBS a 0,1%. As células foram então tratadas com citralva durante 5 min. O tratamento com FBS a 10% foi utilizado como controlo. Analisaram-se lisados de células completas utilizando anti-fosfo-ERK. Os resultados mostram que a citralva induz a fosforilação de ERK, e portanto a activação da via da ERK, de uma maneira específica de STEAP-1.

FIG. 31A. Análise imuno-histoquímica anti-STEAP-1 no tumor de cancro da próstata ortotópico LAPC-9 (ampliação de 200X). As células que expressam STEAP-1 apresentam coloração perinuclear.

FIG. 31B. Análise imuno-histoquímica anti-STEAP-1 na metástase de nódulos linfáticos LAPC-9 (ampliação de 400X). As células que expressam STEAP-1 apresentam coloração perinuclear.

FIG. 31C-D. Análise imuno-histoquímica anti-STEAP-1 na metástase do pulmão LAPC-9 (ampliação de 800X). As células que expressam STEAP-1 apresentam coloração perinuclear.

FIG. 31E-F. Análise imuno-histoquímica anti-PSA numa micrometástase do pulmão de cancro da próstata LAPC-9 (ampliação de 800X). As células que expressam PSA apresentam coloração perinuclear.

FIG. 32A. Detecção imuno-histoquímica de STEAP-1 apresentando intensa coloração pericelular em metástase de nódulos linfáticos de um paciente humano.

FIG. 32B. Detecção imuno-histoquímica de STEAP-1 apresentando intensa coloração pericelular em metástase do osso de um paciente humano.

FIG. 33. *Western blot* que mostra que pAb murino anti-STEAP-1 reconhece a proteína STEAP-1 em linhas celulares manipuladas e proteína STEAP-1 endógena em células LNCaP. Lisados de células LNCaP e células 293T transfectadas com pcDNA3.1 MYC/STEAP-1 marcada com HIS ou vector vazio de neo, e células RAT1 manipuladas para expressar STEAP-1 ou um gene neo de controlo, foram separados por SDS-PAGE e transferidos para nitrocelulose. A transferência foi depois submetida a análise de *Western* anti-STEAP utilizando uma diluição de 1:1000 de soro de ratinhos imunizados com uma proteína de fusão GST-STEAP-1.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A presente divulgação refere-se a uma nova família de antigénios transmembranares em serpentina da superfície celular. Duas das proteínas desta família são exclusiva ou predominantemente expressas na próstata, assim como no cancro da próstata, e portanto os membros desta família foram denominados "STEAP" (do inglês Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate, antigénio epitelial de seis domínios transmembranares da próstata). Quatro STEAP humanas em particular são aqui descritas e caracterizadas. As STEAP humanas exibem um elevado grau de conservação estrutural entre si mas não apresentam homologia estrutural significativa com nenhuma proteína humanas conhecidas. A presente divulgação refere-se a métodos e composições para o diagnóstico e terapia de cancros da próstata e outros cancros, métodos estes que

utilizam polinucleótidos isolados correspondentes a genes de STEAP humanos, proteínas codificadas pelos genes de STEAP e seus fragmentos, e anticorpos capazes de reconhecer e ligar-se especificamente a proteínas STEAP.

A menos que definido em contrário, pretende-se que todos os termos da especialidade, notações e outra terminologia científica aqui utilizada tenha os significados vulgarmente entendidos pelos peritos na especialidade à qual este invento se refere. Em alguns casos, os termos com significados vulgarmente entendidos são aqui definidos para clareza e/ou para fácil referência e a inclusão destas definições aqui não deve ser necessariamente entendida como representando uma substancial diferença em relação ao que é geralmente entendido na especialidade. As técnicas e procedimentos aqui descritos ou referidos são geralmente bem entendidos e vulgarmente empregues utilizando metodologia convencional pelos peritos na especialidade, tais como, por exemplo, as metodologias de clonagem molecular amplamente utilizadas descritas em Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" 2nd. Edition (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Consoante apropriado, os procedimentos que envolvem a utilização de *kits* e reagentes comercialmente disponíveis são geralmente realizados de acordo com protocolos e/ou parâmetros definidos pelo fabricante a menos que observado em contrário.

Tal como aqui se utiliza, os termos "cancro da próstata avançado", "cancro da próstata localmente avançado", "doença avançada" e "doença localmente avançada" significam cancros da próstata que se tenham estendido através da cápsula da próstata e pretende-se que incluam doença em estágio C segundo o sistema da American Urological Association (AUA), doença em estágio C1-C2 segundo o sistema Whitmore-Jewett e doença em estágio T3-T4 e N+ segundo o sistema TNM (tumor, nódulo, metástase). Em geral, não é recomendada cirurgia para pacientes com doença localmente avançada, e estes pacientes têm desfechos substancialmente menos favoráveis em comparação com pacientes com cancro da próstata clinicamente localizado (confinado ao órgão). A doença localmente avançada é clinicamente identificada através de evidência palpável de induração para além do limite lateral da próstata, ou

assimetria ou induração acima da base da próstata. O cancro da próstata localmente avançado é actualmente diagnosticado patologicamente após prostatectomia radical se o tumor invadir ou penetrar a cápsula prostática, se estender para a margem cirúrgica ou invadir as vesículas seminais.

Tal como aqui se utilizam, os termos "cancro da próstata metastático" e "doença metastática" significam cancros da próstata que se tenham espalhado para nódulos linfáticos regionais ou para locais distantes e pretende-se que incluam doença em estágio D segundo o sistema AUA e estágio TxNxM+ segundo o sistema TNM. Tal como é o caso com cancro da próstata localmente avançado, a cirurgia não é geralmente indicada para pacientes com doença metastática e a terapia hormonal (ablação de androgénios) é a modalidade de tratamento preferida. Os pacientes com cancro da próstata metastático desenvolvem eventualmente um estado refractário aos androgénios em 12 a 18 meses após o início do tratamento e aproximadamente metade destes pacientes morre em 6 meses a partir daí. O local mais vulgar para as metástases do cancro da próstata é o osso. As metástases ósseas de cancro da próstata são, no equilíbrio, caracteristicamente osteoblásticas em vez de osteolíticas (*i.e.*, resultam em formação óssea líquida). Verifica-se que muito frequentemente as metástases ósseas são na coluna vertebral, seguida do fémur, da pélvis, da caixa torácica, do crânio e do úmero. Outros locais comuns para metástases incluem os nódulos linfáticos, o pulmão, o fígado e o cérebro. O cancro da próstata metastático é tipicamente diagnosticado através de linfadenectomia pélvica aberta ou laparoscópica, varrimento de corpo inteiro com radionuclídeos, radiografia esquelética e/ou biópsia de lesões ósseas.

Tal como aqui se utiliza, o termo "polinucleótido" significa uma forma polimérica de nucleótidos com pelo menos 10 bases ou pares de bases de comprimento, ribonucleótidos ou desoxinucleótidos ou uma forma modificada de um dos tipos de nucleótidos, e pretende incluir formas de ADN de cadeia simples e dupla.

Tal como aqui se utiliza, o termo "polipéptido" significa um polímero com pelo menos 10 aminoácidos. Ao longo de todo o

fascículo, são utilizadas as designações padrão de três letras ou de uma letra para os aminoácidos.

Tal como aqui se utiliza, os termos "hibridam", "hibridando", "hibrida" e semelhantes, utilizados no contexto de polinucleótidos, pretendem referir-se a condições de hibridação convencionais, de preferência tais como hibridação em formamida a 50%/SSC 6×/SDS a 0,1%/100 µg/ml de ADNcs, em que as temperaturas para hibridação são acima dos 37 graus C e as temperaturas para lavagem com SSC 0,1×/SDS a 0,1% são acima dos 55°C, e com maior preferência a condições de hibridação rigorosas.

O "rigor" de reacções de hibridação é prontamente determinável por uma pessoa competente na matéria, e geralmente é um cálculo empírico dependente do comprimento da sonda, das temperaturas de lavagem e da concentração salina. Em geral, sondas mais longas requerem temperaturas mais elevadas para uma hibridação correcta, enquanto sondas mais curtas necessitam de menores temperaturas. A hibridação depende geralmente da capacidade de ADN desnaturado voltar a hibridar quando estão presentes cadeias complementares num ambiente abaixo da sua temperatura de fusão. Quanto mais elevado o grau de homologia desejado entre a sonda e a sequência hibridável, maior a temperatura relativa que pode ser utilizada. Em resultado, segue-se que temperaturas relativas mais elevadas tenderão a tornar as condições reaccionais mais rigorosas, enquanto temperaturas mais baixas, menos rigorosas. Para detalhes adicionais e explicação sobre o rigor de reacções de hibridação, veja-se Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

As "condições rigorosas" ou "condições de rigor elevado", como definido aqui, podem ser identificadas como aquelas que: (1) empregam baixa força iónica e temperatura elevada para a lavagem, por exemplo cloreto de sódio 0,015 M/citrato de sódio 0,0015 M/dodecilsulfato de sódio a 0,1% a 50°C; (2) empregam durante a hibridação um agente desnaturante, tal como formamida, por exemplo, formamida a 50% (v/v) com albumina sérica bovina a 0,1%/Ficoll a 0,1%/polivinilpirrolidona a 0,1%/ tampão de fosfato de sódio 50mM a pH 6,5 com cloreto de

sódio 750 mM, citrato de sódio 75 mM a 42°C; ou (3) empregam formamida a 50%, SSC 5x (NaCl 0,75 M, citrato de sódio 0,075 M), fosfato de sódio 50 mM (pH 6,8), pirofosfato de sódio a 0,1%, solução de Denhardt 5x, ADN de esperma de salmão tratado com ultra-sons (50 µg/ml), SDS a 0,1% e sulfato de dextrano a 10% a 42°C, com lavagens a 42°C com SSC 0,2x (cloreto de sódio/citrato de sódio) e formamida a 50% a 55°C, seguidos de lavagem muito rigorosa consistindo em SSC 0,1x contendo EDTA a 55°C.

As "condições moderadamente rigorosas" podem ser identificadas como descrito por Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluem a utilização de solução de lavagem e condições de hibridação (e.g., temperaturas, força iônica e % de SDS) menos rigorosas do que as descritas acima. Um exemplo de condições moderadamente rigorosas é incubação durante a noite a 37°C numa solução compreendendo formamida a 20%, SSC 5x (NaCl 150 mM, citrato trissódico 15 mM), fosfato de sódio 50 mM (pH 7,6), solução de Denhardt 5x, sulfato de dextrano a 10% e ADN de esperma de salmão desnaturado por corte a 20 mg/ml, seguida por lavagem dos filtros com SSC 1x a cerca de 37-50°C. O perito saberá como ajustar a temperatura, a força iônica, etc., conforme necessário para acomodar factores tais como o comprimento da sonda e similares.

No contexto das comparações de sequências de aminoácidos, o termo "identidade" é utilizado para expressar a percentagem de resíduos de aminoácido nas mesmas posições relativas que são iguais. Também neste contexto, o termo "homologia" é utilizado para expressar a percentagem de resíduos de aminoácido nas mesmas posições relativas que são idênticos ou semelhantes, utilizando os critérios de aminoácidos conservados da análise BLAST, tal como é geralmente entendido na especialidade. Por exemplo, os valores de % de identidade podem ser gerados por WU-BLAST-2 (Altschul *et al.*, Methods in Enzymology, 266: 460-480 (1996): <http://blast.wustl.edu/blast/READMEhtml>). Mais detalhes em relação a substituições de aminoácidos, que são consideradas conservativas segundo estes critérios, são proporcionados abaixo.

São proporcionadas definições adicionais ao longo de todas as subsecções que se seguem.

POLINUCLEÓTIDOS DE STEAP

São aqui divulgados polinucleótidos correspondentes ou complementares à totalidade ou a parte de um gene, um ARNm e/ou uma sequência de codificação de STEAP-2, preferivelmente uma forma isolada, incluindo polinucleótidos que codificam uma proteína STEAP-2 e seus fragmentos, ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN, e moléculas relacionadas, polinucleótidos ou oligonucleótidos complementares a um gene ou uma sequência de ARNm de STEAP-2 ou uma sua parte, e polinucleótidos ou oligonucleótidos que hibridam com um gene de STEAP-2, um ARNm ou a polinucleótidos que codificam STEAP-2 (colectivamente, "polinucleótidos de STEAP-2"). Como aqui utilizado, genes e proteínas STEAP incluem os genes e proteínas STEAP-1, STEAP-2 e STRAP-3, e o gene e a proteína correspondentes ao número de acesso no GenBank R80991 (STEAP-4), e os genes e proteínas correspondentes a outras proteínas STEAP e variantes estruturalmente similares dos anteriores. Estas outras proteínas STEAP e variantes terão geralmente sequências de codificação que são altamente homólogas à sequência de codificação de STEAP, e preferivelmente partilharão pelo menos cerca de 50% de identidade de aminoácidos e pelo menos cerca de 60% de homologia de aminoácidos (utilizando critérios BLAST), mais preferivelmente partilhando 70% ou mais de homologia (utilizando critérios BLAST).

As sequências génicas de membros da família STEAP aqui descritas codificam proteínas STEAP que partilham domínios únicos de sequências de aminoácidos altamente conservadas que as distinguem de outras proteínas. As proteínas que incluem um ou mais destes domínios únicos altamente conservados podem estar relacionadas com os membros da família STEAP ou podem representar novas proteínas STEAP. Com referência à FIG. 11A-B, que é um alinhamento de sequências de aminoácidos das sequências completas de proteínas STEAP-1, STEAP-2 e STEAP-3 assim como da sequência parcial de STEAP-4, é evidente que as STEAP estão estreitamente relacionadas ao nível estrutural. Com referência à FIG. 11C, que é um alinhamento de sequências de aminoácidos das sequências completas das proteínas STEAP-1

e STEAP-2, é evidente uma estreita conservação estrutural, particularmente nos domínios transmembranares previstos. As sequências de STEAP-1 e STEAP-2 partilham 54,9% de identidade ao longo de uma sobreposição de 237 aminoácidos. Estão apresentados nas FIGS. 11D e 11E alinhamentos de sequências de aminoácidos adicionais entre as STEAP. Estes alinhamentos mostram que a STEAP-1 e a STEAP-3 são 40,9% idênticas ao longo de uma região de 264 aminoácidos, enquanto a STEAP-2 e a STEAP-3 são 47,8% idênticas ao longo de uma região de 416 aminoácidos.

Um polinucleótido de STEAP pode compreender um polinucleótido possuindo a sequência de nucleótidos de STEAP-1 humana como mostrado na FIG. 1A-B, a sequência de nucleótidos de STEAP-2 humana como mostrado na FIG. 9A-D, a sequência de nucleótidos de STEAP-3 humana como mostrado na FIG. 10A-E, ou a sequência de nucleótidos de STEAP-4 como mostrado na FIG. 10F, ou uma sequência sua complementar, ou um fragmento polinucleotídico de quaisquer dos anteriores. Outra concretização compreende um polinucleótido que codifica as sequências de aminoácidos das proteínas STEAP-1, STEAP-2, STEAP-3 ou STEAP-4 humanas, uma sequência sua complementar, ou um fragmento polinucleotídico de quaisquer dos anteriores. Outra concretização compreende um polinucleótido que é capaz de hibridar sob condições de hibridação rigorosas com o ADNc de STEAP-1 humana apresentado na FIG. 1A-B, o ADNc de STEAP-2 humana apresentado na FIG. 9A-D, o ADNc de STEAP-3 humana apresentado na FIG. 10A-E, ou da STEAP-4 como mostrado na FIG. 10F, ou a um seu fragmento polinucleotídico.

Concretizações típicas aqui divulgadas incluem polinucleótidos de STEAP-2 que codificam porções específicas de uma sequência de ARNm de STEAP-2 tais como os que codificam a proteína e seus fragmentos. São aqui divulgados polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 1 a cerca do aminoácido 10 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 20 a cerca do aminoácido 30 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 30 a cerca do aminoácido 40 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 40 a cerca do

aminoácido 50 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 50 a cerca do aminoácido 60 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 60 a cerca do aminoácido 70 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 70 a cerca do aminoácido 80 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 80 a cerca do aminoácido 90 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B e polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 90 a cerca do aminoácido 100 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, etc. Seguindo este esquema, são aqui descritos polinucleótidos (de pelo menos 10 nucleótidos) que codificam outras porções da sequência de aminoácidos de uma proteína STEAP. Estas porções de uma proteína STEAP incluem os aminoácidos 100-339 de uma proteína STEAP-1 apresentada na Figura 11A-B, ou os aminoácidos 100-454 de uma proteína STEAP-2 apresentada na Figura 11A-B, ou os aminoácidos 100-459 de uma proteína STEAP-3 apresentada na Figura 11A-B, e os aminoácidos 100-133 de uma proteína STEAP-4 apresentada na Figura 11A-B. Polinucleótidos que codificam porções maiores da proteína STEAP estão também contemplados. Por exemplo, polinucleótidos que codificam de cerca do aminoácido 1 (ou 20 ou 30 ou 40 etc.) a cerca do aminoácido 20, (ou 30, ou 40 ou 50 etc.) de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B podem ser gerados através de uma variedade de técnicas bem conhecidas na especialidade.

Concretizações ilustrativas adicionais aqui divulgadas incluem fragmentos polinucleotídicos de STEAP-2 que codificam um ou mais dos motivos biológicos contidos no interior da sequência da proteína STEAP-2. Os fragmentos polinucleotídicos aqui descritos podem codificar uma ou mais das regiões de STEAP que exibem homologia com outros membros da família STEAP, tais como um ou mais dos domínios transmembranares. Os fragmentos polinucleotídicos aqui descritos podem codificar sequências que são únicas para uma ou mais variantes de *splicing* alternativo de STEAP. Os fragmentos polinucleotídicos aqui descritos podem codificar uma porção imunogénica de uma proteína STEAP. Um exemplo de uma porção imunogénica de proteína STEAP é a dos resíduos de aminoácido 14 a 28 da

sequência de aminoácidos de STEAP-1 como mostrado na FIG. 1A-B (WKMKPRRNLEEDYL; SEQ ID NO:22).

Os polinucleótidos dos parágrafos precedentes têm várias utilizações específicas diferentes. Como as STEAP são expressas diferencialmente no cancro da próstata e em outros cancros, estes polinucleótidos podem ser utilizados em métodos para avaliar o estado de produtos de genes de STEAP em tecidos normais *versus* cancerosos. Tipicamente, os polinucleótidos que codificam regiões específicas de uma proteína STEAP podem ser utilizados para avaliar a presença de perturbações (tais como deleções, inserções, mutações pontuais, etc.) em regiões específicas dos produtos do gene de STEAP. Exemplos de ensaios incluem tanto ensaios por RT-PCR assim como a análise de polimorfismo conformacional em cadeia simples (SSCP) (veja-se e.g. Marrogi *et al.*, J. Cutan. Pathol. 26(8): 369-378 (1999), em que ambos utilizam polinucleótidos que codificam regiões específicas de uma proteína para examinar essas regiões no interior da proteína. Estão também disponíveis ensaios e métodos para a análise de sequências para detectar polimorfismos de nucleótidos simples (Irizarry, *et al.*, 2000, Nature Genetics 26(2):223-236.

Outras concretizações especificamente contempladas aqui divulgadas são moléculas de ADN genómico, ADNc, ribozimas e anti-sentido, incluindo moléculas anti-sentido de morfolina, assim como moléculas de ácido nucleico baseadas num esqueleto alternativo ou incluindo bases alternativas, quer derivadas de fontes naturais quer sintetizadas. Por exemplo, as moléculas anti-sentido podem ser ARN ou outras moléculas, incluindo ácidos nucleicos peptídicos (PNA) ou moléculas que não de ácido nucleico tais como derivados fosforotioato, que se ligam especificamente a ADN ou ARN de uma maneira dependente do emparelhamento de bases. Um perito pode facilmente obter estas classes de moléculas de ácido nucleico utilizando os polinucleótidos e sequências polinucleotídicas de STEAP aqui revelados.

A tecnologia anti-sentido implica a administração de oligonucleótidos exógenos que se ligam a um polinucleótido alvo localizado no interior das células. O termo "anti-sentido" refere-se ao facto de esses oligonucleótidos serem

complementares aos seus alvos intracelulares, e.g., STEAP. Veja-se por exemplo, Jack Cohen, OLIGODEOXYNUCLEOTIDES, Anti-sense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; e Synthesis 1:1-5 (1988). Os oligonucleótidos anti-sentido de STEAP aqui descritos incluem derivados tais como S-oligonucleótidos (derivados fosforotioato ou S-oligos, veja-se, Jack Cohen, *supra*), que exibem acção inibidora do crescimento de células cancerosas melhorada. Os S-oligos (nucleósido-fosforotioatos) são análogos isoelectrónicos de um oligonucleótido (O-oligo) em que um átomo de oxigénio que não em ponte do grupo fosfato está substituído por um átomo de enxofre. Os S-oligos aqui descritos podem ser preparados por tratamento dos O-oligos correspondentes com 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido, que é um reagente de transferência de enxofre. Veja-se Iyer, R.P. et al., J. Org. Chem. 55:4693-4698 (1990); e Iyer, R.P. et al., J. Am. Chem. Soc. 112: 1253-1254 (1990). Oligonucleótidos anti-sentido de STEAP adicionais incluem oligonucleótidos anti-sentido de morfolina conhecidos na especialidade (veja-se e.g. Partridge et al., 1996, Anti-sense & Nucleic Acid Drug Development 6: 169-175).

Os oligonucleótidos anti-sentido de STEAP aqui descritos podem tipicamente ser ARN ou ADN que é complementar a, e hibrida de forma estável com os primeiros 100 codões N-terminais ou os últimos 100 codões C-terminais, ou se sobrepõe com o local de iniciação ATG, do genoma de STEAP ou o ARNm correspondente. Embora não seja necessária uma complementaridade absoluta, são preferidos graus elevados de complementaridade. A utilização de um oligonucleótido complementar com esta região permite a hibridação selectiva com ARNm de STEAP e não com ARNm que especifica outras subunidades reguladoras de proteína-quinase. Preferivelmente, os oligonucleótidos anti-sentido de STEAP são um fragmento 15-mero a 30-mero da molécula de ADN anti-sentido possuindo uma sequência que hibrida com ARNm de STEAP. Opcionalmente, o oligonucleótido anti-sentido de STEAP é um oligonucleótido 30-mero que é complementar com a região nos primeiros 10 codões N-terminais e últimos 10 codões C-terminais de STEAP. Alternativamente, as moléculas anti-sentido são modificadas para empregar ribozimas na inibição da expressão de

STEAP. L.A. Couture & D.T. Stinchcomb; Trends Genet 12: 510-515 (1996).

Outras concretizações específicas incluem iniciadores e pares de iniciadores, que permitem a amplificação específica dos polinucleótidos da invenção ou de quaisquer suas partes específicas, e sondas que hibridam selectiva ou especificamente com moléculas de ácido nucleico da invenção ou com quaisquer suas partes. As sondas podem ser marcadas com um marcador detectável, tal como, por exemplo, um radioisótopo, um composto fluorescente, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um quelante de metais ou uma enzima. Estas sondas e iniciadores podem ser utilizados para detectar a presença de um polinucleótido de STEAP numa amostra e como meio para detectar uma célula que expressa uma proteína STEAP. Os exemplos destas sondas incluem polinucleótidos compreendendo a totalidade ou parte de uma sequência de ADNc de STEAP humana apresentada na Fig. 1A-B (SEQ ID NO:1), FIG. 9A-D (SEQ ID NO:7) ou Fig. 10A-E (SEQ ID NO:9). Os exemplos de pares de iniciadores capazes de amplificar especificamente ARN de STEAP estão também descritos nos Exemplos que se seguem. Como será entendido pelo perito, podem ser preparados muitos diferentes iniciadores e sondas com base nas sequências aqui proporcionadas e utilizadas eficazmente para amplificar e/ou detectar um ARNm de STEAP.

Como aqui se utiliza, um polinucleótido diz-se "isolado" quando está substancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que correspondem ou são complementares a genes outros que não o gene STEAP ou que codificam polipéptidos outros que não o produto do gene de STEAP ou seus fragmentos. Um perito pode facilmente empregar procedimentos de isolamento de ácido nucleico para obter um polinucleótido de STEAP isolado.

Os polinucleótidos de STEAP aqui descritos são úteis para uma variedade de finalidades, incluindo, mas não se lhes limitando, a sua utilização como sondas e iniciadores para a amplificação e/ou detecção do(s) gene(s), ARNm(s) de STEAP ou seus fragmentos; como reagentes para o diagnóstico e/ou prognóstico de cancro da próstata e outros cancros; como ferramentas para a identificação de moléculas que inibem a

entrada de cálcio especificamente nas células da próstata; como sequências de codificação capazes de dirigir a expressão de polipéptidos de STEAP; como ferramentas para a modulação ou inibição da expressão do(s) gene(s) de STEAP e/ou a tradução do(s) transcrito(s) de STEAP; e como agentes terapêuticos.

CARACTERÍSTICAS MOLECULARES E BIOQUÍMICAS DAS STEAP

O presente invento refere-se a uma nova família de proteínas, designadas STEAP. São aqui descritas especificamente quatro STEAP por meio de características estruturais, moleculares e bioquímicas. Tal como adicionalmente descrito nos Exemplos que se seguem, as STEAP foram caracterizadas de vários modos. Por exemplo, foram conduzidas análises de sequências de nucleótidos codificantes e de aminoácidos de modo a identificar elementos estruturais conservados dentro da família STEAP. Foram conduzidas análises extensas de RT-PCR e *Northern blot* da expressão do ARNm de STEAP para estabelecer a gama de tecidos normais e cancerosos que expressam as várias mensagens das STEAP. Foram conduzidas análises *Western blot*, imuno-histoquímicas e citométricas de fluxo da expressão das proteínas STEAP para determinar os perfis de expressão proteica, a localização na superfície celular e a topologia molecular grosseira das STEAP.

O membro protótipo da família STEAP, a STEAP-1, é uma proteína da superfície celular de seis domínios transmembranares com 339 aminoácidos sem homologia identificável com qualquer proteína humana conhecida. As sequências nucleotídica de ADNC e de aminoácidos deduzida da STEAP-1 humana são mostradas na FIG. 1A-B. Um esquema topológico grosseiro da proteína STEAP-1 integrada na membrana celular é mostrado na FIG. 1B. A expressão de STEAP-1 é predominantemente específica da próstata em tecidos normais. Especificamente, análise extensiva da expressão do ARNm e da proteína STEAP-1 em tecidos humanos normais mostra que a proteína STEAP-1 é predominantemente expressa na próstata e, numa extensão muito menor, na bexiga. O ARNm de STEAP-1 é também relativamente específico da próstata, com apenas um nível de expressão muito baixo detectado nalguns outros tecidos normais. No cancro, o ARNm e a proteína STEAP-1 são consistentemente expressos em níveis elevados em cancro da

próstata (incluindo tumores dependentes de androgénio e independentes de androgénio) e durante todos os estádios da doença. A STEAP-1 é também expressa noutros cancros. Especificamente, o ARNm de STEAP-1 é expresso em níveis muito elevados em cancro da bexiga, do cólon, pancreático e dos ovários (bem como outros cancros). Adicionalmente, a expressão na superfície celular da proteína STEAP-1 foi estabelecida em cancros da próstata, da bexiga, do pulmão e do cólon. Por essa razão, a STEAP-1 tem todas as características distintivas de um excelente alvo terapêutico e de diagnóstico para o tratamento de certos cancros, incluindo particularmente carcinomas da próstata, do cólon e da bexiga.

Um segundo membro da família, a STEAP-2, é uma proteína de 454 aminoácidos codificada por um gene distinto e possuindo uma topologia molecular prevista similar à de STEAP-1. As sequências de nucleótidos do ADNc e de aminoácidos deduzida de STEAP-2 estão apresentadas na FIG. 9A-D. O alinhamento de aminoácidos das sequências de STEAP-1 e STEAP-2 apresenta um elevado grau de conservação estrutural (54,9% de identidade ao longo de uma sobreposição de 237 resíduos de aminoácido, e as localizações dos seis domínios transmembranares putativos em STEAP-1 e STEAP-2 coincidem (FIGS. 11A-B, 11C). A homologia estrutural entre estas STEAP-1 e STEAP-2 é maior nas regiões que se estendem desde a primeira volta extracelular putativa até ao quinto domínio transmembranar. Contudo, são evidentes algumas diferenças estruturais significativas entre STEAP-1 e STEAP-2. Por exemplo, a STEAP-2 exhibe um terminal N intracelular longo de 205 a.a. (comparativamente com 69 a.a. em STEAP-1) e um terminal C intracelular curto de 4 a.a. (comparativamente com 26 a.a. em STEAP-1). Em adição, ambos os genes de STEAP-1 e STEAP-2 estão localizados no cromossoma 7, mas em braços diferentes. Estas diferenças podem implicar diferenças significativas em função e/ou interacção com vias de sinalização intracelulares.

A STEAP-2 é expressa apenas em próstata normal entre os tecidos humanos testados (FIGS. 14 e 15) e é também expressa no cancro da próstata (FIG. 15), e portanto apresenta alguma similaridade no perfil de expressão com STEAP-1. Contudo, a STEAP-2 exhibe um perfil de expressão de ARNm diferente relativamente a STEAP-1 em amostras de cancro da próstata

(comparem-se as FIGS. 3 e 15) e em outros cancros que não da próstata testados (comparem-se as FIGS. 5 e 16). Estas diferenças nos perfis de expressão de STEAP-1 e STEAP-2 sugerem que estas são diferencialmente reguladas.

A STEAP-3 e a STEAP-4 parecem ser estreitamente relacionadas tanto com STEAP-1 como com STEAP-2 ao nível estrutural, e ambas parecem ser também proteínas transmembranares. A STEAP-3 é mais relacionada com STEAP-2 (47,8% de identidade) do que com STEAP-1 (40,9% de identidade). A STEAP-3 e a STEAP-4 apresentam perfis de expressão únicos. A STEAP-3, por exemplo, parece ter um padrão de expressão que está predominantemente restringido à placenta e, em menor grau, é observada expressão na próstata mas não noutros tecidos normais testados. A STEAP-4 parece ser expressa predominantemente no fígado por análise por RT-PCR. Nem a STEAP-3 nem a STEAP-4 parecem ser expressas em xenoenxertos de cancro da próstata que exibem um nível elevado de expressão de STEAP-1 e STEAP-2.

As proteínas STEAP exibem características de proteínas envolvidas em vias de sinalização celular. Especificamente, a STEAP-1 e a STEAP-2, quando expressas em células PC3, activam a fosforilação de p38, uma proteína envolvida na cascata de sinalização da MAPK. Em adição, a expressão de STEAP-2 induz a fosforilação de tirosina, e a STEAP-1 medeia a activação de tirosina-quinase em células tratadas com odorante. Estas verificações suportam a utilização de moléculas relacionadas com STEAP e células modificadas para expressar STEAP em ensaios de elevado rendimento para identificar moléculas capazes de alterar as vias de sinalização celulares, conduzindo à identificação de novos agentes terapêuticos. Numa concretização, o ensaio identifica moléculas capazes de inibir a função de STEAP, moléculas estas que são assim capazes de modular a progressão do cancro ou de outra doença associada a crescimento celular desregulado.

Três das quatro STEAP aqui descritas mapeiam-se no cromossoma 7 humano (STEAP-1, -2 e -3). De forma interessante, a STEAP-1 mapeia-se dentro de 7p22 (7p22.3), uma grande região de ganho alélico relatada para cancros da próstata primários e recorrentes (Visakorpi *et al.*, Cancer Res. **55**: 342, 1995,

Nupponen *et al.*, American J. Pathol. **153**: 141, 1998), sugerindo que a supra-regulação de STEAP-1 no cancro poderá incluir mecanismos genómicos. Em adição, tanto a STEAP-2 como a STEAP-3 localizam-se no cromossoma 7q21, sugerindo que esses dois genes surgiram por duplicação génica.

Outras moléculas da superfície celular que contêm seis domínios transmembranares incluem canais iónicos (Dolly e Parcej, J. Bioenerg. Biomembr. **28**: 231, 1996) e canais de água ou aquaporinas (Reizer *et al.*, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **28**: 235, 1993). Estudos estruturais mostram que ambos os tipos de moléculas se montam em complexos tetraméricos para formar canais funcionais (Christie, Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. **22**: 944, 1995, Walz *et al.*, Nature **387**: 624, 1997, Cheng *et al.*, Nature **387**: 627, 1997). A coloração imuno-histoquímica de STEAP-1 na glândula da próstata parece estar concentrada nos limites célula-célula, com menos coloração detectada no lado luminal. Isto pode sugerir um papel para a STEAP-1 nas junções apertadas (*zonulae occludens*), junções de hiato ou comunicação e adesão celular, ou como proteína transportadora.

Para testar estas possibilidades, oócitos de *Xenopus* (ou outras células) que expressam STEAP podem ser analisados utilizando experiências de medição de correntes iónicas - *voltage-clamp* e *patch-clamp* - para determinar se a STEAP funciona como um canal iónico. Pode também ser medido o volume celular dos oócitos para determinar se a STEAP exhibe propriedades de canal de água. Se as STEAP funcionarem como proteínas de canal ou junção de hiato, elas podem servir como excelentes alvos para inibição utilizando, por exemplo, anticorpos, moléculas pequenas e polinucleótidos capazes de inibir a expressão ou a função. O padrão de expressão restringido em tecido normal e os níveis elevados de expressão em tecido canceroso sugerem que a interferência com a função da STEAP pode matar selectivamente células cancerosas.

Uma vez que a família de genes de STEAP é predominantemente expressa em tecido epitelial, parece possível que as proteínas STEAP funcionem como canais iónicos, proteínas transportadoras ou proteínas de junção de hiato na função de células epiteliais. Os canais iónicos foram implicados na proliferação e invasividade das células de

cancro da próstata (Lalani *et al.*, Cancer Metastasis Rev. **16**: 29, 1997). As células de cancro da próstata tanto de rato como humanas contêm uma subpopulação de células com níveis de expressão mais elevados e mais baixos de canais de sódio. Níveis mais elevados de expressão de canais de sódio correlacionam-se com invasividade mais agressiva *in vitro* (Smith *et al.*, FEBS Lett. **423**:19, 1998). De forma semelhante, mostrou-se que um bloqueio específico de canais de sódio inibe a invasividade de células PC-3 *in vitro* (Laniado *et al.*, Am. J. Pathol. **150**:1213, 1997), enquanto a inibição específica de canais de potássio em células LNCaP inibia a proliferação celular (Skryma *et al.*, Prostate **33**:112, 1997). Estes relatórios sugerem um papel para os canais iónicos no cancro da próstata e demonstram também que moléculas pequenas que inibem a função dos canais iónicos podem interferir com a proliferação do cancro da próstata.

ISOLAMENTO DE MOLÉCULAS DE ÁCIDO NUCLEICO QUE CODIFICAM STEAP

As sequências de ADNc de STEAP aqui descritas permitem o isolamento de outros polinucleótidos que codificam produto(s) génico(s) STEAP, bem como o isolamento de polinucleótidos que codificam homólogos de produtos génicos STEAP, isoformas de *splicing* alternativo, variantes alélicas e formas mutantes do produto génico STEAP. Vários métodos de clonagem molecular que podem ser empregues para isolar ADNc de comprimento completo que codificam um gene de STEAP são bem conhecidos (ver, por exemplo, Sambrook, J. *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2nd edition, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; "Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel *et al.*, Eds., Wiley and Sons, 1995). Por exemplo, metodologias de clonagem de fago lambda podem ser convenientemente empregues, utilizando sistemas de clonagem comercialmente disponíveis (e.g., Lambda ZAP Express, Stratagene). Os clones fágicos contendo ADNc de genes de STEAP podem ser identificados através de sondagem com um ADNc de STEAP marcado ou um seu fragmento. Por exemplo, numa concretização, o ADNc de STEAP ou uma sua porção podem ser sintetizados e utilizados como sondas para recuperar ADNc de comprimento completo e sobreponíveis correspondentes a um gene de STEAP. O gene de STEAP pode, ele próprio, ser isolado por rastreio de bibliotecas de ADN genómico, bibliotecas de cromossomas artificiais bacterianos

(BAC), bibliotecas de cromossomas artificiais de levedura (YAC) e semelhantes, com sondas ou iniciador de ADN de STEAP.

MOLÉCULAS DE ADN RECOMBINANTE E SISTEMAS HOSPEDEIRO-VECTOR

São aqui também divulgadas moléculas de ADN ou ARN recombinantes contendo um polinucleótido de STEAP, incluindo, mas não se lhes limitando, fagos, plasmídeos, fagemídeos, cosmídeos, YAC, BAC, bem como vários vectores virais e não virais bem conhecidos na especialidade, e células transformadas ou transfectadas com estas moléculas de ADN ou ARN recombinantes. Tal como aqui se utiliza, uma molécula de ADN ou ARN recombinante é uma molécula de ADN ou ARN que foi submetida a manipulação molecular *in vitro*. Os métodos para geração destas moléculas são bem conhecidos (ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*).

É divulgado um sistema hospedeiro-vector compreendendo uma molécula de ADN recombinante contendo um polinucleótido de STEAP no interior de uma célula procariota ou eucariota adequada. Os exemplos de células hospedeiras eucariotas adequadas incluem uma célula de levedura, uma célula vegetal ou uma célula animal, tal como uma célula de mamífero ou uma célula de insecto (*e.g.*, uma célula que possa ser infectada por baculovírus tal como uma célula Sf9). Os exemplos de células de mamífero adequadas incluem várias linhas celulares de cancro da próstata tais como LnCaP, PC-3, DU145, LAPC-4, TsuPr1, outras linhas celulares de cancro da próstata susceptíveis de transfecção ou transdução, bem como várias células de mamífero rotineiramente utilizadas para a expressão de proteínas recombinantes (*e.g.*, células COS, CHO, 293, 293T). Mais particularmente, um polinucleótido compreendendo a sequência de codificação de uma STEAP pode ser utilizado para gerar proteínas STEAP ou seus fragmentos utilizando um qualquer número de sistemas hospedeiro-vector rotineiramente utilizados e amplamente conhecidos na especialidade.

Estão disponível uma ampla variedade de sistemas hospedeiro-vector adequados para a expressão de proteínas STEAP ou seus fragmentos, ver por exemplo, Sambrook *et al.*, *supra*, 1989; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, *supra*). Os vectores preferidos para expressão em mamíferos

incluem, mas não se lhes limitam, pcDNA 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) e o vector retroviral pSR α tkneo (Muller *et al.*, MCB 11: 1785, 1991). Utilizando estes vectores de expressão, as STEAP podem ser preferencialmente expressas em várias linhas celulares de cancro da próstata e sem ser da próstata, incluindo por exemplo 293, 293T, rat-1, 3T3, PC-3, LNCaP e TsuPr1. Os sistemas hospedeiro-vector aqui descritos são úteis para a produção de uma proteína STEAP ou seus fragmentos. Estes sistemas hospedeiro-vector podem ser empregues para estudar as propriedades funcionais das STEAP e mutações das STEAP.

As proteínas codificadas pelos genes de STEAP, ou por seus fragmentos, terão uma variedade de utilizações, incluindo, mas não se lhes limitando, a criação de anticorpos e em métodos para identificação de ligandos e outros agentes e constituintes celulares que se ligam a um produto génico de STEAP. Os anticorpos criados contra uma proteína STEAP ou um seu fragmento podem ser úteis em ensaios de diagnóstico e prognóstico, metodologias de imagética (incluindo, particularmente, imagética de cancro) e métodos terapêuticos na gestão de cancros humanos caracterizados pela expressão de uma proteína STEAP, incluindo, mas não se lhe limitando, o cancro da próstata. Estão contemplados vários ensaios imunológicos úteis para a detecção de proteínas STEAP, incluindo, mas não se lhes limitando, vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunossorventes com enzima ligada (ELISA), ensaios imunofluorescentes com enzima ligada (ELIFA), métodos imunocitoquímicos e semelhantes. Estes anticorpos podem ser marcados e utilizados como reagentes imunológicos de imagética capazes de detectar células da próstata (*e.g.*, em métodos de imagética radiocintigráficos). As proteínas STEAP pode também ser particularmente útil na criação de vacinas contra o cancro, como adicionalmente descrito adiante.

PROTEÍNAS STEAP

Outro aspecto da presente invenção proporciona várias proteínas STEAP-2 e seus fragmentos polipeptídicos. Tal como aqui se utiliza, uma proteína STEAP refere-se a uma proteína que tem ou inclui a sequência de aminoácidos de STEAP-1 humana tal como proporcionada na FIG. 1A-B, STEAP-2 humana como proporcionada na FIG. 9A-D, STEAP-3 humana como proporcionada

na FIG. 10A-E, a sequência de aminoácidos de outros homólogos de STEAP de mamífero (e.g., STEAP-4) e variantes, bem como variantes alélicas e mutantes de substituição conservativa destas proteínas que tenham actividade biológica de STEAP, na medida em que estas variantes e homólogos possam ser isolados/gerados e caracterizados sem demasiada experimentação seguindo os métodos delineados adiante. Estão também incluídas proteínas de fusão que combinam partes de diferentes proteínas STEAP ou seus fragmentos, bem como proteínas de fusão de uma proteína STEAP e um polipéptido heterólogo. Estas proteínas STEAP serão colectivamente referidas como as proteínas STEAP, ou STEAP. Tal como aqui se utiliza, o termo "polipéptido de STEAP" refere-se a um fragmento polipeptídico ou uma proteína STEAP com pelo menos 10 aminoácidos, de preferência pelo menos 15 aminoácidos.

Uma concretização específica de uma proteína STEAP compreende um polipéptido possuindo a sequência de aminoácidos da STEAP-1 humana tal como mostrada na FIG. 1A-B. Outra concretização de uma proteína STEAP compreende um polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de STEAP-2 como mostrada na FIG. 9A-D. Outra concretização compreende um polipéptido contendo a sequência de aminoácidos de STEAP-3 como mostrada na FIG. 10A-E. Ainda outra concretização compreende um polipéptido contendo a sequência de aminoácidos parcial de STEAP-4 mostrada na FIG. 11A-B.

Em geral, as variantes alélicas de ocorrência natural de STEAP humana partilharão um elevado grau de identidade e homologia estruturais (e.g., 90% ou mais de identidade). Tipicamente, as variantes alélicas das proteínas STEAP conterão substituições conservativas de aminoácidos no interior das sequências de STEAP aqui descritas ou conterão uma substituição de um aminoácido de uma posição correspondente num homólogo de STEAP. Uma classe de variantes alélicas de STEAP serão proteínas que partilham um elevado grau de homologia com pelo menos uma pequena região de uma sequência de aminoácidos de STEAP particular, mas conterão ainda um afastamento radical à sequência, tal como uma substituição não conservativa, uma truncagem, uma inserção ou um desvio de enquadramento.

Podem ser frequentemente feitas substituições de aminoácidos conservativas numa proteína sem alterar a conformação ou a função da proteína. Estas alterações incluem a substituição de qualquer um entre isoleucina (I), valina (V) e leucina (L) por qualquer outro destes aminoácidos hidrófobos; ácido glutâmico (E) por ácido aspártico (D) e *vice-versa*; asparagina (N) por glutamina (Q) e *vice-versa*; e treonina (T) por serina (S) e *vice-versa*. Outras substituições podem também ser consideradas conservativas, dependendo do ambiente do aminoácido particular e do seu papel na estrutura tridimensional da proteína. Por exemplo, glicina (G) e alanina (A) podem ser frequentemente trocadas entre si, tal como alanina (A) e valina (V). A metionina (M), que é relativamente hidrófoba, pode ser frequentemente trocada por leucina e isoleucina e por vezes por valina. A lisina (K) e a arginina (R) são frequentemente trocáveis entre si em localizações nas quais a característica significativa do resíduo de aminoácido é a sua carga e os diferentes pK destes dois resíduos de aminoácidos não são significativos. Ainda outras alterações podem ainda ser consideradas “conservativas” em ambientes particulares.

As proteínas STEAP, incluindo variantes, compreendem pelo menos um epítipo em comum com uma proteína STEAP possuindo uma sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 11A-B, tal que um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína STEAP ou uma variante se irá também ligar especificamente à proteína STEAP possuindo uma sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 11A-B. Uma classe de variantes de proteínas STEAP partilha 90% ou mais de identidade com uma sequência de aminoácidos da Fig. 11A-B. Uma classe mais específica de variantes de proteínas STEAP compreende um motivo SCP da proteína extracelular como descrito acima. As variantes de proteínas STEAP preferidas são capazes de exibir uma ou mais das funções da defensina aqui descritas, incluindo, por exemplo, a capacidade de induzir morte tumoral ou de quimioatrair e/ou induzir a migração de células.

As proteínas STEAP podem ser concretizadas de muitas formas, de preferência na forma isolada. Tal como aqui se utiliza, uma proteína diz-se “isolada” quando são empregues métodos físicos, mecânicos ou químicos para remover a proteína

STEAP dos constituintes celulares que estão normalmente associados à proteína. Um perito pode facilmente empregar métodos padrão de purificação para obter uma proteína STEAP isolada. Uma molécula de proteína STEAP purificada estará substancialmente isenta de outras proteínas ou moléculas que afetem a ligação de STEAP a um anticorpo ou outro ligando. A natureza e o grau de isolamento e purificação dependerão da utilização pretendida. Concretizações de uma proteína STEAP incluem uma proteína STEAP purificada e uma proteína STEAP funcional, solúvel. Numa forma, estas proteínas STEAP funcionais, solúveis, ou seus fragmentos, retêm a capacidade para se ligarem a um anticorpo ou outro ligando.

São aqui também divulgados polipéptidos de STEAP compreendendo fragmentos biologicamente activos da sequência de aminoácidos de STEAP, tais como um polipéptido correspondendo a parte das sequências de aminoácidos para STEAP-1 como mostrada na FIG. 1A-B, STEAP-2 como mostrada na FIG. 9A-D, STEAP-3 como mostrada na FIG. 10A-E ou STEAP-4 como mostrada na FIG. 11A-B. Os polipéptidos da invenção exibem propriedades de uma proteína STEAP-2, tais como a capacidade para elicitar a geração de anticorpos que se ligam especificamente a um epítipo associado a uma proteína STEAP-2. Os polipéptidos compreendendo sequências de aminoácidos que são únicas para a proteína STEAP particular (relativamente a outras proteínas STEAP) podem ser utilizados para gerar anticorpos que reagirão especificamente com essa proteína STEAP particular. Por exemplo, em relação ao alinhamento de aminoácidos das estruturas de STEAP mostrado nas FIGS. 11A-E, o perito notará prontamente que cada molécula contém trechos de sequência únicos à sua estrutura. Estes trechos únicos podem ser utilizados para gerar anticorpos específicos para uma STEAP particular. Similarmente, regiões de sequência conservada podem ser utilizadas para gerar anticorpos que se podem ligar a múltiplas STEAP.

As concretizações da invenção aqui divulgadas incluem uma ampla variedade de variantes de proteínas STEAP-2 aceites na especialidade tais como polipéptidos possuindo inserções, deleções e substituições de aminoácidos. As variantes de STEAP podem ser preparadas utilizando métodos conhecidos na especialidade tais como mutagénese dirigida ao local,

varrimento de alaninas e mutagénese por PCR. A mutagénese dirigida ao local [Carter *et al.*, Nucl Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6481 (1987)], a mutagénese por cassetes [Wells *et al.*, Gene, 34:315 (1985)], a mutagénese por selecção de restrição [Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)] ou outras técnicas conhecidas podem ser realizadas com o ADN clonado para produzir o ADN da variante de STEAP. A análise de varrimento de aminoácidos pode também ser empregue para identificar um ou mais aminoácidos ao longo de uma sequência contígua. Entre os aminoácidos preferidos para o varrimento encontram-se os aminoácidos neutros relativamente pequenos. Estes aminoácidos incluem alanina, glicina, serina e cisteína. A alanina é tipicamente um aminoácido preferido para varrimento entre este grupo porque elimina a cadeia lateral para além do carbono beta e é menos provável que altere a conformação da cadeia principal da variante. A alanina é também tipicamente preferida porque é o aminoácido mais comum. Adicionalmente, encontra-se frequentemente tanto em posições embutidas como expostas [Creighton; The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)]. Se a substituição por alanina não originar quantidades adequadas de variante, pode utilizar-se um aminoácido isostérico.

Como discutido acima, as concretizações aqui divulgadas incluem polipéptidos contendo menos que a sequência de aminoácidos completa de uma proteína STEAP-2 apresentada na Figura 11A-B. Por exemplo, concretizações representativas aqui divulgadas incluem polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 1 a cerca do aminoácido 10 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 20 a cerca do aminoácido 30 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 30 a cerca do aminoácido 40 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 40 a cerca do aminoácido 50 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 50 a cerca do aminoácido 60 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 60 a cerca do aminoácido 70 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 70 a

cerca do aminoácido 80 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 80 a cerca do aminoácido 90 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B e polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 90 a cerca do aminoácido 100 de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B, etc. Seguindo este esquema, são aqui descritos os polipéptidos consistindo em porções da sequência de aminoácidos dos aminoácidos 100-339 de uma proteína STEAP-1 apresentada na Figura 11A-B, ou dos aminoácidos 100-454 de uma proteína STEAP-2 apresentada na Figura 11A-B, ou dos aminoácidos 100-459 de uma proteína STEAP-3 apresentada na Figura 11A-B, ou dos aminoácidos 100-133 de uma proteína STEAP-4 apresentada na Figura 11A-B. Polipéptidos consistindo em porções maiores da proteína STEAP estão também contemplados. Por exemplo polipéptidos consistindo de cerca do aminoácido 1 (ou 20 ou 30 ou 40 etc.) a cerca do aminoácido 20, (ou 30, ou 40 ou 50 etc.) de uma proteína STEAP apresentada na Figura 11A-B podem ser gerados através de uma variedade de técnicas bem conhecidas na especialidade.

Concretizações ilustrativas adicionais aqui divulgadas incluem polipéptidos de STEAP contendo os resíduos de aminoácido de um ou mais dos motivos biológicos contidos no interior da sequência polipeptídica de STEAP-2 como mostrado na FIG. 11A-B. Os polipéptidos de STEAP contendo um ou mais destes motivos ou outras regiões de interesse seleccionadas aqui descritas incluirão tipicamente um adicional de 5 a 25 ou mais resíduos de aminoácido da sequência de proteína STEAP adjacente num ou em ambos os lados do(s) motivo(s) seleccionado(s). Numa concretização, polipéptidos típicos da invenção podem conter uma ou mais das regiões de STEAP-2 que exibem homologia com uma ou mais outras proteínas STEAP. Em outra concretização, polipéptidos típicos podem conter uma ou mais porções imunogénicas de uma proteína STEAP-2. Um exemplo de uma porção imunogénica de uma proteína STEAP consiste nos resíduos de aminoácido 14 a 28 da sequência de aminoácidos de STEAP-1 como mostrado na FIG. 1A-B (WKMKPRRNLEEDDYI; SEQ ID NO:22). Os polipéptidos aqui descritos podem conter um ou mais péptidos de ligação a HLA-A2 previstos tais como os aminoácidos 165-173 de STEAP-1, os aminoácidos 86-94 de STEAP-1, os aminoácidos 262-270 de STEAP-1, os aminoácidos

302-310 de STEAP-1, os aminoácidos 158-166 de STEAP-1, os aminoácidos 227-235 de STEAP-2, os aminoácidos 402-410 de STEAP-2, os aminoácidos 307-315 de STEAP-2, os aminoácidos 306-314 de STEAP-2 e os aminoácidos 100-108 de STEAP-2. Noutra concretização, os polipéptidos consistem na totalidade ou em parte de um fragmento de STEAP-2, tal como os aminoácidos 1-245, 2-204, 121-454, 153-165, 182-454, 183-387, 276-453, 345-358 ou 419-454 da proteína STEAP-2 apresentada na Fig. 8. Concretizações relacionadas incluem polipéptidos contendo combinações dos diferentes motivos discutidos acima, sendo as concretizações preferidas aquelas que não contêm inserções, deleções ou substituições nem no interior dos motivos nem nas sequências intervenientes destes polipéptidos.

Os polipéptidos de STEAP podem ser gerados utilizando tecnologia de síntese peptídica padrão ou utilizando métodos de clivagem química bem conhecidos na especialidade com base nas sequências de aminoácidos das proteínas STEAP humanas aqui divulgadas. Alternativamente, podem ser utilizados métodos recombinantes para gerar moléculas de ácido nucleico que codifiquem um fragmento polipeptídico de uma proteína STEAP. A este respeito, as moléculas de ácido nucleico que codificam STEAP aqui descritas proporcionam um meio para a criação de fragmentos definidos de proteínas STEAP. Os polipéptidos de STEAP são particularmente úteis na geração e caracterização de anticorpos específicos para domínios (e.g., anticorpos que reconhecem um epítopo extracelular ou intracelular de uma proteína STEAP), na identificação de agentes ou factores celulares que se ligam a STEAP ou a um seu domínio estrutural particular, e em vários contextos terapêuticos, incluindo, mas não se lhe limitando, vacinas contra o cancro. Os polipéptidos de STEAP contendo estruturas particularmente interessantes podem ser previstos e/ou identificados utilizando várias técnicas analíticas bem conhecidas na especialidade, incluindo, por exemplo, os métodos de análise de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf, ou com base na imunogenicidade. Os fragmentos contendo estas estruturas são particularmente úteis na criação de anticorpos anti-STEAP específicos de subunidades ou na identificação de factores celulares que se ligam a STEAP.

Numa concretização específica descrita nos exemplos que se seguem, uma forma segregada de STEAP pode ser convenientemente expressa em células 293T transfectadas com um vector de expressão conduzido por CMV que codifica STEAP com um marcador C-terminal 6XHis e MYC (pcDNA3.1 /mycHis, Invitrogen). A STEAP marcada com HIS segregada no meio de cultura pode ser purificada utilizando uma coluna de níquel e técnicas padrão. Alternativamente, pode ser utilizado um sistema marcador AP. Estão descritas nos exemplos abaixo várias construções para expressão de STEAP.

Estão aqui descritas modificações de STEAP tais como modificações covalentes. Um tipo de modificação covalente inclui a reacção de resíduos de aminoácido determinados de um polipéptido de STEAP com um agente orgânico de derivatização que é capaz de reagir com cadeias laterais seleccionadas ou com os resíduos N- ou C- terminais da STEAP. Outro tipo de modificação covalente do polipéptido de STEAP compreende a alteração do padrão de glicosilação nativo do polipéptido. "Alteração do padrão de glicosilação nativo" significa para os presentes fins a deleção de uma ou mais porções hidrato de carbono que se encontram na sequência nativa de STEAP- (quer por remoção do local de glicosilação subjacente quer por deleção da glicosilação por meios químicos e/ou enzimáticos), e/ou a adição de um ou mais locais de glicosilação que não estão presentes na sequência nativa de STEAP. Em adição, a frase inclui alterações qualitativas na glicosilação das proteínas nativas, envolvendo uma alteração na natureza e nas proporções das várias porções hidrato de carbono presentes. Outro tipo de modificação covalente de STEAP compreende a ligação dos polipéptidos de STEAP a um de uma variedade de polímeros não proteínáceos, e.g., polietilenoglicol (PEG), polipropilenoglicol ou polioxialquilenos, da maneira estabelecida nas Patentes U.S. 4640835; 4,496,689; 4301144; 4670417; 4791192 ou 4179337.

A STEAP pode também ser modificada de maneira a formar uma molécula quimérica compreendendo STEAP fundida com outro polipéptido ou sequência de aminoácidos heterólogos. Numa concretização, esta molécula quimérica compreende uma fusão da STEAP- com um marcador epitópico poli-histidina, que proporciona um epítipo ao qual níquel imobilizado se pode

ligar selectivamente. O marcador epitópico é geralmente colocado no terminal amino ou carboxilo da STEAP. Numa concretização alternativa, a molécula quimérica pode compreender uma fusão da STEAP com uma imunoglobulina ou uma região particular de uma imunoglobulina. Para uma forma bivalente da molécula quimérica (também referida como "imunoadesina"), esta fusão pode ser com a região Fc de uma molécula de IgG. As fusões de Ig incluem preferivelmente a substituição por uma forma solúvel (domínio transmembranar eliminado ou inactivado) de um polipéptido STEAP no lugar de pelo menos uma região variável no interior de uma molécula de Ig. Numa concretização particularmente preferida, a fusão com imunoglobulina inclui as regiões de charneira, CH2 e CH3, ou as regiões de charneira, CH2, CH2 e CH3 de uma molécula de IgG1. Para a produção de fusões com imunoglobulina veja-se também a Patente US 5428130 concedida em 27 de Junho, 1995.

ANTICORPOS CONTRA STEAP

Outro aspecto da invenção proporciona anticorpos que se ligam a proteínas e a polipéptidos de STEAP-2. Os anticorpos mais preferidos ligar-se-ão selectivamente a uma proteína STEAP-2 e não se ligarão (ou ligar-se-ão fracamente) a proteínas e polipéptidos que não STEAP. Os anticorpos anti-STEAP que são particularmente contemplados incluem anticorpos monoclonais e policlonais bem como fragmentos contendo o domínio de ligação ao antígeno e/ou uma ou mais regiões determinantes de complementaridade destes anticorpos. Tal como aqui se utiliza, um fragmento de anticorpo é definido como pelo menos uma porção da região variável da molécula de imunoglobulina que se liga ao seu alvo, i.e., a região de ligação ao antígeno.

Para algumas aplicações, pode ser desejável gerar anticorpos que reajam especificamente com uma proteína STEAP particular e/ou com um epítipo dentro de um domínio estrutural particular. Por exemplo, os anticorpos preferidos úteis para fins de terapia do cancro e imagética de diagnóstico são os que reagem com um epítipo numa região extracelular da proteína STEAP tal como expressa em células de cancro. Estes anticorpos podem ser gerados utilizando as proteínas STEAP aqui descritas ou utilizando péptidos derivados de seus domínios

extracelulares previstos, como imunogénio. A este respeito, com referência ao esquema topológico da proteína STEAP-1 mostrado na FIG. 1B, regiões nas voltas extracelulares entre os domínios transmembranares indicados podem ser seleccionadas e utilizadas para desenhar imunogénios apropriados para criar anticorpos específicos da parte extracelular.

Os anticorpos contra STEAP-2 aqui descritos podem ser particularmente úteis em estratégias terapêuticas de cancro da próstata, ensaios de diagnóstico e prognóstico e metodologias de imagética. Similarmente, estes anticorpos podem ser úteis no tratamento, diagnóstico e/ou prognóstico de outros cancros, na medida em a STEAP-2 seja também expressa ou sobre-expressa em outros tipos de cancro. A invenção proporciona vários ensaios imunológicos úteis para a detecção e quantificação de proteínas e polipéptidos de STEAP-2 e STEAP-2 mutantes. Estes ensaios compreendem geralmente um ou mais anticorpos contra STEAP-2 capazes de reconhecer e se ligar a uma proteína STEAP-2 ou STEAP-2 mutante, conforme apropriado, e podem ser realizados dentro de vários formatos de ensaio imunológico bem conhecidos na especialidade, incluindo, mas não se lhes limitando, vários tipos de radioimunoensaios, ensaios imunossorventes com enzima ligada (ELISA), ensaios imunofluorescentes com enzima ligada (ELIFA), e semelhantes. Adicionalmente, são também aqui divulgados métodos imunológicos de imagética capazes de detectar cancro da próstata, incluindo, mas não se lhes limitando, métodos de imagética radiocintigráficos utilizando anticorpos contra STEAP marcados. Estes ensaios podem ser clinicamente utilizados na detecção, monitorização e prognóstico de cancro da próstata, particularmente cancro da próstata avançado.

Os anticorpos contra STEAP podem também ser utilizados em métodos para purificação de proteínas e polipéptidos de STEAP e STEAP mutantes e para isolamento de homólogos de STEAP e moléculas relacionadas. Por exemplo, numa concretização, o método de purificação de uma proteína STEAP compreende a incubação de um anticorpo contra STEAP, o qual foi acoplado a uma matriz sólida, com um lisado ou outra solução contendo STEAP sob condições que permitam que o anticorpo contra STEAP se ligue a STEAP; lavagem da matriz sólida para eliminar impurezas; e eluição da STEAP do anticorpo acoplado. Outras

utilizações dos anticorpos contra STEAP da invenção incluem a criação de anticorpos anti-idiotípicos que imitam a proteína STEAP.

Os anticorpos contra STEAP podem também ser utilizados terapêuticamente, por exemplo, por modulação ou inibição da actividade biológica de uma proteína STEAP ou atingindo e destruindo células de cancro que expressam uma proteína STEAP. A terapia com anticorpos do cancro da próstata e outros cancros está mais especificamente descrita numa subsecção separada adiante.

Vários métodos para a preparação de anticorpos são bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, podem ser preparados anticorpos através de imunização de um hospedeiro mamífero adequado utilizando uma proteína, um péptido ou um fragmento de STEAP na forma isolada ou imunoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow e Lane (1988); Harlow, Antibodies", Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Os exemplos de proteínas imunogénicas incluem STEAP recombinante (expressa num sistema de baculovírus, num sistema de mamífero, etc.), o domínio extracelular de STEAP ou voltas da proteína STEAP conjugadas com uma ou mais regiões constantes do anticorpo, STEAP marcada com AP, etc. Adicionalmente, podem também ser utilizadas proteínas de fusão de STEAP, tais como uma fusão de STEAP com GST, proteína de ligação a maltose (MBP), proteína verde fluorescente (GFP), HisMax-TOPO ou MycHis (vejam-se os exemplos adiante).

Numa concretização particular, pode ser produzida uma proteína de fusão de GST compreendendo toda ou a maior parte da sequência de aminoácidos do quadro de leitura aberto mostrada na FIG. 11A-B, e utilizada como imunogénio para gerar anticorpos apropriados. As células que expressam ou sobre-expressam STEAP podem também ser utilizadas para imunizações. Similarmente, pode ser utilizada qualquer célula manipulada para expressar STEAP. Estas estratégias podem resultar na produção de anticorpos monoclonais com melhores capacidades para reconhecimento de STEAP endógenas. Outro imunogénio útil compreende péptidos de STEAP ligados à membrana plasmática de glóbulos vermelhos do sangue de ovelha.

As sequências de aminoácidos de proteínas STEAP tal como mostradas na FIG. 11A-B podem ser utilizadas para seleccionar regiões específicas de uma proteína STEAP para gerar anticorpos. Por exemplo, podem ser utilizadas análises de hidrofobicidade e hidrofiliidade da sequência de aminoácidos da STEAP para identificar regiões hidrófilas na estrutura da STEAP. As regiões da proteína STEAP que apresentam estrutura imunogénica, bem como outras regiões e domínios, podem ser prontamente identificadas utilizando vários outros métodos conhecidos na especialidade, tais como análise de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz ou Jameson-Wolf. Os péptidos de STEAP que se prevê ligarem-se a HLA-A2 podem ser seleccionados para a geração de anticorpos ou utilizados para gerar uma resposta de CTL. Estes péptidos de ligação a HLA-A2 previstos incluem, mas não se lhes limitam, os aminoácidos 165-173 de STEAP-1, os aminoácidos 86-94 de STEAP-1, os aminoácidos 262-270 de STEAP-1, os aminoácidos 302-310 de STEAP-1, os aminoácidos 158-166 de STEAP-1, os aminoácidos 227-235 de STEAP-2, os aminoácidos 402-410 de STEAP-2, os aminoácidos 307-315 de STEAP-2, os aminoácidos 306-314 de STEAP-2 e os aminoácidos 100-108 de STEAP-2. Como discutido nos exemplos adiante, foi demonstrada imunogenicidade com STEAP, que foi utilizada para gerar anticorpos policlonais e monoclonais utilizando coelhos e ratinhos, respectivamente. Esta resposta de células B (produção de anticorpos) é o resultado de uma resposta inicial de células T eliciada pelas porções imunogénicas de STEAP.

Os métodos para a preparação de uma proteína ou polipéptido para utilizar como imunogénio e para preparação de conjugados imunogénicos de uma proteína com um transportador tal como BSA, KLH ou outras proteínas transportadoras, são bem conhecidos na especialidade. Em algumas circunstâncias, pode ser utilizada conjugação directa utilizando, por exemplo, reagentes de carbodiimida; noutros casos podem ser eficazes reagentes de ligação tais como os fornecidos por Pierce Chemical Co., Rockford, IL. A administração de um imunogénio de STEAP é geralmente conduzida por injeção ao longo de um período adequado e com utilização de um adjuvante adequado, tal como é geralmente entendido na especialidade. Durante o programa de imunização, podem ser tomados os títulos de

anticorpos para determinar a adequação da formação de anticorpos.

Os anticorpos monoclonais contra STEAP são preferidos e podem ser produzidos por vários meios bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, podem ser preparadas linhas celulares imortalizadas que segreguem um anticorpo monoclonal desejado utilizando a tecnologia do hibridoma padrão de Kohler e Milstein ou modificações que imortalizam células B produtoras, como é geralmente conhecido. As linhas celulares imortalizadas que segregam os anticorpos desejados são rastreadas através de imunoensaio no qual o antigénio é a proteína STEAP ou um fragmento de STEAP. Quando é identificada a cultura de células imortalizadas apropriada que segrega o anticorpo desejado, as células podem ser expandidas e os anticorpos produzidos a partir de culturas *in vitro* ou a partir de fluido ascítico.

Os anticorpos ou fragmentos podem também ser produzidos, utilizando tecnologia actual, através de meios recombinantes. As regiões que se ligam especificamente às regiões desejadas da proteína STEAP podem também ser produzidas no contexto de anticorpos quiméricos ou com CDR enxertadas de múltiplas espécies de origem. Podem também ser produzidos anticorpos contra STEAP humanizados ou humanos e são preferidos para utilizar em contextos terapêuticos. São bem conhecidos métodos para a humanização de anticorpos murinos e outros anticorpos não humanos por substituição por uma ou mais das CDR dos anticorpos não humanos as sequências correspondentes de anticorpos humanos (veja-se por exemplo, Jones *et al.*, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmann *et al.*, 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeven *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536). Veja-se também, Carter *et al.*, 1993, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 4285 e Sims *et al.*, 1993, J. Immunol. 151: 2296. Os métodos para produção de anticorpos monoclonais completamente humanos incluem as tecnologias de animais transgénicos e de exibição fágica (para revisão, veja-se Vaughan *et al.*, Nature Biotechnology 16: 535-539, 1998).

Anticorpos monoclonais contra STEAP inteiramente humanos podem ser gerados utilizando tecnologias de clonagem empregando grandes bibliotecas combinatórias de genes de Ig

humana (*i.e.*, exibição fágica) (Griffiths e Hoogenboom, "Building an *In vitro* immune system: human antibodies from phage display libraries", Em: Protein Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications, Man. Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, págs. 45-64 (1993); Burton e Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries, Id., págs. 65-82). Os anticorpos monoclonais contra STEAP inteiramente humanos podem também ser produzidos utilizando ratinhos transgênicos manipulados para conterem *loci* do gene da imunoglobulina humana tal como descrito na US 6150584 e no pedido de patente PCT W098/24893, publicado em 3 de Dezembro de 1997 (ver também, Jakobovits, Exp. Opin. invest. Drugs 7(4): 607-614, 1998). Este método evita a manipulação *in vitro* necessária com a tecnologia de exibição fágica e produz eficientemente anticorpos humanos autênticos de elevada afinidade.

A reactividade dos anticorpos contra STEAP com a proteína STEAP pode ser estabelecida por vários meios bem conhecidos, incluindo as análises *Western blot*, imunoprecipitação, ELISA e FACS utilizando, conforme apropriado, proteínas STEAP, péptidos, células que expressam STEAP ou seus extractos.

Um anticorpo contra STEAP, ou seu fragmento, da invenção, pode ser marcado com um marcador detectável ou conjugado com uma segunda molécula, tal como uma citotoxina ou outro agente terapêutico, e utilizado para direcção da segunda molécula para uma célula positiva para STEAP (Vitetta, E.S. et al., 1993, "Immunotoxin therapy", em DeVita, Jr., V.T. et al., eds, Cancer: Principles and Practice of Oncology. 4nd ed., J.B. Lippincott Co., Philadelphia, 2624-2636). Os exemplos de agentes citotóxicos incluem, mas não se lhes limitam, ricina, cadeia A de ricina, doxorubicina, maitansinóides, daunorubicina, taxol, brometo de etídio, mitomicina, etoposido, tenoposido, vincristina, vinblastina, colchicina, di-hidroxi-antracínodiona, actinomicina, toxina da difteria, exotoxina de *Pseudomonas* (PE) A, PE40, abrina, cadeia A de abrina, cadeia A de modicina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, caliqueamicina, inibidor de *Sapaonaria officinalis* e glucocorticóide e outros agentes quimioterapêuticos, assim como radioisótopos tais como ²¹²Bi, ¹³¹I, ¹³¹In, ⁹⁰Y e ¹⁸⁶Re. Os

marcadores detectáveis adequados incluem, mas não se lhes limitam, um radioisótopo, um composto fluorescente, um composto bioluminescente, um composto quimioluminescente, um quelante de metal ou uma enzima. Os anticorpos podem também ser conjugados a uma enzima activadora de um pró-fármaco anti-canceroso capaz de converter o pró-fármaco na sua forma activa. Veja-se, por exemplo, a Patente US 4975287.

Adicionalmente, os anticorpos biespecíficos específicos para dois ou mais epítomos de STEAP, podem ser gerados utilizando métodos genericamente conhecidos na especialidade. Adicionalmente, as funções efectoras do anticorpo podem ser modificadas para melhorar o efeito terapêutico de anticorpos de STEAP sobre células cancerosas. Por exemplo, resíduos de cisteína podem ser manipulados na região Fc, permitindo a formação de ligações dissulfureto intercadeias e a geração de homodímeros que podem ter capacidades melhoradas para internalização, ADCC e/ou morte celular mediada pelo complemento (veja-se, por exemplo, Caron *et al.*, 1992, J. Exp. Med. 176: 1191-1195; Shopes, 1992, J. Immunol. 148: 2918-2922). Anticorpos homodiméricos podem também ser gerados por técnicas de ligação cruzada conhecidas na especialidade (*e.g.*, Wolff *et al.*, Cancer Res. 53: 2560-2565).

ANIMAIS TRANSGÉNICOS DE STEAP

Ácidos nucleicos que codificam STEAP ou suas formas modificadas podem também ser utilizados para gerar animais transgénicos ou animais "knock out" que, por sua vez, são úteis no desenvolvimento e rastreio de reagentes terapeuticamente úteis. Um animal transgénico (*e.g.*, um ratinho ou um rato) é um animal possuindo células que contêm um transgene, transgene esse que foi introduzido no animal ou num antecessor do animal num estágio pré-natal, *e.g.*, um estágio embrionário. Um transgene é um ADN que está integrado no genoma de uma célula a partir da qual se desenvolve um animal transgénico. Numa concretização, ADNc que codifica STEAP pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica STEAP de acordo com técnicas estabelecidas e as sequências genómicas utilizadas para gerar animais transgénicos que contêm células que expressam ADN que codifica STEAP.

Os métodos para gerar animais transgénicos, particularmente animais tais como ratinhos ou ratos, tornaram-se convencionais na especialidade e estão descritos, por exemplo, nas Patentes U.S. 4736866 e 4870009. Tipicamente, células particulares serão seleccionadas para incorporação do transgene de STEAP com potenciadores específicos de tecidos. Os animais transgénicos que incluem uma cópia de um transgene que codifica STEAP introduzido na linha germinal do animal num estágio embrionário podem ser utilizados para examinar o efeito de expressão aumentada de ADN que codifica STEAP. Estes animais podem ser utilizados como animais de teste para reagentes que se pensa conferirem protecção, por exemplo, contra condições patológicas associadas à sua sobre-expressão. De acordo com esta faceta da invenção, um animal é tratado com o reagente e uma incidência reduzida da condição patológica, comparativamente com animais não tratados portadores do transgene, indicaria uma potencial intervenção terapêutica para a condição patológica.

Alternativamente, homólogos não humanos de STEAP podem ser utilizados para construir um animal "knock out" relativamente a STEAP, que possui um gene que codifica STEAP defeituoso ou alterado em resultado de recombinação homóloga entre o gene endógeno que codifica STEAP e o ADN genómico alterado que codifica STEAP introduzido numa célula embrionária do animal. Por exemplo, ADNc que codifica STEAP pode ser utilizado para clonar ADN genómico que codifica STEAP de acordo com técnicas estabelecidas. Uma porção do ADN genómico que codifica STEAP pode ser eliminada ou substituída por outro gene, tal como um gene que codifica um marcador seleccionável que pode ser utilizado para monitorizar a integração.

Tipicamente, são incluídas no vector várias quilobases de ADN flanqueador inalterado (em ambas as extremidades 5' e 3') (veja-se e.g., Thomas e Capecchi, 1987, Cell 51:503 para uma descrição de vectores de recombinação homóloga). O vector é introduzido numa linha de células estaminais embrionárias (e.g., por electroporação) e são seleccionadas células em que o ADN introduzido possui recombinado de forma homóloga com o ADN endógeno (veja-se e.g., Li et al., 1992, Cell 69:915). As células seleccionadas são então injectadas num blastocisto de

um animal (e.g., um ratinho ou um rato) para formar quimeras de agregação (veja-se e.g., Bradley, em Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed., IRL, Oxford, 1987, pp. 113-152).

Um embrião quimérico pode então ser implantado num animal hospedeiro fêmea pseudoprenhe adequada e o embrião levado a termo para criar um animal "*knock out*". A progénie portadora do ADN recombinado de forma homóloga nas suas células germinais pode ser identificada por técnicas padrão e utilizada para criar animais em que todas as células do animal contêm o ADN recombinado de forma homóloga. Os animais *knockout* podem ser caracterizados por exemplo, pela sua capacidade de se defenderem contra determinadas condições patológicas e pelo seu desenvolvimento de condições patológicas devido à ausência do polipéptido de STEAP.

MONITORIZAÇÃO DO ESTADO DE STEAP E SEUS PRODUTOS

Ensaaios que avaliam o estado de um gene de STEAP e produtos de um gene de STEAP num indivíduo podem proporcionar informação sobre o crescimento ou o potencial oncogénico de uma amostra biológica desse indivíduo. Por exemplo, como o ARNm de STEAP é tão altamente expresso na próstata, e não na maioria do tecido normal, e porque a sua expressão está associada a determinados cancros, os ensaios que avaliam os níveis relativos de transcritos de ARNm de STEAP ou proteínas STEAP numa amostra biológica podem ser utilizados para diagnosticar uma doença associada a desregulação de STEAP, tal como cancro ou hiperplasia prostática benigna (BPH), e podem proporcionar informação de prognóstico útil para definir as opções terapêuticas apropriadas. Similarmente, ensaios que avaliam a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de STEAP numa amostra biológica, podem também ser utilizados neste contexto.

A verificação de que o ARNm de STEAP é expresso no cancro da próstata e noutros cancros, e não na maioria do tecido normal, proporciona evidência de que este gene está associado a crescimento celular desregulado e portanto identifica este gene e os seus produtos como alvos que o perito pode utilizar para avaliar amostras biológicas de indivíduos que se suspeita

terem uma doença associada a desregulação de STEAP. Noutro exemplo, porque a expressão de STEAP está normalmente restringida à próstata, pode-se também avaliar amostras biológicas de outros tecidos para detectar expressão de STEAP como uma indicação de metástase. Por exemplo, como apresentado na Figura 31A-F, anticorpos dirigidos contra STEAP-1 proporcionam um marcador superior para a detecção de metástases, em comparação com o marcador convencional do cancro da próstata, o PSA. Este marcador pode ser útil na avaliação de biópsias de tecidos e como parte de estratégias de imagética *in vivo*. Neste contexto, a avaliação do estado de expressão do gene de STEAP e seus produtos pode ser utilizada para obter informação sobre a doença potencial de uma amostra de tecido. A expressão "estado de expressão" neste contexto é utilizada para referir amplamente a variedade de factores envolvidos na expressão, função e regulação de um gene e seus produtos tais como o nível de expressão de ARNm, a integridade dos produtos génicos expressos (tais como as sequências nucleicas e de aminoácidos) e modificações na transcrição e na tradução nestas moléculas.

O estado de expressão de STEAP pode proporcionar informação útil para prever a susceptibilidade a estádios de doença particulares, progressão e/ou agressividade de tumores. A invenção proporciona métodos e ensaios para a determinação do estado de expressão de STEAP-2 e diagnóstico de cancros que expressam STEAP-2, tais como cancros da próstata. O estado de expressão de STEAP em amostras de um paciente pode ser analisado por vários meios bem conhecidos na especialidade, incluindo sem limitação, análise imuno-histoquímica, hibridação *in situ*, análise por RT-PCR em amostras micro-dissectadas por captura a *laser*, análise *Western blot* de amostras clínicas e linhas celulares e análise de tecido. Podem ser encontrados protocolos típicos para a avaliação do estado de expressão do gene de STEAP e produtos génicos, por exemplo em Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 [Northern Blotting], 4 [Southern Blotting], 15 [Immunoblotting] e 18 (PCR Analysis), Frederick M. Ausubul et al. eds., 1995.

São aqui divulgados métodos para a monitorização de produtos do gene de STEAP por determinação do estado de

produtos do gene de STEAP expressos por células numa amostra de tecido de teste de um indivíduo que se suspeita que possua uma doença associada a crescimento celular desregulado (tal como hiperplasia ou cancro) e depois comparação do estado assim determinado com o estado de produtos do gene de STEAP numa amostra normal correspondente, sendo que a presença de um estado aberrante ou alterado de produtos do gene de STEAP na amostra de teste relativamente à amostra normal proporciona uma indicação da presença de crescimento celular desregulado no interior das células do indivíduo.

São aqui adicionalmente divulgados métodos para o exame de uma amostra biológica quanto a evidências de crescimento celular desregulado. Numa concretização, o método compreende a comparação do estado de STEAP na amostra biológica com o estado de STEAP numa amostra normal correspondente, em que alterações no estado de STEAP na amostra biológica estão associadas a crescimento celular desregulado. O estado de STEAP na amostra biológica pode ser avaliado, por exemplo, por exame dos níveis de expressão de ARNm de STEAP ou os níveis de expressão de proteína STEAP. Numa concretização, uma alteração no estado de STEAP é identificada pela presença de células que expressam STEAP numa amostra biológica de um tecido em que as células que expressam STEAP estão normalmente ausentes.

São aqui descritos ensaios úteis na determinação da presença de cancro num indivíduo, compreendendo a detecção de um aumento significativo no ARNm de STEAP ou na expressão da proteína numa célula ou amostra de tecido de teste relativamente aos níveis de expressão na célula ou tecido normais correspondentes. A presença de ARNm de STEAP pode, por exemplo, ser avaliada em amostras de tecido incluindo, mas não se lhes limitando, do cólon, do pulmão, da próstata, do pâncreas, da bexiga, da mama, do ovário, do colo do útero, dos testículos, da cabeça e pescoço, do cérebro, do estômago, do osso, etc.. A presença de expressão significativa de STEAP em qualquer um destes tecidos pode ser útil para indicar a emergência, presença e/ou gravidade destes cancros ou de uma metástase de cancro originária noutro tecido, uma vez que os tecidos normais correspondentes não expressam ARNm de STEAP, ou expressam-no em níveis inferiores.

Numa concretização relacionada, o estado de expressão de STEAP pode ser determinado ao nível da proteína em vez de ao nível do ácido nucleico. Por exemplo, este método ou ensaio compreenderia a determinação do nível de proteína STEAP expressa pelas células numa amostra de tecido de teste e a comparação do nível assim determinado com o nível de STEAP expressa numa amostra normal correspondente. Numa concretização, a presença da proteína STEAP é avaliada, por exemplo, utilizando métodos imuno-histoquímicos. Os anticorpos ou parceiros de ligação de STEAP capazes de detectar a expressão da proteína STEAP podem ser utilizados numa variedade de formatos de ensaio bem conhecidos na especialidade para este fim. Como mostrado nos exemplos anexos, a imunorreactividade de STEAP está associada com cancro da próstata, da bexiga e do pulmão, assim como BPH e metástases de cancro da próstata.

Noutras concretizações relacionadas, pode-se avaliar a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de STEAP numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e similares. Estas concretizações são úteis porque são observadas perturbações nas sequências de nucleótidos e de aminoácidos num grande número de proteínas associadas a um fenótipo de crescimento desregulado (veja-se e.g. Marrogi et al., J. Cutan. Pathol 26(8): 369-378 (1999)). Neste contexto, uma ampla variedade de ensaios para observação de perturbações em sequências de nucleótidos e de aminoácidos são bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, a dimensão e a estrutura de sequências de ácido nucleico ou de aminoácidos de produtos de genes de STEAP podem ser observadas pelos protocolos de *Northern*, *Southern*, *Western*, PCR e sequenciação de ADN aqui discutidos. Em adição, outros métodos para observação de perturbações em sequências de nucleótidos e de aminoácidos tais como análise de polimorfismo de conformação de cadeias simples são bem conhecidos na especialidade (vejam-se e.g. as Patentes U.S. 5382510 e 5952170).

Noutra concretização, pode-se examinar o estado de metilação do gene de STEAP numa amostra biológica. Desmetilação e/ou hipermetilação aberrantes de ilhas de CpG em

regiões reguladoras a 5' do gene ocorrem frequentemente em células imortalizadas e transformadas e podem resultar na expressão alterada de vários genes. Por exemplo, a hipermetilação de promotores da glutathione-S-transferase de classe pi (uma proteína expressa na próstata normal mas não expressa em >90% de carcinomas da próstata) parece silenciar permanentemente a transcrição deste gene e é a alteração genómica mais frequentemente detectada em carcinomas da próstata (De Marzo *et al.*, 1999, Am. J. Pathol. **155**(6): 1985-1992). Em adição, esta alteração está presente em pelo menos 70% dos casos de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) de grau elevado (Brooks *et al.*, 1998, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., **7**:531-536).

Noutro exemplo, a expressão do gene específico de tumor LAGE-I (que não é expresso em próstata normal mas é expresso em 25-50% dos cancros da próstata) é induzida por desoxi-azacitidina em células linfoblastóides, sugerindo que a expressão tumoral se deve a desmetilação (Lethe *et al.*, 1998, Int. J. Cancer **76**(6): 903-908). Neste contexto, uma variedade de ensaios para o exame do estado de metilação de um gene são bem conhecidos na especialidade. Por exemplo, podem-se utilizar em abordagens de hibridação de *Southern* enzimas de restrição sensíveis a metilação que não conseguem clivar sequências que contêm locais CpG metilados de modo a avaliar o estado de metilação global de ilhas de CpG.

Em adição, a MSP (PCR específica de metilação) pode obter rapidamente o perfil do estado de metilação de todos os locais CpG presentes numa ilha de CpG de um determinado gene. Este procedimento envolve a modificação inicial de ADN por bissulfito de sódio (que irá converter todas as citosinas não metiladas em uracilo) seguida de amplificação utilizando iniciadores específicos para ADN metilado *versus* não metilado. Podem também encontrar-se protocolos que envolvem interferência da metilação, por exemplo, em Current Protocols In Molecular Biology, Units 12, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995.

São aqui descritos ensaios úteis na determinação da presença de cancro num indivíduo, compreendendo a detecção de uma alteração significativa nas variantes de *splicing*

alternativo de STEAP expressas numa célula ou amostra de tecido de teste relativamente aos níveis de expressão na célula ou tecido normais correspondentes. A monitorização de variantes de *splicing* alternativo de STEAP é útil porque alterações no *splicing* alternativo de proteínas são sugeridas como um dos passos numa série de eventos que conduzem à progressão de cancro (veja-se e.g. Carstens et al., Oncogene 15(250: 3059-3065 (1997))).

A amplificação de genes proporciona um método adicional de avaliação do estado de STEAP. A amplificação de genes pode ser medida numa amostra directamente, por exemplo, por *Southern blotting* convencional, *Northern blotting* para quantificar a transcrição de ARNm [Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 (1980)], *dot blotting* (análise de ADN), ou hibridação *in situ*, utilizando uma sonda marcada apropriada, com base nas sequências aqui proporcionadas. Alternativamente, podem ser empregues anticorpos que podem reconhecer cópias específicas, incluindo cópias de ADN, cópias de ARN e cópias de híbridas de ADN-ARN ou cópias de ADN-proteína. Os anticorpos por sua vez podem ser marcados e o ensaio pode ser realizado quando a cópia está ligada a uma superfície, de modo que após a formação da cópia sobre a superfície, pode ser detectada a presença de anticorpo ligado à cópia.

Em adição aos tecidos acima discutidos, sangue periférico pode ser convenientemente ensaiado quanto à presença de células cancerosas, incluindo, mas não se lhes limitando, cancro da próstata, utilizando RT-PCR para detectar a expressão de STEAP. A presença de ARNm de STEAP amplificável por RT-PCR proporciona uma indicação da presença do cancro. Estão presentemente a ser avaliados ensaios de detecção por RT-PCR para células tumorais em sangue periférico para utilização no diagnóstico e gestão de vários tumores sólidos humanos. No campo do cancro da próstata, estes incluem ensaios RT-PCR para a detecção de células que expressam PSA e PSM (Verkaik et al., 1997, Urol. Res. 25: 373-384; Ghossein et al., 1995, J. Clin. Oncol. 13:1195-2000; Heston et al., 1995, Clin. Chem. 41: 1687-1688). Os ensaios RT-PCR são bem conhecidos na especialidade.

São aqui descritos métodos para a previsão da susceptibilidade ao desenvolvimento de cancro num indivíduo. Numa concretização, um método para prever a susceptibilidade ao cancro compreende a detecção de ARNm de STEAP ou proteína STEAP numa amostra de tecido, a sua presença indicando susceptibilidade ao cancro, em que o grau de expressão de ARNm de STEAP presente é proporcional ao grau de susceptibilidade. Numa concretização específica, é examinada a presença de STEAP em tecido da próstata, sendo que a presença de STEAP na amostra proporciona uma indicação de susceptibilidade ao cancro da próstata (ou a emergência ou a existência de um tumor na próstata). Numa concretização estreitamente relacionada, pode-se avaliar a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de STEAP numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e similares, sendo que a presença de uma ou mais perturbações em produtos do gene de STEAP na amostra proporcionam uma indicação de susceptibilidade ao cancro (ou a emergência ou existência de um tumor).

São igualmente descritos aqui métodos para calibração da agressividade de tumores. Numa concretização, um método para calibração da agressividade de um tumor compreende a determinação do nível de ARNm de STEAP ou da proteína STEAP expressa pelas células numa amostra do tumor, a comparação do nível assim determinado com o nível de ARNm de STEAP ou de proteína STEAP expressa num tecido normal correspondente do mesmo indivíduo ou numa amostra de referência de tecido normal, em que o grau de ARNm de STEAP ou de expressão da proteína STEAP na amostra de tumor relativamente à amostra normal indica o grau de agressividade. Numa concretização específica, a agressividade dos tumores da próstata é avaliada determinando a extensão em que STEAP é expressa nas células tumorais, sendo que maiores níveis de expressão indicam tumores mais agressivos. Numa concretização estreitamente relacionada, pode-se avaliar a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de STEAP numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e similares, sendo que a presença de uma ou mais perturbações indica tumores mais agressivos.

São aqui também descritos métodos para observação da progressão de uma malignidade num indivíduo ao longo do tempo. Numa concretização, os métodos para observação da progressão de uma malignidade num indivíduo ao longo do tempo compreendem a determinação do nível de ARNm de STEAP ou proteína STEAP expressos por células numa amostra do tumor, a comparação do nível assim determinado com o nível de ARNm de STEAP ou proteína STEAP expressos numa amostra de tecido equivalente tomada do mesmo indivíduo num momento diferente, em que o grau de expressão de ARNm de STEAP ou proteína STEAP na amostra de tumor ao longo do tempo proporciona informação sobre a progressão do cancro. Numa concretização específica, a progressão de um cancro é avaliada por determinação da extensão em que a expressão de STEAP nas células tumorais se altera ao longo do tempo, sendo que maiores níveis de expressão indicam uma progressão do cancro. Numa concretização estreitamente relacionada, pode-se avaliar a integridade de sequências de nucleótidos e de aminoácidos de STEAP numa amostra biológica de modo a identificar perturbações na estrutura destas moléculas tais como inserções, deleções, substituições e similares, sendo que a presença de uma ou mais perturbações indica uma progressão do cancro.

As abordagens de diagnóstico anteriores podem ser combinadas com qualquer uma de uma ampla variedade de protocolos de prognóstico e diagnóstico conhecidos na especialidade. Por exemplo, outra concretização aqui divulgada é dirigida a métodos para observação de uma coincidência entre a expressão de gene de STEAP e produtos do gene de STEAP (ou perturbações no gene de STEAP e produtos do gene de STEAP) e um factor que está associado com malignidade como um meio para diagnosticar e prognosticar o estado de uma amostra de tecido. Neste contexto, podem ser utilizados uma ampla variedade de factores associados a malignidade tais como a expressão de genes de outro modo associados a malignidade (incluindo expressão de PSA, PSCA e PSM) assim como observações citológicas grosseiras (veja-se e.g. Bocking et al., 1984, Anal. Quant. Cytol. 6(2):74-88; Epstein, 1995, Hum. Pathol. 1995 Feb; 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). Os métodos para observação de uma coincidência

entre a expressão de gene de STEAP e produtos do gene de STEAP (ou perturbações no gene de STEAP e produtos do gene de STEAP) e um factor adicional que está associado com malignidade são úteis, por exemplo, porque a presença de um conjunto ou constelação de factores específicos que coincidem proporciona informação crucial para diagnosticar e prognosticar o estado de uma amostra de tecido.

Numa concretização típica, os métodos para observação de uma coincidência entre a expressão do gene de STEAP e produtos do gene de STEAP (ou perturbações no gene de STEAP e produtos do gene de STEAP) e um factor que está associado a malignidade implica a detecção de sobre-expressão de ARNm de STEAP ou proteína STEAP numa amostra de tecido, a detecção da sobre-expressão de ARNm de PSA ou proteína PSA numa amostra de tecido, e a observação de uma coincidência de sobre-expressão de ARNm de STEAP ou proteína STEAP e ARNm de PSA ou proteína PSA. Numa concretização específica, é examinada a expressão de ARNm de STEAP e PSA em tecido da próstata. Numa concretização preferida, a coincidência de sobre-expressão de ARNm de STEAP e PSA na amostra proporciona uma indicação de cancro da próstata, susceptibilidade a cancro da próstata ou a emergência ou existência de um tumor na próstata.

Os métodos para a detecção e quantificação da expressão de ARNm ou proteína STEAP são aqui descritos e utilizam tecnologias padrão de detecção e quantificação de ácidos nucleicos e proteínas bem conhecidas na especialidade. Os métodos padrão para a detecção e quantificação de ARNm de STEAP incluem hibridação *in situ* utilizando ribossondas de STEAP marcadas, técnicas de *Northern blot* e relacionadas utilizando sondas polinucleotídicas de STEAP, análise por RT-PCR utilizando iniciadores específicos para STEAP e outros métodos de detecção de tipo amplificação, tais como, por exemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA e semelhantes. Numa concretização específica, pode ser utilizada RT-PCR semi-quantitativa para detectar e quantificar a expressão de ARNm de STEAP tal como descrito nos Exemplos que se seguem. Podem ser utilizados para este fim um qualquer número de iniciadores capazes de amplificar STEAP, incluindo, mas não se lhes limitando, os vários conjuntos de iniciadores especificamente aqui descritos. Os métodos padrão para a detecção e

quantificação de proteína podem ser utilizados para este fim. Numa concretização específica, anticorpos policlonais ou monoclonais especificamente reactivos com a proteína STEAP de tipo selvagem podem ser utilizados num ensaio imuno-histoquímico de tecido de biópsia. Anticorpos dirigidos contra proteína STEAP podem também ser utilizados para detectar STEAP num espécime de um paciente (e.g., sangue, urina, sémen ou outra amostra) utilizando técnicas convencionais tais como selecção de células activada por fluorescência (FACS) e/ou ELISA.

IDENTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS QUE INTERACTUAM COM STEAP

As sequências de proteínas STEAP aqui divulgadas permitem ao perito identificar proteínas, moléculas pequenas e outros agentes que interactuam com STEAP e vias activadas por STEAP através de qualquer um de uma variedade de protocolos aceites na especialidade. Por exemplo, pode-se utilizar um da variedade dos denominados sistemas de ratoeira de interacção (também referidos como o "ensaio de dois híbridos"). Nestes sistemas, moléculas que interactuam reconstituem um factor de transcrição e dirigem a expressão de um gene repórter, cuja expressão é depois ensaiada. Os sistemas típicos identificam interacções proteína-proteína *in vivo* através da reconstituição de um activador de transcrição eucariota e estão divulgados por exemplo nas Patentes U.S. 5955280, 5925523, 5846722 e 6004746.

Alternativamente podem-se identificar moléculas que interactuam com sequências de proteína STEAP através de rastreio de bibliotecas peptídicas. Nestes métodos, péptidos que se ligam a moléculas receptoras seleccionadas tais como STEAP são identificadas através do rastreio de bibliotecas que codificam uma colecção aleatória ou controlada de aminoácidos. Os péptidos codificados pelas bibliotecas são expressos na forma de proteínas de fusão de proteínas do revestimento de bacteriófagos, e partículas bacteriofágicas são então rastreadas contra os receptores de interesse. Os péptidos que possuem uma ampla variedade de utilizações, tais como reagentes terapêuticos ou de diagnóstico, podem assim ser identificados sem qualquer informação prévia sobre a estrutura da molécula de ligando ou receptor esperada. As bibliotecas

peptídicas típicas e os métodos de rastreio que podem ser utilizados para identificar moléculas que interactuam com sequências de proteína STEAP estão divulgados por exemplo nas Patentes U.S. 5723286 e 5733731.

Alternativamente, as linhas celulares que expressam STEAP podem ser utilizadas para identificar interacções proteína-proteína mediadas por STEAP. Esta possibilidade pode ser examinada utilizando técnicas de imunoprecipitação como mostrado por outros (Hamilton BJ, *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261:646-51). Tipicamente, a proteína STEAP pode ser imunoprecipitada a partir de linhas celulares de cancro da próstata que expressam STEAP utilizando anticorpos anti-STEAP. Alternativamente, podem utilizar-se anticorpos contra o marcador His numa linha celular manipulada para expressar STEAP (vectores mencionados acima). O complexo imunoprecipitado pode ser examinado quanto a associação da proteína por procedimentos tais como *Western blotting*, marcação com ³⁵S-metionina de proteínas, micro-sequenciação de proteínas, coloração com prata e electroforese em gel bidimensional.

Moléculas pequenas que interactuam com STEAP podem ser identificadas através de concretizações relacionadas destes ensaios de rastreio. Por exemplo, podem ser identificadas moléculas pequenas que interferem com a função de STEAP, incluindo moléculas que interferem com a capacidade de STEAP se ligar a células e/ou modular a formação, progressão, migração e/ou apoptose tumorais. Os métodos típicos estão discutidos por exemplo na Patente U.S. 5928868 e incluem métodos para formação de ligandos híbridos em que pelo menos um ligando é uma molécula pequena. Numa concretização ilustrativa, o ligando híbrido é introduzido em células que por sua vez contêm um primeiro e um segundo vectores de expressão. Cada vector de expressão inclui ADN para expressão de uma proteína híbrida que codifica uma proteína alvo ligada a uma sequência de codificação para um módulo de transcrição. As células contêm ainda um gene repórter, cuja expressão é condicionada pela proximidade das primeira e segunda proteínas híbridas uma em relação à outra, um evento que ocorre apenas se o ligando híbrido se liga a locais alvo em ambas as proteínas híbridas. As células que expressam o gene repórter

são seleccionadas e é identificada a molécula pequena desconhecida ou a proteína híbrida desconhecida.

É aqui descrito um método de rastreio para uma molécula que interactua com uma sequência de aminoácidos de STEAP apresentada na Fig. 11A-B, compreendendo os passos de contacto de uma população de moléculas com a sequência de aminoácidos de STEAP, permissão para que a população de moléculas e a sequência de aminoácidos de STEAP interactuem sob condições que facilitam uma interacção, determinação da presença de uma molécula que interactua com a sequência de aminoácidos de STEAP e depois separação das moléculas que não interactuam com a sequência de aminoácidos de STEAP das moléculas que interactuam com a sequência de aminoácidos de STEAP. Numa concretização específica, o método inclui ainda a purificação de uma molécula que interactua com a sequência de aminoácidos de STEAP. Numa concretização preferida, a sequência de aminoácidos de STEAP é colocada em contacto com uma biblioteca de péptidos. Ensaio adicionais para a identificação de moléculas que modulam a função de STEAP estão descritos nos Exemplos que se seguem.

É aqui também descrito um método de rastreio para uma molécula que modula a actividade de STEAP ou uma via relacionada com STEAP. O método compreende o contacto de uma molécula com uma célula que expressa uma proteína STEAP e a determinação da actividade de STEAP ou uma via relacionada com STEAP. A determinação pode ser através da utilização de um dos ensaios de fosforilação descritos nos exemplos que se seguem, tais como *Western blotting* com um anticorpo dirigido contra moléculas de sinalização fosforiladas. Alterações na fosforilação da molécula de sinalização indicam uma molécula candidata que modula a actividade de STEAP ou uma via relacionada com STEAP.

MÉTODO E COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICOS

A identificação de STEAP como proteína do cancro da próstata abre um número de abordagens terapêuticas para o tratamento de cancros da próstata e outros cancros associados a STEAP. Como discutido acima, a STEAP é uma proteína transmembranar, e a sua interacção com outras células e

moléculas provavelmente desempenha um papel na regulação do ambiente da próstata e a iniciação, desenvolvimento e/ou progressão de cancro. A STEAP pode ser tomada como alvo para terapia através de abordagens apontadas à inibição da actividade da proteína STEAP, inibição da ligação ou associação de proteína STEAP com outras células e moléculas, inibição da transcrição ou tradução de STEAP, e/ou através da utilização de vacinas contra o cancro baseadas em STEAP. A estratégia terapêutica pode assim ser desenhada para inibir uma função da molécula ou para ter como alvo a própria molécula de STEAP.

O perfil de expressão de STEAP é remanescente dos MAGE, PSA e PMSA, que são genes específicos dos tecidos que são supra-regulados em melanomas e outros cancros (Van den Eynde e Boon, Int J Clin Lab Res. 27:81-86, 1997). Devido à sua expressão específica do tecido e níveis elevados de expressão no cancro, estas moléculas estão correntemente a ser investigadas como alvos para vacinas contra o cancro (Durrant, Anticancer Drugs 8:727-733, 1997; Reynolds et al., Int J Cancer 72:972-976, 1997). O padrão de expressão de STEAP proporciona evidência de que é do mesmo modo um alvo ideal para uma abordagem de vacina contra o cancro para o cancro da próstata, pois a sua expressão não é detectada na maioria dos tecidos normais.

Assim, abordagens terapêuticas dirigidas a motivos particulares de STEAP, ou com objectivo na inibição da actividade da proteína STEAP, esperam-se úteis para pacientes que sofrem de cancro da próstata e outros cancros que expressam STEAP. As abordagens terapêuticas com objectivo na inibição da actividade da proteína STEAP geralmente caem em duas classes. Uma classe compreende vários métodos para a inibição da ligação ou associação da proteína STEAP com o seu parceiro de ligação ou com outras proteínas. Outra classe compreende uma variedade de métodos para a inibição da transcrição do gene de STEAP ou da tradução de ARNm de STEAP.

STEAP como Alvo para Terapia à Base de Anticorpos

A natureza de superfície celular e os perfis de expressão das STEAP em cancros incluindo o cancro da próstata indicam

que estas são alvos promissores para terapia com anticorpos do cancro da próstata e outros cancros que expressam STEAP. Os resultados experimentais descritos aqui nos Exemplos proporcionam provas convincentes de que a STEAP-1 e a STEAP-2 são fortemente expressas uniformemente sobre a superfície de células epiteliais glandulares no interior de células da próstata e de cancro da próstata. Em particular, os resultados da análise imuno-histoquímica mostram que a superfície de células epiteliais da próstata humanas (normais e de cancro) parece estar uniformemente revestida com STEAP-1. A análise bioquímica confirma a localização na superfície celular de STEAP-1 inicialmente sugerida pelos seus 6 elementos transmembranares da estrutura primária putativos e pela claramente evidente coloração pericelular por coloração imuno-histoquímica.

A STEAP-1 e a STEAP-2 são uniformemente expressas em níveis elevados sobre a superfície do epitélio glandular da próstata, uma situação ideal para estratégias de intervenção imunoterapêutica que tenham como alvo epítomos extracelulares de STEAP. Espera-se que a administração sistémica de composições imunorreactivas com STEAP resulte em contacto extensivo da composição com células epiteliais da próstata através de ligação a epítomos extracelulares de STEAP. Para além disso, dada a quase ausência de expressão de proteína STEAP-1 em tecidos humanos normais, existem várias razões para esperar uma sensibilidade refinada sem efeitos tóxicos, não específicos e/ou não direccionados causados pela ligação da composição imunoterapêutica a STEAP-1 em órgãos e tecidos não alvo.

Para além da expressão de nível elevado de STEAP-1 na próstata e células de cancro da próstata, a STEAP-1 parece ser substancialmente sobre-expressa numa variedade de outros cancros humanos, incluindo os cancros da bexiga, do pulmão, do cólon, do pâncreas e do ovário. Em particular, é detectado um nível elevado de expressão de ARNm de STEAP-1 em todos os tecidos e linhas celulares de cancro da próstata testados e na maioria das linhas celulares de cancro pancreático, do cólon e da bexiga testadas. É também observado elevado nível de expressão de STEAP-1 em algumas linhas celulares de cancro ovariano. É observado um nível de expressão inferior em

algumas linhas celulares de cancro da mama, testicular e cervical. É também detectado um nível de expressão muito elevado numa linha celular de sarcoma de Ewing. Os requerentes mostraram que a proteína STEAP-1 da superfície celular é expressa em cancros da bexiga, do pulmão e do cólon, enquanto não é detectável proteína STEAP-1 da superfície celular (ou intracelular) em cólon normal e é detectada baixa expressão em bexiga normal. Os anticorpos especificamente reactivos com domínios extracelulares de STEAP-1 podem ser úteis para tratar estes cancros sistemicamente, conjugados com toxinas ou agentes terapêuticos, ou na forma de anticorpos nus capazes de inibir a proliferação ou função celulares.

A proteína STEAP-2 é também expressa no cancro da próstata, assim como em outros cancros, incluindo os cancros do cólon e do pulmão. A análise de ARNm de STEAP-2 por RT-PCR e *Northern blot* mostram que a expressão está restringida à próstata em tecidos normais, é também expressa em alguns cancros da próstata, pancreáticos, do cólon, testiculares, ovarianos e outros. Portanto, anticorpos reactivos com STEAP-2 podem ser úteis no tratamento de cancros da próstata e outros cancros. Similarmente, a expressão de STEAP-3 e STEAP-4 (assim como de outras STEAP) pode estar associada a alguns cancros. Assim, anticorpos reactivos com estas proteínas membros da família STEAP podem ser também úteis terapeuticamente.

Os anticorpos contra STEAP podem ser introduzidos num paciente de modo que o anticorpo se liga a STEAP nas células cancerosas e medeia a destruição das células e do tumor, inibe o crescimento das células ou do tumor e/ou elimina a função de STEAP no tumor primário, em micrometástases em circulação e/ou em metástases estabelecidas. O grau de vascularização do tumor pode proporcionar uma orientação sobre que abordagem de entrega é recomendada. Similarmente, será de esperar que o grau e/ou estágio da doença proporcionem informação útil a este respeito. Por exemplo, um maior grau, um tumor mais avançado, podem mais provavelmente lançar metástases, sugerindo uma administração sistémica de modo a tratar ou prevenir a emergência de metástases. Os mecanismos através dos quais estes anticorpos exercem um efeito terapêutico podem incluir citólise mediada pelo complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpos, modulação da função

fisiológica de STEAP, inibição da ligação do ligando ou das vias de transdução de sinal, modulação da diferenciação de células tumorais, alteração dos perfis dos factores de angiogénese tumoral e/ou por indução de apoptose. Os anticorpos de STEAP conjugados com agentes tóxicos ou terapêuticos podem também ser utilizados terapeuticamente para entregar o agente tóxico ou terapêutico directamente a células tumorais portadoras de STEAP.

A imunoterapia do cancro utilizando anticorpos anti-STEAP pode seguir os ensinamentos gerados a partir de várias abordagens que foram utilizadas com sucesso no tratamento de outros tipos de cancro, incluindo, mas não se lhes limitando, cancro do cólon (Arlen *et al.*, Crit. Rev. Immunol. 18: 133-138, 1998), mieloma múltiplo (Ozaki *et al.*, Blood 90: 3179-3186, 1997; Tsunenari *et al.*, Blood 90: 2437-2444, 1997), cancro gástrico (Kasprzyk *et al.*, Cancer Res. 52: 2771-2776, 1992), linfoma de células B (Funakoshi *et al.*, J. Immunother. Emphasis. Tumor Immunol. 19: 93-101, 1996), leucemia (Zhong *et al.*, Leuk. Res. 20: 581-589, 1996), cancro colorrectal (Moun *et al.*, Cancer Res. 54: 6160-6166, 1994); Velders *et al.*, Cancer Res. 55: 4398-4403, 1995) e cancro da mama (Shepard *et al.*, J. Clin. Immunol. 11: 117-127, 1991). Algumas abordagens terapêuticas envolvem a conjugação de anticorpo nu com uma toxina, tal como a conjugação de ¹³¹I com anticorpos anti-CD20 (e.g., Bexxar, Coulter Pharmaceutical), enquanto outras envolvem a co-administração de anticorpos e outros agentes terapêuticos, tais como Herceptin[™] (trastuzumab) com paclitaxel (Genentech, Inc.). Para o tratamento do cancro da próstata, por exemplo, anticorpos de STEAP podem ser administrados em conjunto com radiação, quimioterapia ou ablação hormonal.

Embora a terapia com anticorpos contra STEAP possa ser útil para todos os estádios do cancro, a terapia com anticorpos pode ser particularmente apropriada em cancros avançados ou metastáticos. O tratamento com a terapia com anticorpos da invenção pode ser indicado para pacientes que tenham recebido anteriormente uma ou mais quimioterapias, embora a combinação da terapia com anticorpos da invenção com um regime quimioterapêutico ou de radiação possa ser preferida para pacientes que não tenham recebido tratamento

quimioterapêutico. Adicionalmente, a terapia com anticorpos pode permitir a utilização de dosagens reduzidas de quimioterapia concomitante, particularmente para pacientes que não toleram muito bem a toxicidade do agente quimioterapêutico.

Pode ser desejável que alguns pacientes de cancro sejam avaliados quanto à presença e nível de expressão de STEAP, preferivelmente utilizando avaliações imuno-histoquímicas de tecido tumoral, imagética quantitativa de STEAP ou outras técnicas capazes de indicar com confiança a presença e o grau de expressão de STEAP. Para este fim pode ser preferida a análise imuno-histoquímica de biópsias tumorais ou de espécimes cirúrgicos. Os métodos para análise imuno-histoquímica de tecidos tumorais são bem conhecidos na especialidade.

Os anticorpos monoclonais anti-STEAP úteis no tratamento de cancros da próstata e outros cancros incluem os que são capazes de iniciar uma potente resposta imunitária contra o tumor e os que são capazes de dirigir citotoxicidade. A este respeito, os anticorpos monoclonais (mAb) anti-STEAP podem elicitar lise de células tumorais através de mecanismos mediados pelo complemento ou de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), ambos requerendo uma porção Fc intacta da molécula de imunoglobulina para interacção com locais receptores de Fc da célula efectora ou proteínas do complemento. Adicionalmente, os mAb anti-STEAP que exercem um efeito biológico directo no crescimento tumoral são úteis na prática da invenção. Potenciais mecanismos através dos quais estes mAb directamente citotóxicos podem actuar incluem a inibição do crescimento celular, a modulação da diferenciação celular, a modulação dos perfis de factores de angiogénese tumoral e a indução de apoptose. O mecanismo através do qual um determinado mAb anti-STEAP exerce um efeito antitumoral pode ser avaliado utilizando um qualquer número de ensaios *in vitro* desenhados para determinar ADCC, ADMMC, lise celular mediada pelo complemento e similares, tal como é geralmente conhecido na especialidade.

A actividade antitumoral de um determinado mAb anti-STEAP ou combinação de mAb anti-STEAP, pode ser avaliada *in vivo*

utilizando um modelo animal adequado. Por exemplo, modelos de cancro da próstata xenogénicos em que explantes de cancro da próstata humano ou tecidos de xenoenxertos passados são introduzidos em animais imunocomprometidos, tais como ratinhos nus ou SCID, são apropriados em relação ao cancro da próstata e foram descritos (Patente US 6107540; Klein *et al.*, Nature Medicine 3: 402-408, 1997). Por exemplo, o Pedido de Patente PCT WO98/16628, Sawyers *et al.*, publicado a 23 de Abril de 1998, descreve vários modelos de xenoenxerto de cancro da próstata humano capazes de recapitular o desenvolvimento de tumores primários, micrometástases e a formação de metástases osteoblásticas características de doença em estágio tardio. A eficácia pode ser prevista utilizando ensaios que medem a inibição da formação de tumores, a regressão tumoral ou a metástase e semelhantes.

A utilização de anticorpos monoclonais murinos ou de outros animais não humanos, ou de mAb quiméricos humano/ratinho pode induzir respostas imunitárias moderadas a fortes nalguns pacientes. Em alguns casos, isto resultará numa depuração do anticorpo da circulação e eficácia reduzida. Nos casos mais graves uma tal resposta imunitária pode conduzir à extensa formação de complexos imunitários que podem, potencialmente, causar insuficiência renal. Assim, os anticorpos monoclonais preferidos utilizados na prática dos métodos terapêuticos da invenção são os que são completamente humanos ou humanizados e que se ligam especificamente ao antigénio de STEAP alvo com elevada afinidade mas exibem baixa ou nenhuma antigenicidade no paciente.

Os métodos terapêuticos da invenção contemplam a administração de mAb anti-STEAP individualmente assim como de combinações ou "*cocktails*" de diferentes mAb. Estes *cocktails* de mAb podem ter certas vantagens na medida em que contêm mAb que têm como alvo diferentes epítomos, exploram diferentes mecanismos efectores ou combinam mAb directamente citotóxicos com mAb que assentam numa funcionalidade efectora imunitária. Estes mAb em combinação podem exibir efeitos terapêuticos sinérgicos. Adicionalmente, a administração de mAb anti-STEAP pode ser combinada com outros agentes terapêuticos, incluindo, mas não se lhes limitando, vários agentes quimioterapêuticos, bloqueadores de androgénios e moduladores imunitários (e.g.,

IL-2, GM-CSF). Os mAb anti-STEAP podem ser administrados na sua forma "nua" ou não conjugada, ou podem possuir agentes terapêuticos conjugados.

Os anticorpos monoclonais anti-STEAP utilizados na prática do método da invenção podem ser formulados em composições farmacêuticas compreendendo um transportador adequado para o método de entrega desejado. Os transportadores adequados incluem qualquer material que quando combinado com os mAb anti-STEAP retêm a função antitumoral do anticorpo e não são reactivos com o sistema imunitário do indivíduo. Os exemplos incluem, mas não se lhes limitam, qualquer um de vários transportadores farmacêuticos padrão tais como soluções salinas tamponadas com fosfato estéreis, água bacteriostática e semelhantes.

As formulações de anticorpos anti-STEAP podem ser administradas através de qualquer via capaz de entregar os anticorpos ao local do tumor. Vias de administração potencialmente eficazes incluem, mas não se lhes limitam, a intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica e semelhantes. A via de administração preferida é através de injeção intravenosa. Uma formulação preferida para injeção intravenosa compreende os mAb anti-STEAP numa solução de água bacteriostática conservada, água não conservada estéril e/ou diluídos em sacos de poli(cloreto de vinilo) ou polietileno contendo Cloreto de Sódio estéril a 0,9% para injeção, USP. A preparação de mAb anti-STEAP pode ser liofilizada e armazenada na forma de um pó estéril, preferivelmente sob vácuo, e depois reconstituída em água bacteriostática contendo, por exemplo, conservante álcool benzílico, ou em água estéril antes da injeção.

O tratamento geralmente envolverá a administração repetida da preparação de anticorpo anti-STEAP através de uma via de administração aceitável tal como injeção intravenosa (IV), tipicamente numa dose na gama de cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg de peso corporal. Doses na gama de 10-500 mg de mAb por semana podem ser eficazes e bem toleradas. Com base na experiência clínica com o mAb Herceptin no tratamento de cancro da mama metastático, uma dose de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal do paciente IV

seguida de doses semanais de cerca de 2 mg/kg IV da preparação de mAb anti-STEAP podem representar um regime de dosagem aceitável. Preferivelmente, a dose de carga inicial é administrada na forma de uma infusão de 90 minutos ou mais. A dose de manutenção periódica pode ser administrada na forma de uma infusão de 30 minutos ou mais, desde que a dose inicial fosse bem tolerada. No entanto, tal como um perito na especialidade entenderá, vários factores influenciarão o regime de dose ideal num caso particular. Esses factores podem incluir, por exemplo, a afinidade de ligação e a semivida do mAb ou dos mAb utilizados, o grau de sobre-expressão de STEAP no paciente, a extensão do antigénio STEAP derramado em circulação, o nível de concentração de anticorpo em estado estacionário desejado, a frequência do tratamento e a influência dos agentes quimioterapêuticos utilizados em combinação com o método de tratamento da invenção.

De modo óptimo, os pacientes deverão ser avaliados quanto ao nível sérico de antigénio STEAP derramado em circulação para ajudar na determinação do regime de dosagem mais eficaz e factores relacionados. Estas avaliações podem também ser utilizadas para fins de monitorização ao longo da terapia e podem ser úteis para calibrar o sucesso terapêutico em combinação com a avaliação de outros parâmetros (tais como os níveis séricos de PSA em terapia de cancro da próstata).

Inibição da Função da Proteína STEAP

São aqui descritos vários métodos e composições para a inibição da ligação de STEAP ao seu parceiro de ligação ou ligando, ou a sua associação com outra(s) proteína(s) assim como métodos para a inibição da função de STEAP.

Inibição de STEAP Com Proteínas Recombinantes

Numa abordagem, moléculas recombinantes que são capazes de se ligar a STEAP e desse modo impedir que a STEAP aceda/se ligue ao(s) seu(s) parceiro(s) de ligação ou se associe com outra(s) proteína(s), são utilizadas para inibir a função de STEAP. Estas moléculas recombinantes podem, por exemplo, conter a(s) parte(s) reactiva(s) de uma molécula de anticorpo específico de STEAP. Numa concretização particular, o domínio de ligação a STEAP de um parceiro de ligação de STEAP pode ser

manipulado numa proteína de fusão dimérica compreendendo dois domínios de ligação a ligandos de STEAP ligados à porção Fc de uma IgG humana, tal como IgG1 humana. Esta porção de IgG pode conter, por exemplo, os domínios C_H2 e C_H3 e a região de charneira, mas não o domínio C_H1. Estas proteínas de fusão diméricas podem ser administradas na forma solúvel a pacientes que sofrem de um cancro associado à expressão de STEAP, incluindo, mas não se lhes limitando, cancro da próstata, onde a proteína de fusão dimérica se liga especificamente a STEAP, desse modo bloqueando a interacção de STEAP com um parceiro de ligação e/ou modulando a função de STEAP. Estas proteínas de fusão diméricas podem ainda ser combinadas em proteínas multiméricas utilizando tecnologias de ligação a anticorpos conhecidas.

Inibição de STEAP Com Anticorpos Intracelulares

Noutra abordagem, vectores recombinantes que codificam anticorpos de cadeia simples que se ligam especificamente a STEAP podem ser introduzidos em células que expressam STEAP por meios de tecnologias de transferência de genes, em que o anticorpo anti-STEAP de cadeia simples codificado é expresso intracelularmente, liga-se a proteína STEAP, e desse modo inibe a sua função. Os métodos para a manipulação destes anticorpos de cadeia simples intracelulares são bem conhecidos. Estes anticorpos intracelulares, também conhecidos como "intracorpos", podem ser especificamente direccionados para um compartimento particular no interior da célula, proporcionando controlo sobre onde será focada a actividade inibidora do tratamento. Esta tecnologia foi aplicada com sucesso na especialidade (para revisão, veja-se Richardson e Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13). Mostrou-se que os intracorpos eliminam virtualmente a expressão de receptores da superfície celular de outro modo abundantes. Veja-se, por exemplo, Richardson *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli *et al.*, 1994, J. Biol. Chem. 269: 23931-23936; Deshane *et al.*, 1994, Gene Ther. 1: 332-337.

Os anticorpos de cadeia simples compreendem os domínios variáveis da cadeia pesada e leve unidos por um ligante polipeptídico flexível, e são expressos na forma de um único polipeptídeo. Opcionalmente, os anticorpos de cadeia simples

podem ser expressos na forma de um fragmento da região variável de cadeia simples unido à região constante da cadeia leve. Sinais de tráfico intracelular bem conhecidos podem ser manipulados em vectores polinucleotídicos recombinantes que codificam estes anticorpos de cadeia simples de modo a direccionar precisamente o intracorpo expresso para o compartimento intracelular desejado. Por exemplo, intracorpos direccionados para o retículo endoplasmático (RE) podem ser manipulados para incorporar um péptido de comando e, opcionalmente, um sinal de retenção no RE C-terminal, tal como o motivo de aminoácidos KDEL. Os intracorpos destinados a exercer actividade no núcleo podem ser manipulados para incluir um sinal de localização nuclear. Porções lipídicas podem ser unidas a intracorpos de modo a amarrar o intracorpo no lado citosólico da membrana plasmática. Os intracorpos podem também ser direccionados para exercer função no citosol. Por exemplo, os intracorpos citosólicos podem ser utilizados para sequestrar factores no interior do citosol, desse modo impedindo-os de serem transportados para o seu destino celular natural.

Numa concretização, os intracorpos de STEAP são desenhados para se ligarem especificamente a um domínio particular de STEAP. Por exemplo, os intracorpos citosólicos que se ligam especificamente à proteína STEAP podem ser utilizados para impedir que moléculas relacionadas com STEAP tenham acesso ao núcleo, desse modo impedindo-as de exercer qualquer actividade biológica no interior do núcleo.

De modo a dirigir a expressão destes intracorpos especificamente para células tumorais particulares, a transcrição do intracorpo pode ser colocada sob o controlo regulador de um promotor e/ou potenciador específicos do tumor apropriados. De modo a direccionar a expressão do intracorpo especificamente para a próstata, por exemplo, pode-se utilizar o promotor e/ou o promotor/potenciador de PSA (Veja-se, por exemplo, a Patente U.S. 5919652).

Inibição da Transcrição ou da Tradução de STEAP

Noutra classe de abordagens terapêuticas, são aqui descritos métodos e composições para a inibição da transcrição do gene de STEAP. Similarmente, são aqui descritos métodos e

composições para a inibição da tradução de ARNm de STEAP na proteína.

Numa abordagem, um método de inibição da transcrição do gene de STEAP compreende o contacto do gene de STEAP com um polinucleótido anti-sentido de STEAP. Noutra abordagem, um método de inibição da tradução de ARNm de STEAP compreende o contacto do ARNm de STEAP com um polinucleótido anti-sentido. Noutra abordagem, uma ribozima específica de STEAP pode ser utilizada para clivar a mensagem de STEAP, desse modo inibindo a tradução. Estes métodos à base de anti-sentido e ribozima podem também ser dirigidos para as regiões reguladoras do gene de STEAP, tais como os elementos promotor e/ou potenciador de STEAP. Similarmente, proteínas capazes de inibir um factor de transcrição do gene de STEAP podem ser utilizadas para inibir a transcrição de ARNm de STEAP. Os vários polinucleótidos e composições úteis nos métodos supramencionados foram descritos acima. A utilização de moléculas anti-sentido e de ribozima para inibir a transcrição e a tradução é bem conhecida na especialidade.

Outros factores que inibem a transcrição de STEAP através da interferência com a activação da transcrição de STEAP podem também ser úteis para o tratamento de cancros que expressam STEAP. Similarmente, os factores que são capazes de interferir com o processamento de STEAP podem ser úteis para o tratamento de cancros que expressam STEAP. Os métodos de tratamento de cancro utilizando estes factores estão também dentro do âmbito da invenção.

Considerações Gerais para Estratégias Terapêuticas

As tecnologias de transferência de genes e terapia génica podem ser utilizadas para a entrega de moléculas polinucleotídicas terapêuticas a células tumorais que sintetizam STEAP (*i.e.*, anti-sentido, ribozima, polinucleótidos que codificam intracópos e outras moléculas inibidoras de STEAP). Várias abordagens de terapia génica são conhecidas na especialidade. Vectores recombinantes que codificam polinucleótidos anti-sentido de STEAP, ribozimas, factores capazes de interferir com a transcrição de STEAP, e

assim por diante, podem ser entregues a células tumorais alvo utilizando estas abordagens de terapia génica.

As abordagens terapêuticas anteriores podem ser combinadas com qualquer um de uma ampla variedade de regimes de quimioterapia ou terapia de radiação. Estas abordagens terapêuticas podem também permitir a utilização de dosagens reduzidas e/ou a administração menos frequente de quimioterapia, particularmente em pacientes que não toleram bem a toxicidade do agente quimioterapêutico.

A actividade antitumoral de uma composição particular (e.g., anti-sentido, ribozima, intracampo), ou de uma combinação destas composições, pode ser avaliada utilizando vários sistemas de ensaio *in vitro* e *in vivo*. Os ensaios *in vitro* para a avaliação do potencial terapêutico incluem ensaios de crescimento celular, ensaios em ágar mole e outros ensaios indicativos de actividade promotora de tumores, ensaios de ligação capazes de determinar a extensão a que uma composição terapêutica irá inibir a ligação de STEAP a um parceiro de ligação, etc.

In vivo, o efeito de uma composição terapêutica de STEAP pode ser avaliado num modelo animal adequado. Por exemplo, os modelos de cancro da próstata xenogénico em que explantes de cancro da próstata humano ou tecidos de xenoenxertos após passagens são introduzidos em animais imunocomprometidos, tais como ratinhos nus ou SCID, são apropriados em relação ao cancro da próstata e foram descritos (Klein *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por exemplo, o Pedido de Patente PCT W098/1662 de Sawyers *et al.*, publicado em 23 de Abril, 1998, descreve vários modelos de xenoenxerto de cancro da próstata humano capazes de recapitular o desenvolvimento de tumores primários, micrometástases, e a formação de metástases osteoblásticas características de doença em estágio tardio. A eficácia pode ser prevista utilizando ensaios que medem a inibição da formação de tumores, a regressão tumoral ou as metástases, e similares. Veja-se, também, os Exemplos adiante.

Os ensaios *in vivo* que qualificam a promoção de apoptose podem também ser úteis na avaliação de potenciais composições terapêuticas. Numa concretização, xenoenxertos de ratinhos

portadores tratados com a composição terapêutica podem ser examinados quanto à presença de focos apoptóticos e comparados com ratinhos portadores de xenoenxertos de controlo não tratados. A extensão em que se encontram focos apoptóticos nos tumores dos ratinhos tratados proporciona uma indicação da eficácia terapêutica da composição.

As composições terapêuticas utilizadas na prática dos métodos anteriores podem ser formuladas em composições farmacêuticas, incluindo composições de vacinas, compreendendo um transportador adequado para o método de entrega desejado. Os transportadores adequados incluem qualquer material que quando combinado com a composição terapêutica retém a função antitumoral da composição terapêutica e não é reactivo com o sistema imunitário do paciente. Os exemplos incluem, mas não se lhes limitam, qualquer de vários transportadores farmacêuticos padrão tais como soluções salinas tamponadas com fosfato estéreis, água bacteriostática, e similares (veja-se, genericamente, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

As formulações terapêuticas podem ser solubilizadas e administradas através de qualquer via capaz de entregar a composição terapêutica ao local do tumor. As vias de administração potencialmente eficazes incluem, mas não se lhes limitam, intravenosa, parentérica, intraperitoneal, intramuscular, intratumoral, intradérmica, intra-órgão, ortotópica, e similares. Uma formulação preferida para injeção intravenosa compreende a composição terapêutica numa solução de água bacteriostática conservada, água estéril não conservada e/ou diluída em sacos de poli(cloreto de vinilo) ou polietileno contendo 0,9% de cloreto de sódio estéril para injeção, USP. As preparações terapêuticas de proteína podem ser liofilizadas e armazenadas na forma de pós estéreis, preferivelmente sob vácuo, e depois reconstituídas com água bacteriostática contendo, por exemplo, conservante álcool benzílico, ou em água estéril antes da injeção.

As dosagens e os protocolos de administração para o tratamento de cancros utilizando os métodos anteriores variarão com o método e o cancro alvo e dependerão geralmente de vários outros factores avaliados na especialidade.

VACINAS CONTRA O CANCRO

A invenção proporciona ainda vacinas contra o cancro compreendendo uma proteína STEAP-2 ou um seu fragmento, assim como vacinas à base de ADN. Tendo em conta a expressão de STEAP restringida à próstata e a tumores, espera-se que as vacinas de STEAP contra o cancro sejam eficazes para prevenir e/ou tratar especificamente cancros que expressam STEAP sem criar efeitos não específicos em tecidos não alvo. A utilização de um antigénio tumoral numa vacina para gerar imunidade humoral e mediada por células para utilização em terapia anticancerosa é bem conhecida na especialidade e foi empregue no cancro da próstata utilizando imunogénio PSMA humano e PAP de roedor (Hodge *et al.*, 1995, Int J. Cancer **63**: 231-237; Fong *et al.*, 1997, J. Immunol. **159**: 3113-3117). Estes métodos podem ser prontamente postos em prática empregando uma proteína STEAP, ou um seu fragmento, ou uma molécula de ácido nucleico que codifica STEAP e vectores recombinantes capazes de expressar e apresentar apropriadamente o imunogénio de STEAP.

Por exemplo, podem ser utilizados sistemas virais de entrega de genes para entregar uma molécula de ácido nucleico que codifica STEAP. Vários sistemas virais de entrega de genes que podem ser utilizados na prática deste aspecto da invenção incluem, mas não se lhes limitam, vírus vacínia, poxvírus aviários, poxvírus dos canários, adenovírus, *influenza*, poliovírus, vírus adeno-associados, lentivírus e vírus sindbis (Restifo, Curr. Opin. Immunol **8**: 658-663, 1996). Sistemas não virais de entrega podem também ser empregues utilizando ADN nu que codifica uma proteína STEAP ou um seu fragmento, introduzido no paciente (*e.g.*, intramuscularmente) para induzir uma resposta antitumoral. Numa concretização, pode ser empregue o ADNc de STEAP humana de comprimento completo.

Numa concretização, uma vacina de STEAP contra o cancro é baseada na identificação de péptidos imunogénicos no interior de uma sequência de aminoácidos de STEAP apresentada na Fig. 11A-B. Como adicionalmente discutido nos exemplos adiante, mostrou-se que as STEAP induzem respostas de células T e B. Os polipéptidos de STEAP-1 e STEAP-2 foram utilizados para gerar uma resposta imunitária em ratinhos e

coelhos para a produção de anticorpos monoclonais e policlonais. Assim, porções específicas de STEAP, e polinucleótidos que codificam estas porções, podem ser seleccionados para a produção de uma vacina contra o cancro. Um exemplo de uma tal porção de uma proteína STEAP consiste nos resíduos de aminoácido 14 a 28 da sequência de aminoácidos de STEAP-1 como mostrada na FIG. 1A-B (WKMKPRRNLEEDDYL; SEQ ID NO:22).

Noutra concretização, podem ser empregues moléculas de ácido nucleico de STEAP que codificam epítomos específicos de linfócitos T citotóxicos (CTL). Os epítomos de CTL podem ser determinados utilizando algoritmos específicos (e.g., Epimer, Brown University) para identificar péptidos no interior de uma proteína STEAP que são capazes de se ligar optimamente a alelos de HLA específicos. Um algoritmo adequado é o algoritmo de busca de motivos peptídicos de HLA "HLA Peptide Motif Search" disponível no website da Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) (<http://bimas.dertnih.gov/>). Este algoritmo é baseado na ligação de sequências peptídicas específicas no sulco de moléculas de HLA de Classe I e especificamente HLA-A2 (Falk et al., 1991, Nature 351:290-6; Hunt et al., 1992, Science 255:1261-3; Parker et al., 1992, J. Immunol. 149:3580-7; Parker et al., 1994, J. Immunol. 152:163-75). O algoritmo "HLA Peptide Motif Search" permite a localização e a classificação de péptidos 8-mero, 9-mero e 10-mero a partir de uma sequência de proteína completa para ligação prevista a HLA-A2 assim como outras moléculas da Classe I. A maioria dos péptidos de ligação a HLA-A2 são 9-meros, favoravelmente contendo uma leucina na posição 2 e uma valina ou uma leucina na posição 9 (Parker et al., 1992, J. Immunol. 149:3580-7). A verdadeira ligação de péptidos a HLA-A2 pode ser avaliada por estabilização da expressão de HLA-A2 na linha celular T2 defectiva no processamento do antigénio (Xue et al., 1997, Prostate 30:73-8; Peshwa et al., 1998, Prostate 36:129-38). A imunogenicidade de péptidos específicos pode ser avaliada *in vitro* por estimulação de CTL CD8+ na presença de células dendríticas (Xue et al.; Peshwa et al., *supra*).

Os péptidos de STEAP específicos que se prevê ligarem-se a HLA-A2 e preferidos para utilização em vacinas contra o

cancro incluem péptidos correspondentes aos aminoácidos 165-173 de STEAP-1, aminoácidos 86-94 de STEAP-1, aminoácidos 262-270 de STEAP-1, aminoácidos 302-310 de STEAP-1, aminoácidos 158-166 de STEAP-1, aminoácidos 227-235 de STEAP-2, aminoácidos 402-410 de STEAP-2, aminoácidos 307-315 de STEAP-2, aminoácidos 306-314 de STEAP-2 e aminoácidos 100-108 de STEAP-2.

Várias estratégias *ex vivo* podem também ser empregues. Uma abordagem envolve a utilização de células dendríticas para apresentar o antigénio de STEAP ao sistema imunitário de um paciente. As células dendríticas expressam MHC de classe I e II, co-estimulador de B7 e IL-12 e são assim células apresentadoras de antigénios altamente especializadas. No cancro da próstata, células dendríticas autólogas pulsadas com péptidos do antigénio de membrana específico da próstata (PSMA) estão a ser utilizadas num ensaio clínico de Fase I para estimular sistemas imunitários de pacientes de cancro da próstata (Tjoa *et al.*, Prostate 28: 65-69, 1996; Murphy *et al.*, Prostate 29: 371-380, 1996). As células dendríticas podem ser utilizadas para apresentar péptidos de STEAP a células T no contexto de moléculas MHC de classe I e II. Numa concretização, células dendríticas autólogas são pulsadas com péptidos de STEAP capazes de se ligar a moléculas do MHC. Noutra concretização, células dendríticas são pulsadas com a proteína STEAP completa. Ainda outra concretização envolve a manipulação da sobre-expressão do gene de STEAP em células dendríticas utilizando vários vectores de implementação conhecidos na especialidade, tais como adenovírus (Arthur *et al.*, Cancer Gene Ther. 4: 17-25, 1997), retrovírus (Henderson *et al.*, Cancer Res. 56: 3763-3770, 1996), lentivírus, vírus adeno-associado, transfecção de ADN (Ribas *et al.*, Cancer Res. 57: 2865-2869, 1997) e transfecção de ARN derivado de tumores (Ashley *et al.*, J. Exp. Med. 186: 1177-1182, 1997). Células que expressam STEAP podem também ser manipuladas para expressar imunomoduladores, tais como GM-CSF, e utilizados como agentes imunizantes.

Anticorpos anti-idiotípicos e anti-STEAP-1 podem também ser utilizados em terapia anticancerosa como uma vacina para induzir uma resposta imunitária a células que expressam uma proteína STEAP. Especificamente, a criação de anticorpos anti-

idiotípicos é bem conhecida na especialidade e pode ser facilmente adaptada para gerar anticorpos anti-idiotípicos e anti-STEAP que imitam um epítopo numa proteína STEAP (ver, por exemplo, Wagner *et al.*, Hybridoma **16**: 33-40, 1997; Foon *et al.*, J. Clin. Invest. **96**: 334-342, 1995; Herlyn *et al.*, Cancer Immunol. Immunother. **43**: 65-76, 1996). Um tal anticorpo anti-idiotípico pode ser utilizado em estratégias de vacinas contra o cancro.

Os métodos de imunização genética podem ser empregues para gerar respostas imunitárias humorais e celulares profiláticas ou terapêuticas dirigidas contra células cancerosas que expressam STEAP. As construções compreendendo ADN que codifica uma proteína/imunogénio STEAP e sequências reguladoras apropriadas podem ser injectadas directamente no músculo ou na pele de um indivíduo, para que as células do músculo ou da pele tomem a construção e expressem a proteína/imunogénio STEAP codificado. A expressão da proteína/imunogénio STEAP resulta na geração de imunidade humoral ou celular profilática ou terapêutica contra o cancro da próstata e outros cancros que expressam STEAP. Várias técnicas de imunização genética profiláticas e terapêuticas conhecidas na especialidade podem ser utilizadas (para revisão, ver informação e referências publicadas no endereço de *internet* www.genweb.com).

COMPOSIÇÃO E KITS DE DIAGNÓSTICO

Para utilizar nas aplicações de diagnóstico e terapêuticas descritas ou sugeridas acima, são também aqui divulgados *kits*. Estes *kits* podem compreender um meio transportador compartimentado para receber em íntima confinamento um ou mais meios recipientes tais como frascos, tubos e semelhantes, compreendendo cada um dos recipientes um dos elementos separados a utilizar no método. Por exemplo, um dos meios recipientes pode compreender uma sonda que é ou pode ser marcada de forma detectável. Essa sonda pode ser um anticorpo ou polinucleótidos específicos para uma proteína STEAP ou um gene ou mensagem de STEAP, respectivamente. Quando o *kit* utiliza hibridação de ácidos nucleicos para detectar o ácido nucleico alvo, o *kit* pode também ter recipientes contendo o nucleótido ou nucleótidos para amplificação da

sequência de ácido nucleico alvo e/ou um recipiente compreendendo um meio repórter, tal como proteína de ligação a biotina, tal como avidina ou estreptavidina, ligada a uma molécula repórter, tal como um marcador enzimático, fluorescente ou radioisótopo.

O *kit*, como aqui descrito, irá tipicamente compreender o recipiente acima descrito e um ou mais outros recipientes compreendendo materiais desejáveis do ponto de vista comercial e do utilizador, incluindo tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas e bulas de embalagem com instruções para utilização. Pode estar presente um rótulo no recipiente para indicar que a composição é utilizada para uma terapia específica ou uma aplicação não terapêutica, e pode também indicar instruções para utilização *in vivo* ou *in vitro*, tais como as descritas acima.

Assim, a invenção também proporciona composições de diagnóstico compreendendo moléculas relacionadas com STEAP. Estas moléculas incluem os vários polinucleótidos de STEAP-2, iniciadores, sondas, proteínas, fragmentos, anticorpos aqui descritos. As moléculas incluídas na composição de diagnóstico podem opcionalmente ser marcadas com um marcador detectável. As composições de diagnóstico de STEAP podem ainda compreender tampões, diluentes e outros ingredientes apropriados conforme desejado.

EXEMPLOS

Vários aspectos da invenção estão adicionalmente descritos e ilustrados por meio dos vários exemplos que se seguem, nenhum destinado a limitar o âmbito da invenção.

Exemplo 1: Isolamento Gerado por SSH de Fragmento de ADNc do Gene de STEAP

Materiais e Métodos

Xenoenxertos LAPC:

Obtiveram-se xenoenxertos LAPC do Dr. Charles Sawyers (UCLA) e geraram-se como descrito (Klein *et al.*, 1997, Nature Med 3: 402-408; Craft *et al.*, 1999, Cancer Res. 59: 5030-

5036). Xenoenxertos LAPC-4 dependentes e independentes de androgénio (LAPC-4 AD e AI, respectivamente) e xenoenxertos LAPC-9 dependentes e independentes de androgénio (LAPC-9 AD e AI, respectivamente) foram crescidos em ratinhos SCID machos intactos ou em machos castrados, respectivamente, e foram passados na forma de pequenos pedaços de tecido em machos recebedores. Os xenoenxertos LAPC-4 AI foram derivados de tumores LAPC-4 AD e os xenoenxertos LAPC-9 AI foram derivados de tumores LAPC-9 AD. Para gerar os xenoenxertos AI, ratinhos machos portadores de tumores LAPC AD foram castrados e mantidos durante 2-3 meses. Após novo crescimento dos tumores LAPC, colheram-se os tumores e passaram-se em ratinhos SCID machos castrados ou fêmeas.

Os xenoenxertos LAPC-4 AD foram crescidos intratibialmente como se segue. O tecido tumoral do xenoenxerto LAPC-4 AD crescido subcutaneamente foi cortado em secções de 1-2 mm³ enquanto o tecido era banhado em meio Iscoves 1X, o tecido cortado foi depois centrifugado a 1,3K rpm durante 4 minutos, o sobrenadante foi ressuspense em 10 ml de meio Iscoves 1X gelado e centrifugado a 1,3K rpm durante 4 minutos. A pelete foi então ressuspensa em Iscoves 1X com 1% de pronase E e incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente com agitação rotativa suave seguida de incubação em gelo durante 2-4 minutos. Centrifugou-se o filtrado a 1,3K rpm durante 4 minutos, e removeu-se a pronase da pelete aspirada por ressuspensão em 10 ml de Iscoves e re-centrifugação. Colocaram-se então agrupamentos de células em meio PrEGM e cresceram-se durante a noite. As células foram então colhidas, filtradas, lavadas com RPMI 2X e contadas. Misturaram-se aproximadamente 50 000 células com um volume igual de Matrigel gelado sobre gelo, e injectaram-se cirurgicamente nas metáfises tibiais proximais de ratinhos SCID através de uma agulha de calibre 27. Após 10-12 semanas, recuperaram-se os tumores LAPC-4 que cresceram na medula óssea.

Linhas Celulares e Tecidos:

As linhas celulares humanas (e.g., HeLa) foram obtidas da ATCC e foram mantidas em DMEM com 5% de soro fetal de vitelo. Os tecidos humanos para as análises de ARN e proteína foram obtidos do Human Tissue Resource Center (HTRC) na UCLA (Los Angeles, CA) e de QualTek, Inc. (Santa Barbara, CA).

Isolamento de ARN:

Tecidos e linhas celulares tumorais foram homogeneizados em reagente Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) utilizando 10 ml/g de tecido ou 10 ml/10⁸ células para isolar ARN total. O ARN Poli-A foi purificado a partir do ARN total utilizando kits Mini e Midi Oligotex mRNA de Qiagen. O ARN total e o ARNm foram quantificados através de análise espectrofotométrica (D.O. 260/280 nm) e analisados através de electroforese em gel.

Oligonucleótidos:

Utilizaram-se os seguintes oligonucleótidos purificados por HPLC.

DPNCDN (iniciador de síntese de ADNc):

5'TTTT**GATCAAG**CTT₃₀3' (SEQ ID NO:23)

Adaptador 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCCGCCGGGCAG3'

3'GGCCCGTCCTAG5' (SEQ ID NO: 24,25)

Adaptador 2:

5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3'

3'CGGCTCCTAG5' (SEQ ID NO: 26,27)

Iniciador de PCR 1:

5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (SEQ ID NO:28)

Iniciador Nested (NP)1:

5'TCGAGCGGCCCGCCGGGCAG**GA3**' (SEQ ID NO:29)

Iniciador Nested (NP)2:

5'AGCGTGGTCGCGGCCGAG**GA3**' (SEQ ID NO:30)

Hibridação Subtrativa de Supressão:

A Hibridação Subtrativa de Supressão (SSH) foi utilizada para identificar ADNc correspondentes a genes que podem ser supra-regulados em cancro da próstata dependente de

androgénios em comparação com hiperplasia prostática benigna (HPB).

Os ADNc de cadeia dupla correspondentes ao xenoenxerto LAPC-4 AD (testador) e ao tecido de HPB (condutor) foram sintetizados a partir de 2 µg de ARN poli(A)⁺ isolado a partir do xenoenxerto e do tecido de HPB, tal como descrito acima, utilizando o *Kit* PCT-select cDNA Subtraction Kit da CLONTECH e 1 ng de oligonucleótido RSACDN como iniciador.

A síntese da primeira e da segunda cadeias foi efectuada tal como descrito no protocolo do manual do utilizador do *kit* (CLONTECH Protocolo N.º PT1117-1, N.º de Catálogo K1804-1). O ADNc resultante foi digerido com *Rsa*I durante 3 h a 37°C. O ADNc digerido foi extraído com fenol/clorofórmio (1:1) e precipitado em etanol.

O ADNc condutor (HPB) foi gerado por combinação, numa razão de 4 para 1, de ADNc de HPB digerido com *Rsa*I com ADNc digerido de fígado de ratinho, para assegurar que os genes murinos eram subtraídos do ADNc testador (LAPC-4 AD).

O ADNc testador (LAPC-4 AD) foi gerado por diluição de 1 µl de ADNc de LAPC-4 AD digerido com *Rsa*I (400 ng) em 5 µl de água. O ADNc diluído (2 µl, 160 ng) foi então ligado a 2 µl de adaptador 1 e adaptador 2 (10 µM), em reacções de ligação separadas, num volume total de 10 µl a 16°C durante a noite, utilizando 400 U de ADN-ligase de T4 (CLONTECH). A ligação foi terminada com 1 µl de EDTA 0,2 M e aquecimento a 72°C durante 5 min.

A primeira hibridação foi realizada por adição de 1,5 µl (600 ng) de ADNc condutor a cada um de dois tubos contendo 1,5 µl (20 ng) de ADNc testador ligado ao adaptador 1 e ao adaptador 2. Num volume final de 4 µl, as amostras foram cobertas com óleo mineral, desnaturadas num aparelho de ciclos térmicos MJ Research a 98°C durante 1,5 minutos e depois foram deixadas a hibridar durante 8 h a 68°C. As duas hibridações foram então misturadas uma com a outra com 1 µl adicional de ADNc condutor desnaturado fresco e foram deixadas a hibridar durante a noite a 68°C. A segunda hibridação foi então diluída

em 200 µl de Hepes 20 mM, pH 8,3, NaCl 50 mM, EDTA 0,2 mM, aquecida a 70°C durante 7 min. e armazenada a -20°C.

Amplificação por PCR. Clonagem e Sequenciação de Fragmentos Génicos Gerados por SSH:

Para amplificar fragmentos génicos resultantes de reacções de SSH, foram efectuadas duas amplificações por PCR. Na reacção de PCR primária foi adicionado 1 µl da mistura de hibridação final diluída a 1 µl do iniciador de PCR 1 (10 µM), 0,5 µl de mistura de dNTP (10 µM), 2,5 µl de tampão de reacção 10× (CLONTECH) e 0,5 µl de Mistura de ADNc-polimerase Advantage 50× (CLONTECH) num volume final de 25 µl. A PCR 1 foi conduzida utilizando as seguintes condições: 75°C durante 5 min., 94°C durante 25 s., depois 27 ciclos de 94°C durante 10 s., 66°C durante 30 s, 72°C durante 1,5 min. Foram efectuadas cinco reacções PCR primárias separadas para cada experiência. Os produtos foram reunidos e diluídos 1:10 com água. Para a reacção PCR secundária, foi adicionado 1 µl da reacção PCR primária reunida e diluída à mesma mistura reaccional tal como utilizada para a PCR 1, excepto que foram utilizados os iniciadores NP1 e NP2 (10 pM) em vez do iniciador de PCR 1. A PCR 2 foi efectuada utilizando 10-12 ciclos de 94°C durante 10 s, 68°C durante 30 s, 72°C durante 1,5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados utilizando electroforese em gel de agarose a 2%.

Os produtos de PCR foram inseridos em pCR2.1 utilizando o kit de clonagem do vector T/A (Invitrogen). As *E. coli* transformadas foram submetidas a selecção azul/branco e ampicilina. As colónias brancas foram apanhadas e dispostas em placas de 96 poços e foram crescidas em cultura líquida durante a noite. Para identificar as inserções, foi efectuada amplificação por PCR com 1 ml de cultura bacteriana utilizando as condições de PCR1 e NP1 e NP2 como iniciadores. Os produtos de PCR foram analisados utilizando electroforese em gel de agarose a 2%.

Os clones bacterianos foram armazenados em glicerol a 20% num formato de 96 poços. O ADN plasmídico foi preparado, sequenciado e submetido a buscas de homologia de ácido nucleico das bases de dados GenBank, dbEST e NCI-CGAP.

Análise da Expressão por RT-PCR:

Os ADNc da primeira cadeia foram gerados a partir de 1 µg de ARNm com iniciadores oligo (dT)12-18 utilizando o sistema de pré-amplificação Superscript de Gibco-BRL. Foi utilizado o protocolo dos fabricantes e incluía uma incubação durante 50 min a 42°C com transcriptase inversa seguida de tratamento com ARNase H a 37°C durante 20 min. Após completada a reacção, o volume foi aumentado para 200 µl com água antes da normalização. Os ADNc da primeira cadeia de 16 tecidos humanos normais diferentes foram obtidos em Clontech.

A normalização dos ADNc da primeira cadeia de múltiplos tecidos foi efectuada através da utilização dos iniciadores 5'atatacgccgcgctcgtcgtcgacaa3' (SEQ ID NO:31) e 5'agccacacgcagctcattgtagaagg3' (SEQUÊNCIA ID NO:32) para amplificar β-actina. O ADNc da primeira cadeia (5 µl) foi amplificado num volume total de 50 µl contendo iniciadores 0,4 µM, 0,2 µM de cada dNTP, tampão de PCR 1× (Clontech, Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 50 mM, pH 8,3) e ADN-polimerase Klentaq 1× (Clontech). Foram removidos 5 µl da reacção de PCR nos ciclos 18, 20 e 22 que se utilizaram para electroforese em gel de agarose. A PCR foi realizada utilizando um aparelho de ciclos térmicos MJ Research sob as seguintes condições: a desnaturação inicial foi a 94°C durante 15 s., seguida de 18, 20 e 22 ciclos de 94°C durante 15, 65°C durante 2 min, 72°C durante 5 s. Foi realizada uma extensão final a 72°C durante 2 min. Após electroforese em gel de agarose, as intensidades de banda das bandas de β-actina de 283 pb de múltiplos tecidos foram comparadas por inspecção visual. Os factores de diluição para os ADNc da primeira cadeia foram calculados para resultar em intensidades de banda da β-actina iguais em todos os tecidos após 22 ciclos de PCR. Foram necessários três ciclos de normalização para se alcançar intensidades de banda iguais em todos os tecidos após 22 ciclos de PCR.

Para determinar os níveis de expressão do gene 8P1D4, foram analisados 5 µl de ADNc da primeira cadeia normalizado através de PCR utilizando 25, 30 e 35 ciclos de amplificação utilizando os seguintes pares de iniciadores:

5' ACT TTG TTG ATG ACC AGG ATT GGA 3' (SEQ ID NO:4)

5' CAG AAC TTC AGC ACA CAC AGG AAC 3' (SEQ ID NO:5)

Uma análise de expressão semi-quantitativa foi alcançada por comparação dos produtos de PCR nos números de ciclo que davam intensidades de banda ligeiras.

Resultados

Foram conduzidas várias experiências de SSH tal como descrito em Materiais e Métodos, *supra*, que conduziram ao isolamento de numerosos clones de fragmentos génicos candidatos. Todos os clones candidatos foram sequenciados e submetidos a análise de homologia contra todas as sequências nas principais bases de dados públicas de genes e de EST para proporcionar informação sobre a identidade do gene correspondente e para ajudar a orientar a decisão de analisar um gene particular quanto a expressão diferencial. Em geral, fragmentos génicos que não tinham homologia com nenhuma sequência conhecida em nenhuma das bases de dados pesquisadas e assim considerados como representando genes novos, bem como fragmentos génicos mostrando homologia com marcadores de sequências expressas (EST) anteriormente sequenciadas, foram submetidos a análise de expressão diferencial através de RT-PCR e/ou análise de *Northern*.

Um dos clones de ADNc, designado 8P1D4, tinha 436 pb de comprimento e apresentou homologia com uma sequência EST na base de dados de genes tumorais NCI-CGAP. O ADNc de comprimento completo que codifica o gene 8P1D4 foi subsequentemente isolado utilizando este ADNc e renomeado STEAP-1. A sequência nucleotídica do ADNc 8P1D4 corresponde aos resíduos nucleotídicos 150 a 585 na sequência de ADNc de STEAP-1 tal como mostrado na FIG. 1A-B. Outro clone, designado 28P3E1, de 561 pb de comprimento apresentou homologia com várias sequências EST na base de dados de genes tumorais NCI-CGAP ou noutras bases de dados. Parte da sequência de 28P3E1 (356 pb) é idêntica a uma EST derivada de tecido fetal humano. Depois de obtido e sequenciado o ADNc de STEAP-1 de comprimento completo, tornou-se evidente que este clone também corresponde a STEAP-1 (mais especificamente, aos resíduos

desde o resíduo 622 até à extremidade 3' da sequência nucleotídica de STEAP-1 tal como mostrado na FIG. 1A-B).

A análise de expressão diferencial por RT-PCR utilizando iniciadores derivados do clone de ADNc 8P1D4 mostrou que o gene 8P1D4 (STEAP-1) é expresso em níveis aproximadamente iguais em próstata normal e nos xenoenxertos LAPC-4 e LAPC-9 (FIG. 2, painel A). Uma análise adicional da expressão por RT-PCR dos ADNc da primeira cadeia de 16 tecidos normais mostrou maiores níveis de expressão de 8P1D4 na próstata. Um nível de expressão substancialmente inferior em vários outros tecidos normais (*i.e.*, cólon, ovário, intestino delgado, baço e testículo) foi detectável apenas aos 30 ciclos de amplificação no cérebro, pâncreas, cólon e intestino delgado (FIG. 2, painéis B e C).

Exemplo 2: Isolamento de ADNc que codifica STEAP-1 de comprimento completo

O fragmento do gene 8P1D4 de 436 pb (Exemplo 1) foi utilizado para isolar ADNc adicionais codificando o gene 8P1D4/STEAP-1. Resumidamente, uma biblioteca de ADNc de próstata humana normal (Clontech) foi rastreada com uma sonda marcada gerada a partir do ADNc 8P1D4 de 436 pb. Um dos clones positivos, o clone 10, tem 1195 pb de comprimento e codifica uma proteína com 339 aminoácidos possuindo sequências nucleotídica e de aminoácidos codificada sem homologia significativa com nenhum dos genes ou proteínas humanos conhecidos (homologia com uma Proteína de Lesão Renal de rato recentemente descrita no Pedido Internacional WO98/53071). A proteína codificada contém pelo menos 6 motivos transmembranares previstos implicando uma orientação na superfície celular (ver FIG. 1A-B, sublinhados os motivos transmembranares previstos). Estas características estruturais conduziram à designação "STEAP", do inglês para "Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate" (antígeno epitelial de seis domínios transmembranares da próstata).

A subsequente identificação de proteínas STEAP adicionais conduziu à re-designação do produto do gene 8P1D4 como "STEAP-1". As sequências de ADNc de STEAP-1 e de aminoácidos codificada são mostradas na FIG. 1A-B e correspondem a SEQ ID

NOS: 1 e 2, respectivamente. O ADNc do clone 10 de STEAP-1 foi depositado na American Type Culture Collection ("ATCC") (10801 University Blvd., Mannassas, VA 20110-2209 EUA) como plasmídeo clone 10.1 de 8P1D4 em 26 de Agosto de 1998 com o Número de Acesso ATCC 98849. O clone do ADNc de STEAP-1 pode ser excisado a partir dele utilizando dupla digestão com *EcoRI/XbaI* (*EcoRI* na extremidade 5', *XbaI* na extremidade 3').

Exemplo 3: Análise de Expressão do Gene e da Proteína STEAP-1

Para começar a caracterizar as características biológicas de STEAP-1, foi efectuada uma avaliação extensiva da expressão do ARNm de STEAP-1 e da proteína STEAP-1 numa variedade de espécimes de tecidos humanos. Esta avaliação incluiu *Northern blot*, *Western blot* e análise imuno-histoquímica da expressão de STEAP-1 num grande número de tecidos humanos normais, xenoenxertos e linhas celulares de cancro da próstata humano e várias outras linhas celulares de cancro humano.

Exemplo 3A: Análise Northern Blot da Expressão de ARNm de STEAP-1 em Tecidos Humanos Normais

A análise inicial da expressão de ARNm de STEAP-1 em tecidos humanos normais foi conduzida por *Northern blot* de dois *blots* de múltiplos tecidos obtidos em Clontech (Palo Alto, Califórnia), compreendendo um total de 16 tecidos humanos normais diferentes, utilizando o clone 10 de STEAP-1 marcado como sonda. As amostras de ARN foram quantitativamente normalizadas com uma sonda de β -actina. Os resultados são mostrados na FIG. 3A. O nível de expressão mais elevado foi detectado em próstata normal, com um nível de expressão aproximadamente 5-10 vezes inferior detectado no cólon e no fígado. Estes *Northern blot* mostraram dois transcritos de aproximadamente 1,4 kb e 4,0 kb, o primeiro correspondente ao ADNc de comprimento completo do clone 10 de STEAP-1, que codifica o quadro de leitura aberto inteiro de STEAP-1. O transcrito maior foi separadamente clonado na forma de um ADNc de 3627 pb a partir de uma biblioteca de próstata normal, cuja sequência contém um intrão de 2399 pb (FIG. 4).

Esta análise inicial foi estendida utilizando a sonda clone 10 de STEAP-1 para analisar uma matriz *dot blot* de ARN

de 37 tecidos humanos normais (Clontech, Palo Alto, CA; Human Master Blot™). Os resultados são mostrados na FIG. 3B e mostram uma forte expressão de STEAP-1 apenas na próstata. Uma expressão de ARN de STEAP-1 de nível muito baixo foi detectada no fígado, pulmão, traqueia e tecido fetal hepático, talvez a um nível 5 vezes inferior em comparação com a próstata. Não foi detectada expressão em nenhum dos restantes tecidos. Com base nestas análises, a expressão significativa de STEAP-1 parece ser específica da próstata em tecidos normais.

Exemplo 3B: Análise Northern Blot da Expressão de ARNm de STEAP-1 em Xenoenxertos e Linhas Celulares de Cancro da Próstata

Para analisar a expressão de STEAP-1 em tecidos e linhas celulares de cancro humano, ARN derivados de xenoenxertos de cancro da próstata humano e de um painel extensivo de linhas celulares de cancro da próstata e sem ser da próstata foram analisados por *Northern blot* utilizando o ADNc do clone 10 de STEAP-1 como sonda. Todas as amostras de ARN foram quantitativamente normalizadas por coloração com brometo de etídio e subsequente análise com uma sonda de β -actina marcada.

Os resultados, apresentados na FIG. 5, mostram um elevado nível de expressão de STEAP-1 em todos os xenoenxertos LAPC e todas as linhas celulares de cancro da próstata. A expressão nos xenoenxertos LAPC-9 foi maior em comparação com os xenoenxertos LAPC-4, sem diferença significativa observada entre as sublinhas dependentes de androgénio e independentes de androgénio (FIG. 5A). A expressão no xenoenxerto LAPC-4 foi comparável à expressão em próstata normal. Foram detectados níveis de expressão inferiores em células PrEC (Clonetics), que representam o compartimento de células basais da próstata. A análise das linhas celulares de cancro da próstata mostrou os níveis de expressão mais elevados em LNCaP, uma linha celular de carcinoma da próstata dependente de androgénio. Foi também detectada uma expressão significativa nas linhas celulares independentes de androgénio PC-3 e DU145. Níveis elevados de expressão de STEAP foram também detectados em tumores LAP-4 e LAPC-9 que foram crescidos no interior da

tíbia de ratinhos como modelo de metástase óssea de cancro da próstata (FIG. 5B).

Significativamente, foi também detectada uma expressão muito forte de STEAP-1 em muitas das linhas celulares de cancro humano sem ser da próstata analisadas (FIG. 5A). Foi observado um nível particularmente elevado de expressão em células RD-ES, uma linha celular derivada de sarcoma de Ewing (EWS). Adicionalmente, foi também detectada expressão de nível muito elevado em várias linhas celulares de cancro do cólon (e.g., CaCo-2, LoVo, T84 e Colo-205), linhas celulares de carcinoma da bexiga (e.g., SCABER, UM-UC-3, TCCSUP e 5637), linhas celulares de cancro do ovário (e.g., OV-1063 e SW 626) e linhas celulares de cancro pancreático (e.g., HPAC, Capan-1, PANC-1 e BxPC-3). Estes resultados, combinados com a ausência de forte expressão nos tecidos normais correspondentes (FIG. 3), indicam que a STEAP-1 pode estar geralmente supra-regulada nestes tipos de cancro humanos (bem como noutros tipos).

Exemplo 3C: Análise Western Blot da Expressão da Proteína STEAP-1 em Cancro da Próstata e Outros Cancros

Um péptido 15-mero correspondente aos resíduos de aminoácido 14 a 28 da sequência de aminoácidos de STEAP-1 tal como mostrada na FIG. 1A-B (WKMKPRRNLEEDDYI; SEQ ID NO:22) foi sintetizado e utilizado para imunizar uma ovelha para a criação de anticorpos policlonais de ovelha contra o terminal amino da proteína (anti-STEAP-1) como se segue. O péptido foi conjugado com KLH (hemocianina da lapa *Fissurella*). A ovelha foi inicialmente imunizada com 400 µg de péptido em adjuvante completo de Freund. O animal recebeu subsequentemente reforço de duas em duas semanas com 200 µg de péptido e adjuvante incompleto de Freund. O anticorpo anti-STEAP-1 foi purificado por afinidade a partir do soro de ovelha utilizando péptido de STEAP acoplado a affigel 10 (Bio Rad). O anticorpo purificado é armazenado em solução salina tamponada com fosfato com azida de sódio a 0,1%.

Para testar a especificidade do anticorpo, o ADNc de STEAP-1 foi clonado num vector de expressão retroviral

(pSR α tkneo, Muller et al., *MCB* 11:1785, 1991). Células NIH 3T3 foram infectadas com retrovírus codificando STEAP-1 e foram seleccionadas em G418 durante 2 semanas. A análise *Western blot* de extractos proteicos de células NIH 3T3 infectadas e não infectadas mostrou expressão de uma proteína com um peso molecular aparente de 36 kDa apenas nas células infectadas (FIG. 6, pistas marcadas "3T3 STEAP" e "3T3").

O anticorpo policlonal anti-STEAP-1 foi utilizado para sondar *Western blot* de lisados celulares preparados a partir de uma variedade de tecidos de xenoinxerto de cancro da próstata, linhas celulares de cancro da próstata e linhas celulares de outros cancros que não da próstata. As amostras de proteínas (20 μ g cada) foram quantitativamente normalizadas através de sondagem das transferências com um anticorpo anti-Grb-2.

Os resultados são mostrados na FIG. 6. A proteína STEAP-1 foi detectada em todos os xenoinxertos de cancro da próstata LAPC, em todas as linhas celulares de cancro da próstata, num espécime de cancro da próstata primário e no seu controlo correspondente de próstata normal. A mais elevada expressão de proteína STEAP-1 foi detectada no xenoinxerto LAPC-9 e em células LNCaP, em concordância com a análise *Northern blot* descrita imediatamente acima. Foi também observada expressão em nível elevado na linha celular de carcinoma da bexiga UM-UC-3. Foi também detectável expressão noutras linhas celulares de cancro (FIG. 6).

Exemplo 3D: Análise Imuno-histoquímica da Expressão da Proteína STEAP-1 em Biópsia de Tumor da Próstata e Espécimes Cirúrgicos

Para determinar a extensão da expressão da proteína STEAP-1 em materiais clínicos, foram preparadas secções de tecidos a partir de uma variedade de biópsias de cancro da próstata e de amostras cirúrgicas para análise imuno-histoquímica. Os tecidos foram fixados em formalina a 10%, embebidos em parafina e cortados de acordo com um protocolo padrão. As secções fixadas em formalina e embebidas em parafina de células LNCaP foram utilizadas como controlo positivo. As secções foram coradas com um anticorpo policlonal

anti-STEAP-1 dirigido contra um epítopo N-terminal de STEAP-1 (tal como descrito imediatamente acima). As secções de LNCaP foram coradas na presença de uma quantidade em excesso do imunogénio peptídico N-terminal de STEAP-1 utilizado para gerar o anticorpo policlonal (péptido 1) ou um péptido não específico derivado de uma região distinta da proteína STEAP-1 (péptido 2; YQQVQQNKEDAWIEH; SEQ ID NO:33).

Os resultados são mostrados na FIG. 8. As células LNCaP apresentaram coloração pericelular uniformemente forte em todas as células (FIG. 8B). O excesso de péptido N-terminal de STEAP (péptido 1) foi capaz de inibir competitivamente a coloração do anticorpo (FIG. 8A), enquanto o péptido 2 não teve efeito (FIG. 8B). Similarmente, foi observada coloração pericelular uniformemente forte nos xenoenxertos de cancro da próstata LAPC-9 (FIG. 8F) e LAPC-4. Estes resultados são claros e sugerem que a coloração é específica de STEAP. Para além disso, estes resultados mostram a localização de STEAP na membrana plasmática, corroborando as verificações bioquímicas apresentadas no Exemplo 4 adiante.

Os resultados obtidos com os vários espécimes clínicos são mostrados na FIG. 8C (tecido normal da próstata), FIG. 8D (carcinoma prostático de grau 3) e FIG. 8E (carcinoma prostático de grau 4), e estão também incluídos nos resultados resumidos mostrados na Tabela 1. Foi observada coloração leve a forte nos epitélios glandulares de todas as amostras de cancro da próstata bem como em todas as amostras derivadas de próstata normal ou de doença benigna (e.g., HPB). O sinal parece ser mais forte na membrana celular das células epiteliais, especialmente nas junções célula-célula (FIG. 8C-E) e é também inibida com excesso de péptido 1 N-terminal de STEAP. Alguma coloração das células basais é também observada em próstata normal (FIG. 8C), que é mais evidente quando se examinam as glândulas atroficas. A STEAP-1 parece ser expressa em todos os estádios de cancro da próstata uma vez que o cancro da próstata de graus inferiores (FIG. 8D), graus superiores (FIG. 8E) e metastáticos (representados por LAPC-9; FIG. 8F) exibem todos forte coloração.

A coloração imuno-histoquímica de um grande painel de tecidos normais sem ser da próstata não apresentou expressão

detectável de STEAP-1 na maioria desses tecidos normais (Tabela 1). A bexiga normal exibiu níveis baixos de coloração da superfície celular no epitélio de transição (FIG. 8G). O pâncreas, o estômago, o útero, as trompas de Falópio e a pituitária apresentaram níveis baixos de coloração citoplasmática (Tabela 1). É desconhecido se a coloração citoplasmática observada é específica ou é devida a ligação não específica do anticorpo, uma vez que os *Northern blot* apresentaram pouca ou nenhuma expressão de STEAP-1 no pâncreas (FIG. 3). Estes resultados indicam que a expressão na superfície celular de STEAP-1 em tecidos normais parece estar restringida à próstata e à bexiga.

Tabela 1: Coloração imuno-histoquímica de Tecidos Humanos Com Anticorpo Policlonal de Ovelha Anti-STEAP-1

Intensidade de Coloração	Tecidos*
Nenhuma	Cerebelo, córtex cerebral, medula espinal, coração, músculo-esquelético (2), artéria, timo, baço (4), medula óssea, nódulo linfático (3), pulmão (8), fígado (4), íleo, rim (2), testículos (2), ovário, placenta, mama, glândula supra-renal (2), glândula tiróide (2), pele (2)
Citoplasmática leve	Uréter, cancro da bexiga (2/5), cólon (4/7), cancro do cólon (4/7, trompas de Falópio (2), glândula pituitária, pâncreas, estômago (1/2), útero (1/2)
Membrana leve	Metástase na medula óssea de cancro da próstata (1/6), metástase no nódulo linfático de cancro da próstata (1/5), cancro do pulmão (1/6)
Membrana Moderada a Forte	Próstata (7/7), BPH (5/5), cancro da próstata (20/20)**, metástase no nódulo linfático de cancro da próstata (4/5), metástase na medula óssea de cancro da próstata (5/6), bexiga (2/5), cancro da bexiga (3/5), cancro do pulmão (3/6)
*Em casos onde foi analisada mais de uma amostra por tecido, o número entre parêntesis indica como muitas amostras apresentaram coloração positiva/total analisado. **Os graus do cancro da próstata variaram de 3 a 5 e classificações Gleason de 7 a 10.	

Exemplo 3E: Análise Imuno-histoquímica da Expressão de Proteína STEAP-1 no Cancro da Bexiga e do Pulmão

Para determinar a extensão da expressão de proteína STEAP-1 noutros cancros, submeteram-se espécimes clínicos de tecido de cancro da bexiga e do pulmão a análise imuno-histoquímica utilizando o anticorpo policlonal e os métodos descritos no Exemplo 3D. Os resultados, apresentados nas Figuras 21 A-D, revelam um padrão de coloração pericelular similar ao observado com tecido de cancro da próstata.

Exemplo 4: Caracterização Bioquímica de Proteína STEAP-1

Para caracterizar inicialmente a proteína STEAP-1, o ADNc do clone 10 foi clonado no plasmídeo pcDNA 3.1 Myc-His (Invitrogen), que codifica um marcador 6His no terminal carboxilo, transfectado em células 293T, e analisado por citometria de fluxo utilizando anticorpo monoclonal anti-His (His-probe, Santa Cruz) bem como o anticorpo policlonal anti-STEAP-1 descrito acima. A coloração das células foi efectuada em células intactas bem como em células permeabilizadas. Os resultados indicaram que apenas as células permeabilizadas coravam com ambos os anticorpos, sugerindo que ambos os terminais da proteína STEAP-1 estavam localizados intracelularmente. É portanto possível que um ou mais dos terminais da proteína STEAP-1 estejam associados a organelos intracelulares e não à membrana plasmática.

Para determinar se a proteína STEAP-1 é expressa na superfície celular, células 293T transfectadas com STEAP-1 intactas foram marcadas com um reagente biotinilado que não entra em células vivas. A STEAP-1 foi então imunoprecipitada a partir de extractos celulares utilizando anticorpos anti-His e anti-STEAP-1. O antigénio T grande de SV40, uma proteína intracelular que é expressa em níveis elevados em células 293T, e o receptor da transferrina endógena da superfície celular foram imunoprecipitados como controlos negativo e positivo, respectivamente. Após a imunoprecipitação, as proteínas foram transferidas para uma membrana e visualizadas com estreptavidina conjugada com peroxidase de rábano. Os resultados desta análise são mostrados na FIG. 7. Apenas o receptor da transferrina (controlo positivo) e STEAP-1 foram

marcados com biotina, enquanto o antígeno T grande de SV40 (controlo negativo) não foi marcado de forma detectável (FIG. 7A). Uma vez que com esta técnica apenas são marcadas as proteínas da superfície celular, é claro a partir destes resultados que a STEAP-1 é uma proteína da superfície celular. Combinados com os resultados obtidos da análise de citometria de fluxo, é claro que a STEAP-1 é uma proteína da superfície celular com terminais amino e carboxilo intracelulares.

Para além disso, os resultados acima juntamente com as previsões da estrutura secundária de STEAP-1, mostram que STEAP-1 é uma proteína membrana de tipo IIIa com uma topologia molecular de seis potenciais domínios transmembranares, 3 voltas extracelulares, 2 voltas intracelulares e dois terminais intracelulares. Uma representação esquemática da topologia da proteína STEAP-1 relativamente à membrana celular é mostrada na FIG. 1B.

Adicionalmente, células de cancro da próstata, da bexiga e do cólon foram directamente analisadas quanto à expressão na superfície celular de STEAP-1 através de estudos de biotinylation. Resumidamente, proteínas da superfície celular biotiniladas foram purificadas por afinidade com estreptavidina-gel e sondadas com o anticorpo policlonal anti-STEAP descrito acima. O *Western blotting* das proteínas purificadas com estreptavidina mostra claramente biotinylation na superfície celular da STEAP-1 endógena em todas as células de cancro da próstata (LNCaP, PC-3, DU145), da bexiga (LJM-UC-3, TCCSUP) e do cólon (LoVo, Colo) testadas, bem como em células NIH 3T3 infectadas com um retrovírus codificando STEAP-1, mas não em células NIH 3T3 que não a expressam utilizadas como controlo negativo (FIG. 7B). Noutro controlo negativo, a proteína STEAP-1 não foi detectada em precipitados de estreptavidina de células que expressam STEAP não biotiniladas (FIG. 7B).

Exemplo 5: Construções para Expressão Recombinante de STEAP-1

Construções pGEX

Para expressar STEAP-1 em células bacterianas, fundiram-se porções de STEAP-1 com o gene da Glutathione S-transferase (GST) por clonagem em pGEX-6P-1 (Amersham

Pharmacia Biotech, NJ). Todas as construções foram preparadas para gerar sequências de proteína STEAP-1 recombinante com GST fundido no terminal N e um epítipo de seis histidinas no terminal C. O marcador epitópico de seis histidinas foi gerado por adição dos codões de histidina ao iniciador de clonagem na extremidade 3' do ORF. Um local de reconhecimento PreScissionTM permite a clivagem do marcador GST a partir de STEAP-1. O gene de resistência a ampicilina e a origem de pBR322 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Clonaram-se os seguintes fragmentos de STEAP-1 em pGEX-6P-1:

aminoácidos 148 a 251; aminoácidos 144 a 339; aminoácidos 39 a 253; aminoácidos 70 a 136; aminoácidos 254 a 313.

e em pGEX-4T: aminoácidos 2 a 247; aminoácidos 135-318; e aminoácidos 144-339.

As construções adicionais exemplificativas que podem ser feitas em pGEX-6P-1 que se estendem nas seguintes regiões da proteína STEAP-1 incluem:

Aminoácidos 1 a 339; aminoácidos 1 a 144.

Construção pcDNA3.1/MycHis

Para expressar STEAP-1 em células de mamífero, clonou-se um ORF de STEAP-1 de 1017 pb (com início de tradução de consenso de Kozak) em pcDNA3.1 /MycHis-Version B (Invitrogen, Carlsbad, CA). A expressão da proteína é conduzida a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). A proteína recombinante possui myc e seis histidinas fundidos no terminal C. O vector pcDNA3.1 /MycHis contém também o sinal de poliadenilação e a sequência de terminação da transcrição da hormona de crescimento bovina (BGH) para melhorar a estabilidade do ARNm juntamente com a origem de SV40 para replicação epissômica e recuperação do vector simples em linhas celulares que expressam o antigénio T grande. O gene de resistência a neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Construções pSRa

Para gerar linhas celulares de mamífero que expressam STEAP-1 constitutivamente, clonou-se um ORF de 1017 pb (com início de tradução de consenso de Kozak) em construções pSRa. Geram-se retrovírus anfotrópicos e ecotrópicos por transfecção de construções pSRa na linha de empacotamento 293T-10A1 ou co-transfecção de pSRa e um plasmídeo auxiliar (ϕ -) em células 293, respectivamente. O retrovírus pode ser utilizado para infectar uma variedade de linhas celulares de mamífero, resultando na integração do gene clonado, STEAP-1, nas linhas celulares hospedeiras. A expressão de proteínas é conduzida a partir de uma repetição terminal longa (LTR). O gene de resistência a neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColEI permitem a selecção e manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Prepararam-se construções pSRa adicionais que fundiam o marcador FLAG com o terminal C e N para permitir a detecção utilizando anticorpos anti-FLAG. A sequência de FLAG, 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEQ ID NO:34) foi adicionada ao iniciador de clonagem na extremidade 3' do ORF. Foi preparada outra construção pSRa que continha os aminoácidos 182 a 454. Esta forma truncada da proteína STEAP-1 ajudará a determinar a função da região N-terminal extracelular longa.

Está a ser feita uma construção pSRa adicional para produzir uma proteína de fusão myc/6 HIS da proteína STEAP-1 de comprimento completo.

Exemplo 6: Identificação e Análise Estrutural de Outras STEAP Humanas

A STEAP-1 não tem homologia com nenhum gene humano conhecido. Numa tentativa para identificar genes adicionais que sejam homólogos a STEAP-1, a sequência proteica de STEAP-1 foi utilizada como sonda electrónica para identificar membros da família na base de dados pública de EST (marcador de sequência de expressão) (dbEST). Utilizando a função "tblastn" em NCBI (National Center for Biotechnology Information), a base de dados dbEST foi interrogada com a sequência proteica de STEAP-1. Esta análise revelou homólogos adicionais de

STEAP-1 putativos ou membros da família STEAP, tal como adicionalmente descrito adiante.

Em adição, experiências de clonagem de SSH identificaram também um fragmento de ADNc relacionado com STEAP-1, o clone 98P4B6. Este clone foi isolado a partir da clonagem por SSH utilizando ADNc de próstata normal como testador e ADNc de LAPC-4 AD como condutor. Uma sequência parcial maior do clone 98P4B6 foi subsequentemente isolada a partir de uma biblioteca de próstata normal; este clone codifica um ORF de 173 aminoácidos com homologia estreita com a estrutura primária de STEAP-1, e assim foi designado STEAP-2. Isolou-se um ADNc de STEAP-2 de comprimento completo de 2454 pb a partir de uma biblioteca de próstata. As sequências de nucleótidos de ORF e as sequências de aminoácidos de STEAP-2 codificadas estão apresentadas na Fig. 9A-D. Um alinhamento de aminoácidos das estruturas primárias de STEAP-1 e STEAP-2 parcial está mostrada nas FIGS. 11A-B e 11C. As STEAP-1 e -2 partilham 61% de identidade ao longo dos seus 171 resíduos de aminoácido sobrepostos (FIG. 11C). O ADNc de STEAP-2 foi depositado na American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) na forma do plasmídeo 98P4B6-GTD3 em 2 de Julho, 1999 com o número de acesso na ATCC PTA-311.

O ADNc de STEAP-2 (98P4B6-GTD3) contém uma 5'UTR (região não traduzida) de 355 pb que é 72% rica em GC, sugerindo que contém elementos reguladores da tradução. O ADNc codifica um quadro de leitura aberto (ORF) de 454 aminoácidos (a.a.) com seis potenciais domínios transmembranares. Isto está em contraste com a STEAP-1, que tem 339 a.a. de comprimento. O alinhamento com STEAP-1 demonstra 54,9% de identidade ao longo de uma sobreposição de 237 aminoácidos. É interessante que as localizações dos seis domínios transmembranares putativos em STEAP-2 coincidem com as localizações dos domínios transmembranares em STEAP-1 (veja-se o alinhamento). A homologia de STEAP-2 com STEAP-1 é mais elevada nas regiões que se estendem desde a primeira volta extracelular putativa até ao quinto domínio transmembranar. Esta análise e a sequência de STEAP-2 sugerem algumas diferenças significativas entre STEAP-1 e STEAP-2: a STEAP-2 exhibe um terminal N intracelular longo de 205 a.a. (comparativamente com 69 a.a.

em STEAP-1) e um terminal C intracelular curto de 4 a.a. (comparativamente com 26 a.a. em STEAP-1). Estas diferenças podem implicar diferenças significativas na função e/ou na interacção com vias de sinalização intracelulares. Para identificar uma EST de ratinho única correspondente a STEAP-2, utilizou-se o terminal N único de STEAP-2 para interrogar a base de dados dbEST. Isolou-se uma EST de ratinho (AI747886, rim de ratinho) que pode ser utilizada na identificação de STEAP-2 de ratinho e na análise da expressão de STEAP-2 no ratinho.

Duas EST que codificam ORF com estreita homologia com as sequências de STEAP-1 e STEAP-2 foram também identificadas por sondagem electrónica com a sequência da proteína STEAP-1. Estas EST (AI139607 e R80991) foram provisoriamente designadas STEAP-3 e STEAP-4. Um ADNc de comprimento completo que codifica STEAP-3 foi subsequentemente clonado, e as suas sequências de nucleótidos e de aminoácidos deduzida estão apresentadas na Fig. 10A-E. O ADNc de STEAP-3 foi depositado na American Type Culture Collection ("ATCC"; 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 EUA) em 8 de Dezembro, 1999, na forma do plasmídeo pSTEAP-3 EBB4 com o número de acesso ATCC PTA-1033. As sequências de nucleótidos das EST correspondentes às STEAP estão reproduzidas na FIG. 10F.

Um alinhamento dos aminoácidos das estruturas de STEAP-1, STEAP-2, STEAP-3 e da sequência parcial da STEAP-4 putativa está apresentado na Fig. 11A-B. Este alinhamento mostra uma estreita semelhança estrutural entre todas as quatro proteínas da família STEAP, particularmente nos domínios transmembranares previstos. Como indicado acima, a STEAP-1 e a STEAP-2 demonstram 54,9% de identidade ao longo de uma sobreposição de 237 aminoácidos. A STEAP-1 e a STEAP-3 são 40,9% idênticas ao longo de uma região de 264 aminoácidos, enquanto a STEAP-2 e a STEAP-3 são 47,8% idênticas ao longo de uma região de 416 aminoácidos.

Exemplo 7: Construções para Expressão Recombinante de STEAP-2

Construções pGEX

Para expressar STEAP-2 em células bacterianas, porções de STEAP-2 foram fundidas com o gene da Glutathione S-transferase

(GST) por clonagem em pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech, NJ). Todas as construções foram preparadas para gerar sequências recombinantes de proteína STEAP-2 com GST fundida no terminal N e um epítipo de seis histidinas no terminal C. O marcador epitópico de seis histidinas foi gerado por adição dos códons de histidina ao iniciador de clonagem na extremidade 3' do ORF. Um local de reconhecimento de PreScission™ permite a clivagem do marcador GST da STEAP-2. O gene de resistência a ampicilina e a origem de pBR322 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Os fragmentos de STEAP-2 seguintes foram clonados em pGEX-6P-1:

Aminoácidos 287 a 390; aminoácidos 285 a 454; aminoácidos 193 a 454.

Exemplos de construções adicionais que podem ser preparadas em pGEX-6P-1 que se estendem nas seguintes regiões da proteína STEAP-2 incluem:

Aminoácidos 1 a 193; aminoácidos 1 a 454.

e em pGEX-4T: Aminoácidos 2-204; 183-387; e 276-453.

Construção pCRII

Para gerar ribossondas de sentido directo e anti-sentido para investigações de ARN *in situ*, gerou-se uma construção pCRII utilizando os pb 367 a 877 do ADNc de GTD3 de STEAP-2. O vector pCRII possui promotores de Sp6 e T7 a flanquear a inserção para conduzir a produção de ribossondas de ARN de STEAP-2 que foram utilizadas em experiências de hibridação de ARN *in situ*.

Construção pcDNA4/HisMax-TOPO

Para expressar STEAP-2 em células de mamífero, clonou-se o ORF de STEAP-2 de 1362 pb em pcDNA4/HisMax-TOPO_Version A (n.º de cat. K864-20, Invitrogen, Carlsbad, CA). A expressão da proteína é conduzida a partir do promotor de citomegalovírus (CMV) e do potenciador de tradução SP163. A proteína recombinante possui Xpress™ e epítopos de seis histidinas fundidos no terminal N. Em adição a esta construção contendo apenas o ORF de 1362 pb preparou-se uma construção

adicional com o terminal C da proteína recombinante contendo uma fusão de 28 aminoácidos resultante das sequências do vector antes do codão de terminação. O vector pcDNA4/HisMax-TOPO contém também o sinal de poliadenilação e a sequência de terminação da transcrição da hormona de crescimento bovina (BGH) para melhorar a estabilidade do ARNm juntamente com a origem de SV40 para replicação epissómica e recuperação do vector simples em linhas celulares que expressam o antigénio T grande. O gene de resistência a zeocina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Construção pcDNA3.1 /MycHis

Para expressar STEAP-2 em células de mamífero, clonou-se o ORF de STEAP-2 de 1362 pb (com início de consenso de Kozak) em pcDNA3.1/MycHis_Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA). A expressão da proteína é conduzida a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). A proteína recombinante tem o myc e seis histidinas fundidas no terminal C. O vector pcDNA3.1/MycHis contém também o sinal de poliadenilação e a sequência de terminação da transcrição da hormona de crescimento bovina (BGH) para melhorar a estabilidade do ARNm juntamente com a origem de SV40 para replicação epissómica e recuperação do vector simples em linhas celulares que expressam o antigénio T grande. O gene de resistência a neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Geraram-se construções pcDNA3.1 /MycHis adicionais utilizando os aminoácidos 6 a 454, 121-454 e 182-454 de STEAP-2.

pBlueBacHis2a

Para expressar STEAP-1 em células de insecto SF9, o ORF de STEAP-1 foi clonado em pBlueBacHis2A (Invitrogen, California). A expressão da proteína é conduzida sob o promotor de poli-hedrina. Os marcadores polipéptido HIS e Xpress do terminal N permitem a detecção e a purificação da proteína STEAP-1 recombinante. Um local de reconhecimento de enteroquinase no terminal C permite a clivagem destes

marcadores. O gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Após co-transfecção com ADN de AcMNPV, ocorre um evento de recombinação homóloga entre estas sequências resultante num vírus recombinante portador do gene de interesse e da poli-hedrina. Estão presentes uma variedade de locais de enzimas de restrição para subclonagem simplificada. Em adição, um gene repórter (b-galactosidase) identifica convenientemente placas fágicas recombinantes, para eliminar o rastreio tedioso de placas fágicas.

Construção pcDNA3.1CT-GFP-TOPO

Para expressar STEAP-2 em células de mamífero e para permitir a detecção da proteína recombinante utilizando fluorescência, clonou-se o ORF de 1362 pb (com início de consenso de Kozak) em pcDNA3.1CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). A expressão da proteína é conduzida a partir do promotor de citomegalovírus (CMV). A proteína recombinante possui a Proteína Verde Fluorescente (GFP) fundida com o terminal C que facilita a detecção não invasiva *in vivo* e estudos de biologia celular. O vector pcDNA3.1/MycHis contém também o sinal de poliadenilação e a sequência de terminação da transcrição da hormona de crescimento bovina (BGH) para melhorar a estabilidade do ARNm juntamente com a origem de SV40 para replicação epissómica e recuperação de vector simples em linhas celulares que expressam o antigénio T grande. O gene de resistência a neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*.

Uma construção adicional com uma fusão de GFP N-terminal está a ser feita em pcDNA3.1NT-GFP-TOPO estendendo-se a todo o comprimento da proteína STEAP-2.

Construções pSRa

Para gerar linhas celulares de mamífero que expressam STEAP-2 constitutivamente, clonou-se o ORF de 1362 pb em construções pSRa. São gerados retrovírus anfotrópicos e ecotrópicos por transfecção de construções pSRa na linha celular de empacotamento 293T-10A1 ou co-transfecção de pSRa e

um plasmídeo auxiliar (ϕ -) em células 293, respectivamente. O retrovírus pode ser utilizado para infectar uma variedade de linhas celulares de mamífero, resultando a integração do gene clonado, STEAP-2, nas linhas celulares hospedeiras. A expressão da proteína é conduzida a partir de uma repetição terminal longa (LTR). O gene de resistência a neomicina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina e a origem ColE1 permitem a selecção e a manutenção do plasmídeo em *E. coli*. Prepararam-se construções pSRa adicionais que fundiam o marcador FLAG no terminal C e N para permitir a detecção utilizando anticorpos anti-FLAG. A sequência de FLAG, 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEQ ID NO:34) foi adicionada ao iniciador de clonagem na extremidade 3' do ORF. Foi preparada outra construção pSRa que continha os aminoácidos 182 a 454. Esta forma truncada da proteína STEAP-2 irá ajudar a determinar a função da região N-terminal extracelular longa.

Em adição, pode preparar-se uma construção pSRa para produzir uma proteína de fusão myc/6 HIS da proteína STEAP de comprimento completo.

Exemplo 8: Análise de Expressão de STEAP-2 e Outros Membros da Família STEAP Humana

Exemplo 8A: Expressão Específica do Tecido de Membros da Família STEAP em Tecidos Humanos Normais

A análise por RT-PCR de STEAP-2 mostra expressão em todos os xenoenxertos de cancro da próstata LAPC e em próstata normal (FIG. 14, painel A). A análise de 8 tecidos humanos normais mostra expressão específica da próstata após 25 ciclos de amplificação (FIG. 14, painel B). Foi detectada expressão de nível inferior noutros tecidos apenas após 30 ciclos de amplificação. O *Northern blotting* para STEAP-2 mostra um padrão de 2 transcritos (aproximadamente 3 e 8 kb de comprimento) expressos apenas em próstata (e em níveis significativamente inferiores nos xenoenxertos LAPC), sem expressão detectável em nenhum dos outros 15 tecidos humanos normais analisados (FIG. 15, painel C). Assim, a expressão de STEAP-2 em tecidos humanos normais parece ser altamente específica da próstata.

A análise da expressão de membros da família STEAP em tecidos normais foi realizada por *Northern blot* e/ou RT-PCR. Todos os membros da família STEAP pareciam exibir padrões de expressão restringida ao tecido. A expressão de STEAP-3/AI139607 está apresentada na Fig. 12A (*Northern*) e na FIG. 12B (RT-PCR). A expressão de STEAP-4/R80991 está apresentada na Fig. 13.

Exemplo 8B: Expressão de STEAP-2 em Várias Linhas Celulares de Cancro

Os resultados de RT-PCR acima sugeriram que os diferentes membros da família STEAP exibem diferentes padrões de expressão tecidular. Interessantemente, a STEAP-2, que parece muito específica da próstata, parece ser expressa em níveis inferiores nos xenoinxertos LAPC. Isto está em contraste com STEAP-1, que é altamente expressa tanto em tecido da próstata normal como maligno.

Para mais bem caracterizar esta diferença sugerida no perfil de expressão de cancro da próstata de STEAP-2 (relativamente a STEAP-1), foi realizado um *Northern blotting* de ARN derivado dos xenoinxertos LAPC, bem como de várias linhas celulares de cancro da próstata e outros cancros, utilizando uma sonda específica de STEAP-2 (ADNc clone 98P4B6 marcado). Os resultados são mostrados na FIG. 16 e podem ser resumidos como se segue. A STEAP-2 é altamente expressa em próstata normal e nalguns dos xenoinxertos e linhas celulares de cancro da próstata. Mais particularmente, foi observada expressão muito forte no xenoinxerto LAPC-9 AD e nas células LNCaP. Foi observada expressão significativamente atenuada ou ausência de expressão nos outros xenoinxertos e linhas celulares de cancro da próstata. Uma expressão muito forte foi também evidente na linha celular de Sarcoma de Ewing RD-ES. Ao contrário de STEAP-1, que é altamente expressa em linhas celulares de cancro derivadas de tumores da bexiga, do cólon, pancreático e do ovário, a STEAP-2 apresentou uma expressão baixa a não detectável nestas mesmas linhas celulares (em comparação com a FIG. 5). Interessantemente, a STEAP-2 também não foi detectável em células PrEC, que são representativas do compartimento de células basais normais da próstata. Estes resultados sugerem que a expressão de STEAP-1 e de STEAP-2 é

diferencialmente regulada. Embora a STEAP-1 possa ter um gene que é geralmente supra-regulado em cancro, a STEAP-2 pode ter um gene que está mais restringido à próstata normal e ao cancro da próstata.

Exemplo 8C: Análise de Expressão *in Situ* de ARN de STEAP-2 em Próstata Normal e Cancro da Próstata

A expressão de ARN de STEAP-2 foi avaliada utilizando hibridação *in situ* com uma sonda anti-sentido marcada e utilizando uma sonda de sentido directo marcada como controlo. Todos os quatro espécimes de tecido de próstata normal examinados foram positivos para STEAP (Figuras 22A-B). Do mesmo modo, cinco dos cinco espécimes de tecido de cancro da próstata foram positivos utilizando hibridação *in situ* de ARN de STEAP (Figuras 23A-B). Um espécime de PIN e uma amostra de células LNCaP que foram examinados foram igualmente positivos.

Exemplo 8D: Análise da Expressão de STEAP-2 em Tecidos de Cancro

A expressão de STEAP-2 em vários tecidos de cancro foi examinada utilizando RT-PCR. Os resultados estão apresentados na Figura 24, em que a pista 1 representa uma amostra de um xenoinxerto LAPC4 AD; a pista 2 é xenoinxerto LAPC9 AD; a pista 3 é xenoinxerto LAPC9 AD² (crescido com explante de osso humano); a pista 4 é LAPC9 AD IT (crescido intratibialmente); a pista 5 é tecido reunido de pacientes de cancro do cólon; a pista 6 é tecido reunido de pacientes de cancro do pulmão; M representa uma pista marcadora; a pista 7 é tecido de próstata de normal do paciente; a pista 8 é tecido de cancro da próstata do paciente; a pista 9 é tecido reunido de pacientes de cancro do rim; a pista 10 é tecido reunido de pacientes de cancro da bexiga; a pista 11 é células HeLa; e a pista 12 é um branco de água. A maior expressão é encontrada nos três xenoinxertos LAPC9 AD. É igualmente observada expressão elevada no xenoinxerto LAPC4 AD, e em próstata normal e cancro do pulmão. Foi detectada também significativa expressão em cancro do cólon e da bexiga. Foi detectada menor expressão em amostras de pacientes de cancro do rim e próstata.

AC004969 (PAC DJ1121E10) e AC005053 (BAC RG041D11). Utilizando as sequências derivadas dos clones PAC e BAC para STEAP foram definidas as fronteiras intrão-exão (FIG. 18). Um total de 4 exões e 3 intrões foram identificados dentro da região de codificação do gene de STEAP. O conhecimento da estrutura exacta exão-intrão do gene de STEAP-1 pode ser utilizado para desenhar iniciadores dentro das sequências intrónicas que podem por sua vez ser utilizados para amplificação genómica de exões. Esta amplificação permite a análise de polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SSCP) para procurar polimorfismos associados a cancro. Os exões mutantes ou polimórficos podem ser sequenciados e comparados com STEAP de tipo selvagem. Esta análise pode ser útil para identificar pacientes que sejam mais susceptíveis a cancro da próstata agressivo, bem como outros tipos de cancro, particularmente cancros do cólon, da bexiga, pancreático, do ovário, do colo do útero e testicular.

A análise *Southern blot* mostra que o gene de STEAP-1 existe em várias espécies incluindo ratinho (FIG. 19). Por essa razão, uma biblioteca BAC de ratinho (Mouse ES 129-V edição I, Genome Systems, FRAC-4431) foi rastreada com o ADN humano para STEAP-1 (clone 10, Exemplo 2). Um clone positivo, 12P11, foi identificado e confirmado através de *Southern blotting* (FIG. 20). A informação sobre as fronteiras intrão-exão para STEAP humano pode ser utilizada para identificar as sequências de codificação de STEAP-1.

O clone genómico de STEAP-1 de ratinho pode ser utilizado para estudar o papel biológico de STEAP-1 durante o desenvolvimento e a tumorigénese. Especificamente, o clone genómico de STEAP-1 de ratinho pode ser inserido num vector *knock-out* (K/O) génico para ruptura direccionada do gene em ratinhos, utilizando métodos geralmente conhecidos na especialidade. Adicionalmente, o papel de STEAP em processos metabólicos e na função das células epiteliais pode ser elucidado. Estes ratinhos K/O podem ser cruzados com outros modelos de cancro da próstata, tais como o modelo TRAMP (Greenberg et al., *PNAS* 92: 3439, 1995) para determinar se a STEAP influencia o desenvolvimento e a progressão de cancros da próstata mais ou menos agressivos e metastáticos.

Exemplo 11: Péptidos de Ligação a HLA-A2 Previstos de STEAP-1 e STEAP-2

As sequências de aminoácidos completas das proteínas STEAP-1 e STEAP-2 foram introduzidas no algoritmo “HLA Peptide Motif Search” encontrado no website da Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) (<http://bimas.dcrt.nih.gov/>). O algoritmo “HLA Peptide Motif Search” foi desenvolvido pelo Dr. Ken Parker com base na ligação de sequências peptídicas específicas no sulco de moléculas de HLA de Classe I e especificamente HLA-A2 (Falk *et al.*, 1991, Nature **351**: 290-6; Hunt *et al.*, 1992, Science **255**:1261-3; Parker *et al.*, 1992, J. Immunol. **149**:3580-7; Parker *et al.*, 1994, J. Immunol. **152**:163-75). Este algoritmo permite a localização e a classificação de péptidos 8-mero, 9-mero e 10-mero a partir de uma sequência de proteína completa para ligação prevista a HLA-A2 assim como outras moléculas de HLA de Classe I. A maioria dos péptidos de ligação a HLA-A2 são 9-meros contendo favoravelmente uma leucina (L) na posição 2 e uma valina (V) ou leucina (L) na posição 9.

Os resultados de péptidos de ligação previstos de STEAP-1 e STEAP-2 estão mostrados na Tabela 2 adiante. Para ambas as proteínas os 5 candidatos mais bem classificados estão mostrados juntamente com a sua localização, a sequência de aminoácidos de cada péptido específico, e uma pontuação de ligação estimada. A pontuação de ligação corresponde à semivida estimada de dissociação de complexos contendo o péptido a 37°C a pH 6,5. Prevê-se que os péptidos com a maior pontuação de ligação (*i.e.* 10776,470 para o péptido 165 de STEAP-1; 1789,612 para o péptido 227 de STEAP-2) são os mais fortemente ligados a HLA de Classe I na superfície celular e assim representam os melhores alvos imunogénicos para reconhecimento de células T. A ligação real de péptidos a HLA-A2 pode ser avaliada por estabilização de expressão de HLA-A2 sobre a linha celular T2 defectiva no processamento do antigénio (Ref. 5, 6). A imunogenicidade de péptidos específicos pode ser avaliada *in vitro* por estimulação de linfócitos T citotóxicos (CTL) CD8+ na presença de células dendríticas (Xue *et al.*, 1997, Prostate **30**:73-8; Peshwa *et al.*, 1998, Prostate **36**:129-38).

Tabela 2: Ligação Prevista de Sequências Peptídicas de STEAP-1 e STEAP-2 Com A Maior Afinidade para HLA-A2

STEAP-1			
Classificação	Posição de partida	Listagem de Resíduos da Subsequência	Pontuação (Estimativa de Meio Tempo de Desassociação)
1	165	GLLSFFFAV	10776,470
2	86	FLYTLLREV	470,951
3	262	LLLGTIHAL	309,050
4	302	LIFKSILFL	233,719
5	158	MLTRKQFGL	210,633
STEAP-2			
Classificação	Posição de partida	Listagem de Resíduos da Subsequência	Pontuação (Estimativa de Meio Tempo de Desassociação)
1	227	FLYSFVRDV	1789,612
2	402	ALLISTFHV	1492,586
3	307	LLSFFFAMV	853,681
4	306	GLLSFFFAM	769,748
5	100	SLWDLRHLL	726,962

Exemplo 12: Indução por STEAP-2 da Fosforilação de Tirosina de Proteínas Celulares

As proteínas multi-transmembranares têm a capacidade de transmitir um sinal a partir da membrana e iniciar a sinalização de cascatas que regulam uma variedade de eventos a jusante, incluindo expressão de genes, diferenciação, migração e proliferação celulares (Biochim. Biophys. Acta 1997; 1348:56-62, J. Virol. 1995; 69:675-83). De modo a determinar o envolvimento de STEAP-1 e STEAP-2 em eventos de sinalização a jusante, investigou-se o efeito de STEAP-1 e STEAP-2 sobre a fosforilação de tirosina de células PC3 (Figura 26). As células PC3, que expressam estavelmente neo, STEAP-1 ou STEAP-2, foram crescidas durante a noite em soro fetal bovino (FBS) a 1% para reduzir a ocupação de receptores e a actividade de fundo. As células foram então incubadas durante 5 minutos na presença de 1% ou 10% de FBS, lisadas e

analisadas por *Western blotting* com anti-fosfotirosina (mAb 4G10). Utilizou-se uma sobrecamada utilizando Ab anti-Grb2 para mostrar que o gel estava igualmente carregado.

Os resultados (Figura 26) mostram que a expressão de STEAP-2 em células PC3 induz a fosforilação de várias proteínas sobre resíduos de tirosina, incluindo p150, p120 e p75. Em contraste, a expressão de STEAP-1 induziu a desfosforilação de p150. Várias das proteínas fosforiladas correspondem a proteínas de sinalização conhecidas, indicando que STEAP-1 e STEAP-2 podem estar a controlar a activação de cascatas de sinalização específicas.

Exemplo 13: Activação Mediada por STEAP-1 e STEAP-2 de Cascatas de MAPK

Várias proteínas multi-transmembranares induzem respostas biológicas específicas por activação de cascatas de proteína-quinase, incluindo as vias de MAPK (Curr. Med. Chem. 2000; 7:911-43, Life Sci. 2000; 67:335-6, Biol. Chem. 2000; 275:4660-9). De modo a determinar se a expressão de STEAP-1 e STEAP-2 é suficiente para regular vias de sinalização específicas que não estão de outro modo activas em células PC3 quiescentes, investigou-se o efeito destes genes sobre a activação da cascata da MAPK p38 na linha celular de cancro da próstata PC3 (Figura 27A-B). A activação da quinase p38 é dependente da sua fosforilação em resíduos de tirosina e serina. A p38 fosforilada pode ser distinguida do estado não fosforilado por um mAb Fosfo-p38. Este Ab fosfo-específico foi utilizado para estudar o estado de fosforilação de p38 em linhas celulares PC3 manipuladas.

Células PC3 que expressam estavelmente STEAP-1, STEAP-2 ou neo foram crescidas durante a noite em 1% ou 10% de FBS. Analisaram-se os lisados de células completas por *Western blotting*. As células PC3 tratadas com os activadores de p38 conhecidos, NaSaI ou TNF, foram utilizadas como controlo positivo. Os resultados mostram que enquanto a expressão do gene neo de controlo não teve efeito sobre a fosforilação de p38, a expressão de STEAP-1 e STEAP-2 em células PC3 é suficiente para induzir a activação da via da p38 (Figura 27A). Os resultados foram verificados utilizando

Western blotting com um Ab anti-p38, que mostra igual carga de proteína nos géis (Figura 27B).

Noutro conjunto de experiências, foi examinada a suficiência de expressão de STEAP-1 ou STEAP-2 na linha celular de cancro da próstata PC3 para activar a via da MAPK mitogénica, nomeadamente a cascata de ERK (Figura 28A-B). A activação de ERK é dependente da sua fosforilação de resíduos de tirosina e serina. A ERK fosforilada pode ser distinguida do estado não fosforilado por um mAb Fosfo-ERK. Este Ab fosfo-específico foi utilizado para estudar o estado de fosforilação de ERK em linhas celulares PC3 manipuladas. Células PC3, que expressam uma forma activada de Ras, foram utilizadas como controlo positivo.

Os resultados mostram que enquanto a expressão do gene neo de controlo não teve efeito sobre a fosforilação de ERK, a expressão de STEAP-2 em células PC3 é suficiente para induzir um aumento de pelo menos 3 vezes na fosforilação de ERK (Figura 28A). A expressão de STEAP-1 induziu também alguma fosforilação de ERK em células PC3 crescidas em 1% de FBS. Estes resultados foram verificados utilizando *Western blotting* anti-ERK (Figura 28A) e confirmam a activação da via da ERK por STEAP-1 e STEAP-2.

Como o FBS contém vários componentes que podem contribuir para a activação de ERK mediada por receptores, examinámos o efeito de STEAP-1 em níveis baixos e óptimos de FBS. As células PC3 que expressam neo ou STEAP-1 foram crescidas em 0,1% ou 10% de FBS durante a noite. As células foram analisadas por *Western blotting* anti-Fosfo-ERK. Esta experiência mostra que a STEAP-1 induz a fosforilação de ERK em 0,1% de FBS, e confirma que a expressão de STEAP-1 é suficiente para induzir a activação da cascata de sinalização de ERK na ausência de estímulos adicionais.

Exemplo 14: Activação de STEAP-1 Mediada por Ligandos

Mostrou-se que vários factores activam proteínas multi-transmembranares e medeiam eventos de sinalização a jusante, incluindo iões, leucotrienos, ácido lipofosfatídico, etc. (Cell Biochem. Biophys. 1999; 30:213-42). Um grupo de compostos que se sabe que activam proteínas multi-

transmembranares são os odorantes (Neuron 2000; 25:503-4). Neste exemplo, foram rastreadas 3 classes de odorantes quanto à sua capacidade para induzir a activação de sinalização mediada por tirosina-quinase em células PC3 (Figura 29).

Células PC3, que expressam estavelmente neo ou STEAP-1, foram crescidas durante a noite em 0,1% de FBS para permitir a ocupação de receptores. As células foram então tratadas durante 5 min com as concentrações indicadas (0,1-10 μ M) de citralva, etilvanilina ou IBMP. O tratamento com 10% de FBS foi utilizado como controlo. Os lisados de células completas (20 μ g) gerados a partir das diferentes condições de tratamento foram separados por SDS-PAGE e analisados por *Western blotting* anti-fosfotirosina.

Esta experiência mostra que, embora todas as 3 classes de odorantes induzissem alguma fosforilação de tirosina em células PC3-STEAP-1, apenas IBMP teve um efeito mensurável sobre a fosforilação de células PC3-neo que não expressam o gene de STEAP-1. Adicionalmente, tanto a citralva como a etilvanilina induziram um aumento na fosforilação de p136-140 e p200-210 em células PC3-STEAP-1 de uma maneira específica de STEAP-1. Em adição, a citralva induziu a fosforilação de novo de uma proteína a 160-200kDa. Os resultados demonstram que a STEAP-1 está a mediar a activação de vias de tirosina-quinase em células tratadas com odorante.

A verificação de que a citralva induziu a fosforilação de tirosina de proteínas de uma maneira mediada por STEAP-1 sugere que a STEAP-1 possa iniciar a activação de uma ou mais cascatas de sinalização. De modo a identificar uma potencial cascata de sinalização associada com a activação por odorante de STEAP-1, estudou-se o efeito de odorantes sobre a activação da cascata de MAPK em células PC3 (Figura 30). As células PC3, que expressam estavelmente neo ou STEAP-1, foram crescidas durante a noite em 0,1% de FBS. As células foram então tratadas com citralva durante 5 min. O tratamento com 10% de FBS foi utilizado como controlo. Como observado utilizando mAb fosfo-específico (anti-fosfo-ERK), a citralva activou a via da ERK de uma maneira específica de STEAP-2. Estes resultados confirmam também as verificações descritas nas Figuras 27-28,

de que a expressão de apenas STEAP-1 é suficiente para induzir a activação da via da ERK.

Exemplo 15: Identificação de Potenciais Vias de Transdução de Sinal

Para confirmar que a STEAP activa directa ou indirectamente vias de transdução de sinal conhecidas em células e para delinear eventos mediados por STEAP a jusante, realizam-se ensaios com repórter de transcrição à base de luciferase (luc) em células que expressam STEAP. Estes repórteres de transcrição contêm locais de ligação de consenso para factores de transcrição conhecidos que se encontram a jusante de vias de transdução de sinal bem caracterizadas. Os repórteres e exemplos de factores de transcrição, vias de transdução de sinal e estímulos de activação associados estão enumerados adiante.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-quinase/SAPK; crescimento/apoptose/*stress*
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; crescimento/diferenciação
3. AP-1-luc. FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; crescimento/apoptose/*stress*
4. ARE-luc, receptor de androgénio; esteróides/MAPK; crescimento/diferenciação/apoptose
5. p53-luc, p53; SAPK; crescimento/ diferenciação/apoptose
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38; crescimento/apoptose/*stress*

Os efeitos mediados por STEAP podem ser ensaiados em células que apresentam expressão de ARNm. Podem ser introduzidos plasmídeos repórter de luciferase por transfecção mediada por lípidos (TFX-50, Promega). A actividade de luciferase, um indicador da actividade relativa de transcrição, é medida por incubação de extractos celulares com o substrato luciferina e a luminescência da reacção é monitorizada num luminómetro.

Exemplo 16: Ensaios In Vitro da Função de STEAP

O perfil de expressão de STEAP no cancro da próstata sugere um papel funcional na iniciação, progressão e/ou

manutenção do tumor. A função de STEAP pode ser avaliada em células de mamífero utilizando abordagens *in vitro*. Para expressão em mamífero, a STEAP pode ser clonada em vários vectores apropriados, incluindo pcDNA 3.1 myc-His-marcador e o vector retroviral pSRotkneo (Muller *et al.*, 1991, MCB 11:1785). Utilizando estes vectores de expressão, a STEAP pode ser expressa em várias linhas celulares cancerosas, incluindo por exemplo PC-3, NIH 3T3, LNCaP e 293T. A expressão de STEAP pode ser monitorizada utilizando anticorpos anti-STEAP.

As linhas celulares de mamífero que expressam STEAP podem ser testadas em vários ensaios *in vitro* e *in vivo*, incluindo proliferação celular em cultura de tecidos, activação de sinais apoptóticos, formação de tumores primários e metastáticos em ratinhos SCID, e invasão *in vitro* utilizando um sistema de cultura de invasão de membranas (MICS) (Welch *et al.*, Int. J. Cancer 43: 449-457). O fenótipo celular de STEAP é comparado com o fenótipo de células que não têm expressão de STEAP. Em adição, as células tratadas com e sem proteína STEAP adicionada exogenamente podem ser analisadas quanto a parâmetros de crescimento alterados.

As linhas celulares que expressam STEAP podem também ser ensaiadas quanto a alteração de propriedades invasivas e migratórias por medição da passagem de células através de uma câmara de membrana porosa revestida com Matrigel (Becton Dickinson). A passagem de células através da membrana para o lado oposto é monitorizada utilizando um ensaio fluorescente (Becton Dickinson Technical Bulletin N.º 428) utilizando células indicadoras carregadas com calceína-Am (Molecular Probes). As linhas celulares analisadas incluem células PC3, 3T3 e LNCaP progenitoras e que sobre-expressam STEAP. Para ensaiar se a STEAP tem propriedades quimioattractoras, células indicadoras progenitoras são monitorizadas quanto à passagem através da membrana porosa no sentido de um gradiente de STEAP, meio condicionado comparado com meio de controlo. Este ensaio pode também ser utilizado para qualificar e quantificar a neutralização específica do efeito induzido por STEAP por composições terapêuticas para o cancro candidatas.

De modo a estabelecer se a STEAP se liga a proteínas celulares expressas em células do cancro da próstata e outras

células cancerosas ou células normais, podem ser tomadas duas abordagens. Na primeira abordagem, utilizam-se ensaios *in vitro* para ligação de STEAP recombinante marcada com HISa várias linhas celulares. Noutra abordagem, é gerada uma proteína de fusão recombinante de fosfatase alcalina-STEAP utilizando o sistema AP-TAG de GenHunter Corporation (Nashville, TN, n.º de cat. Q202), e a fusão AP-TAG é utilizada para testar a ligação de STEAP a uma variedade de linhas celulares de cancro da próstata como descrito (Cheng e Flanagan, 1994, Cell 79:157-168). Após lavagem das células e adição do substrato de FA, BCIP, que forma um precipitado azul insolúvel por desfosforilação, a ligação de STEAP é determinada por identificação da coloração azul das células sob o microscópio óptico.

Podem ser examinadas várias linhas celulares cancerosas, incluindo sem limitação, várias linhas celulares de cancro da próstata (e.g., LNCaP, PC-3, DU145, TSUPR, LAPC4). Outras linhas celulares tais como a linha celular da próstata PREC, 293T, células PIN e NIH 3T3, etc., podem também ser examinadas. Adicionalmente, podem testar-se os xenoenxertos LAPC e outros xenoenxertos de cancro da próstata. As constantes de velocidade de dissociação de equilíbrio podem ser calculadas para avaliar a força da interacção da ligação. Em adição, pode ser determinado o número de receptores celulares de superfície por células. As linhas celulares ou tecidos com a maior capacidade de ligação para com STEAP seriam preferidos para clonagem de um parceiro de ligação de STEAP.

Noutro ensaio funcional, células NIH-3T3 que expressam estavelmente STEAP podem ser analisadas quanto à sua capacidade para formar colónias em ágar mole. Nestas experiências, as células utilizadas neste procedimento (e.g. células NIH-3T3), podem ser transfectadas para expressar estavelmente STEAP ou neo ou Ras activado (como gene de teste, e controlos negativo e positivo, respectivamente) de modo a avaliar as capacidades de transformação de STEAP. Tipicamente, as experiências são realizadas em duplicado e os ensaios são avaliados aproximadamente 4 semanas após o plaqueamento das células. Quando as observações experimentais demonstram que a STEAP induz um aumento na formação de colónias relativamente a

um controlo negativo (e.g. neo) estes resultados indicam que a STEAP tem significativas capacidades de transformação.

Exemplo 17: Ensaio In Vivo para a Promoção do Crescimento Tumoral por STEAP

O efeito da proteína STEAP sobre o crescimento de células tumorais pode ser avaliado *in vivo* por sobre-expressão de genes em ratinhos portadores do tumor. Por exemplo, ratinhos SCID podem ser injectados subcutaneamente em cada flanco com 1×10^6 de uma linha celular da próstata contendo vector vazio de tkNeo ou STEAP. Podem utilizar-se pelo menos duas estratégias: (1) Expressão constitutiva de STEAP sob regulação de um promotor LTR, e (2) Expressão regulada sob controlo de um sistema de vector indutível, tal como ecdysona, tet, etc. O volume tumoral é então monitorizado a partir do surgimento de tumores palpáveis e seguido ao longo do tempo para determinar se as células que expressam STEAP crescem a velocidade mais rápida. Adicionalmente, os ratinhos podem ser implantados com 1×10^5 das mesmas células ortotopicamente para determinar se a STEAP tem um efeito sobre o crescimento local no tecido alvo (*i.e.*, próstata) ou sobre a capacidade das células para metastasizar, especificamente para os pulmões, nódulos linfáticos, fígado, medula óssea, etc. O efeito de STEAP sobre a formação e crescimento de tumores ósseos pode ser avaliado por injeção de células tumorais da próstata intratibialmente, como descrito no Exemplo 1.

Estes ensaios são igualmente úteis para determinar o efeito inibidor de STEAP de composições terapêuticas candidatas, tais como por exemplo, anticorpos de STEAP, moléculas anti-sentido de STEAP e ribozimas.

Exemplo 18: Detecção de Metástases de Cancro da Próstata em Ratinhos e Seres Humanos Utilizando Anticorpos Policlonais Anti-STEAP-1

Ratinhos

A análise imuno-histoquímica de STEAP-1 foi realizada em tecidos de 4 μ m fixados em formalina derivados de ratinhos portadores de tumores de cancro da próstata LAPC-9 ortotópicos e suas metástases derivadas do pulmão e dos nódulos

linfáticos. Secções de pulmão em série foram testadas utilizando anticorpo policlonal de ovelha anti-STEAP-1 e anticorpo policlonal de coelho (pAb) anti-PSA. Utilizou-se o exame microscópico de tecido corado para detectar células do cancro da próstata LAPC-9, e os resultados estão apresentados na Figuras 31A-F.

O pAb de ovelha anti-STEAP-1 detectou prontamente células de cancro da próstata humano na próstata de ratinho (Figura 31A), assim como em metástases nos nódulos linfáticos (Figura 31B) e no pulmão (Figura 31C-D). Tanto pequenas (Figura 31C) e grandes (Figura 31D) micrometástases no pulmão foram prontamente detectadas utilizando o pAb anti-STEAP-1. Para confirmar que as metástases do pulmão tinham origem no cancro da próstata, realizou-se uma imuno-histoquímica em secções em série de pulmão utilizando o pAb anti-PSA (Figura 31E-F). A forte coloração da superfície celular observada com pAb anti-STEAP-1 permite uma mais fácil detecção de micrometástases em comparação com a utilização do anticorpo policlonal anti-PSA.

Seres Humanos

Utilizou-se o Ab policlonal para STEAP-1 num ensaio imuno-histoquímico similar de espécimes de cancro da próstata metastático de pacientes humanos. Detectou-se uma elevada expressão de STEAP-1 tanto nas metástases dos nódulos linfáticos como nas do osso estudadas. Como apresentado nas Figuras 32A (metástase dos nódulos linfáticos) e 32B (metástase no osso), é observada uma intensa coloração pericelular nestas amostras de pacientes humanos, confirmando que a STEAP-1 é um excelente marcador para a detecção de cancro da próstata metastático.

Exemplo 19: Construções de Fusão de Voltas Extracelulares de STEAP-1, STEAP-2 e STEAP-3 com Fc

Para expressar e segregar as voltas extracelulares de STEAP-1, STEAP-2, e STEAP-3 em meios condicionados de linhas celulares de mamífero, podem clonar-se fragmentos destes genes no vector pFc para gerar fusões C-terminais da região Fc de IgG1 humana. O vector pFc foi gerado por clonagem de Fc de imunoglobulina G1 humana (bases 74-768 do n.º de acesso na

GenBank X70421) prosseguido pelo local de clivagem para IgA-protease (Roche, n.º de Cat. 1461265) codificada por 5' cctcgacctccaacaccgggg 3' (SEQ ID NO:47) em pTag-5 (GenHunter Corp. Nashville, TN) utilizando XhoI e ApaI. Esta construção gera uma fusão de Fc de IgG1 no terminal C de regiões extracelulares de STEAP-1, STEAP-2 e STEAP-3 enquanto fundindo a sequência de sinal de IgGK no terminal N.

As proteínas recombinantes resultantes são optimizadas para secreção nos meios de células de mamífero transfectadas e podem ser utilizadas para identificar proteínas tais como ligandos ou receptores que interactivam com a proteína STEAP-1, STEAP-2 e STEAP-3. Estas fusões de proteínas podem também ser utilizadas como imunogénios para gerar anticorpos. A expressão de proteínas é conduzida a partir do promotor de CMV. O gene de resistência a zeosina permite a selecção de células de mamífero que expressam a proteína e o gene de resistência a ampicilina permite a selecção do plasmídeo em *E. coli*.

As seguintes voltas extracelulares das proteínas STEAP-1, STEAP-2 e STEAP-3 são adequadas para clonagem em pFc:

STEAP-1 revihplatshqqyfykipily (SEQ ID NO:37)
 rrsyrykllnwayqqvqqnkedawiehdvwrmei (SEQ ID NO:38)
 widikqfvwytpptf (SEQ ID NO:39)

STEAP-2 ysfvrdivihpyamqqsdifykipiei (SEQ ID NO:40)
 trserylflnmayqqvhanienwneeevwrie (SEQ ID NO:41)
 krafeeeyrffy (SEQ ID NO:42)

STEAP-3 ypyvyekkdntfrmaisipnrifp (SEQ ID NO:43)
 yyvrwrlgnltvtqailkknepfstssawlsdsy (SEQ ID NO:44)

Exemplo 20: Geração de anticorpos policlonais contra STEAP-2

Utilizaram-se três imunogénios para gerar anticorpos específicos para STEAP-2. Dois imunogénios eram péptidos que codificam os aminoácidos 153-165 (ALQLGPKDASRQV; SEQ ID NO:45) e os aminoácidos 345-358 (IENSWNEEEVWRIE; SEQ ID NO:46) da sequência da proteína STEAP-2. O primeiro péptido reside no terminal N de STEAP-2, que é intracelular utilizando o

programa SOSUI de previsão da topologia de membranas. O último péptido reside na região entre os domínios transmembranares 3 e 4, e prevê-se que esta região codifica a segunda de 3 voltas extracelulares. Um terceiro imunogénio foi uma proteína de fusão de glutathione-S-transferase (GST) abrangendo os aminoácidos 2-204 da sequência da proteína STEAP-2. A proteína de fusão recombinante GST-STEAP-2 foi purificada a partir das bactérias induzidas por cromatografia de afinidade em glutathione-Sepharose.

Em adição aos antigénios anteriores, péptidos que codificam outras regiões da proteína STEAP-2, ou proteínas bacterianas e produzidas em baculovírus e vírus que codificam quer sequências de comprimento completo quer parciais da proteína STEAP-2, são utilizados para gerar uma variedade de anticorpos específicos para STEAP-2. Estes anticorpos são dirigidos para regiões que podem modular a função de STEAP-2.

Geração de anticorpos policlonais (pAb)

Para gerar pAb contra STEAP-2, a proteína de fusão de GST purificada e os péptidos acoplados a hemocianina de lapa *Fissurella* (KLH) foram utilizados para imunizar coelhos individuais como se segue. Os coelhos foram imunizados com 200 µg de proteína de fusão ou antigénio KLH-péptido misturados com adjuvante completo de Freund. Os coelhos foram então injectados de duas em duas semanas com 200 µg de imunogénio em adjuvante incompleto de Freund. Tomaram-se sangrias de teste aproximadamente 7-10 dias após cada imunização. O título do anti-soro de péptido 153-165 foi de pelo menos 25 000 e do anti-soro de péptido 345-358 de pelo menos 10 000, determinados por ELISA contra os imunogénios respectivos. O título do soro da fusão de GST era de pelo menos 300 000. O anti-soro do péptido é purificado por afinidade por passagem do soro sobre uma coluna de afinidade composta pelo respectivo péptido acoplado covalentemente a uma matriz de Affigel (BioRad). O soro criado contra a fusão de GST é semi-purificado, primeiro por remoção de anticorpos reactivos com GST por passagem sobre uma coluna de afinidade de GST. O anticorpo específico para STEAP-2 é então isolado por passagem sobre uma coluna de afinidade de GST-STEAP-2. Alternativamente, o anti-soro específico para STEAP-2 é isolado por cromatografia de afinidade utilizando uma proteína

de fusão proteína de ligação a maltose (MBP)-STEAP-2 que codifica os mesmos aminoácidos

Exemplo 21: Geração de Anticorpos Monoclonais contra Proteínas STEAP

Para gerar mAb contra as proteínas STEAP-1, STEAP-2, STEAP-3 ou STEAP-4, imunizam-se ratinhos BalbC intraperitonealmente com 20-50 µg de péptido acoplado a KLH ou com polipéptidos recombinantes bacterianos, tais como proteínas de fusão de GST, que codificam regiões da sequência da respectiva proteína membro de STEAP em adjuvante completo de Freund. Os ratinhos são então subsequentemente imunizados a cada 2-4 semanas com 20-50 µg de imunogénio misturado com adjuvante incompleto de Freund. Alternativamente, utilize-se adjuvante Ribi para as imunizações iniciais. Tomam-se sangrias de teste 7-10 dias após a imunização para monitorizar o título e a especificidade da resposta imunitária.

O soro de ratinhos imunizados com uma proteína de fusão de GST abrangendo os aminoácidos 148-251 de STEAP-1 atingiu um título de pelo menos 8×10^6 como determinado por ELISA e reconheceu especificamente a proteína STEAP-1 por *Western blot* (Figura 33). Uma vez obtidas a reactividade e a especificidade apropriadas como determinado por análises de ELISA, *Western blotting* e citometria de fluxo, é então realizada a geração de fusões e hibridomas utilizando procedimentos estabelecidos vem conhecidos na especialidade (Harlow e Lane, 1988).

A Figura 33 é um *Western blot* que mostra que o pAb murino anti-STEAP-1 reconhece a proteína STEAP-1 em linhas celulares manipuladas e proteína STEAP-1 endógena em células LNCaP. Os lisados de células LNCaP e células 293T transfectadas com pcDNA 3.1 MYC/ STEAP-1 marcada com HIS ou vector vazio de neo, e células RAT1 manipuladas para expressar STEAP-1 ou um gene neo de controlo, foram separados por SDS-PAGE e transferidos para nitrocelulose. A transferência foi então submetida a análise de *Western* anti-STEAP utilizando uma diluição de 1:1000 de soro de ratinhos imunizados com uma proteína de fusão GST-STEAP-1.

São igualmente utilizados antigénios e estratégias de imunização alternativos para gerar mAb com reactividade e

especificidade específicas para várias regiões das proteínas STEAP. Estes antigénios podem incluir proteínas recombinantes produzidas em baculovírus ou proteínas de fusão com Fc de IgG humana expressas e segregadas em mamífero que codificam várias regiões da sequência de cada proteína membro da família STEAP, tal como domínios extracelulares previstos. É também utilizada uma estratégia de imunização baseada em células em que o ADNc de um membro da família STEAP é sobre-expresso em células tais como fibroblastos NIH3T3 de ratinho ou células prc-B de murino300.19 e células completas ou preparações de membrana destas células são utilizadas como imunogénio. Em adição, um protocolo de imunização à base de ADN em que um vector de expressão de mamífero que codifica o ADNc de STEAP-1 ou STEAP-2 tal como pcDNA 3.1 é utilizado para imunizar ratinhos por injeção directa do ADN plasmídico. Este protocolo é utilizado quer isoladamente quer em combinação com estratégias de imunização à base de proteínas e/ou de células.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> UroGenesys, Inc.

<120> NOVOS ANTIGÉNIOS TRANSMEMBRANARES EM SERPENTINA EXPRESSOS EM
CANCROS HUMANOS E SUAS UTILIZAÇÕES

<130> 129.17WOI1

<150> 09/455,486 <151> 1999-12-06

<160> 47

<170> FastSEQ for Windows, Versão 4.0

<210> 1

<211> 1130

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> CDS

<222> (64)...(1083)

<400> 1

atggaaagca gaaaagacat cacaaaccaa gaagaacttt ggaaaatgaa gcctaggaga	60
aat tta gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc	108
Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser	
1 5 10 15	
atg cta aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct	156
Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala	
20 25 30	
gat gaa ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt	204
Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe	
35 40 45	
cca cag tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg	252
Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu	
50 55 60	
act ttt ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac cct tta gca act	300
Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr	
65 70 75	
tcc cat caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa	348
Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys	
80 85 90 95	
gtc ttg cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca	396
Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro	
100 105 110	
ggg gtg ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag	444
Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys	
115 120 125	
aag ttt cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt	492
Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe	
130 135 140	

```

999 ctt ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg      540
Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu
    145                150                155

tct tac cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca      588
Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala
    160                165                170                175

tat caa cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat      636
Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp
    180                185                190

gtt tgg aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca      684
Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala
    195                200                205

ata ctg gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct      732
Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser
    210                215                220

ttg aca tgg aga gaa ttt cac tat att cag agc aag cta gga att gtt      780
Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys Leu Gly Ile Val
    225                230                235

tcc ctt cta ctg ggc aca ata cac gca ttg att ttt gcc tgg aat aag      828
Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe Ala Trp Asn Lys
    240                245                250                255

tgg ata gat ata aaa caa ttt gta tgg tat aca cct cca act ttt atg      876
Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro Pro Thr Phe Met
    260                265                270

ata gct gtt ttc ctt cca att gtt gtc ctg ata ttt aaa agc ata cta      924
Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe Lys Ser Ile Leu
    275                280                285

ttc ctg cca tgc ttg agg aag aag ata ctg aag att aga cat ggt tgg      972
Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile Arg His Gly Trp
    290                295                300

gaa gac gtc acc aaa att aac aaa act gag ata tgt tcc cag ttg tag     1020
Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys Ser Gln Leu *
    305                310                315

aat tac tgt tta cac aca ttt ttg ttc aat att gat ata ttt tat cac     1068
Asn Tyr Cys Leu His Thr Phe Leu Phe Asn Ile Asp Ile Phe Tyr His
    320                325                330

caa cat ttc aag ttt gtatttggtta ataaaatgat tattcaagga aaaaaaaaaa     1123
Gln His Phe Lys Phe
    335

aaaaaaa                                                                1130

```

<210> 2

<211> 339

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 2

```

Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met
 1          5          10          15
Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp

```

```
<220>
<223> iniciador
```

<400> 5
cagaacttca gcacacacag gaac 24

<210> 6
<211> 3627
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

ggggcccgca	cctctgggca	gcagcggcag	ccgagactca	cggccaagct	aaggcgaaga	60
gtgggtggct	gaagccatac	tattttatag	aattaatgga	aagcagaaaa	gacatcacaa	120
accaagaaga	actttgga	atgaagccta	ggagaaat	agaagaagac	gattatttgc	180
ataaggacac	gggagagacc	agcatgctaa	aaagacctgt	gcttttgc	ttgcacacaa	240
cagcccatgc	tgatgaattt	gactgccctt	cagaacttca	gcacacacag	gaactctttc	300
cacagtggca	cttgccaatt	aaaatagctg	ctattatagc	atctctgact	tttctttaca	360
ctctctcgag	ggaagtaatt	cacctcttag	caacttccca	tcaacaatat	ttttataaaa	420
ttccaactct	ggcctcaaac	aaagtcttgc	caatggtttc	catcactctc	ttggcattgg	480
tttactggcc	aggtgtgata	gcagcaattg	tccaacttca	taatggaacc	aagtataaga	540
agtttccaca	ttggttgat	aagtggatgt	taacaagaaa	gcagtttggg	cttctcagtt	600
tcttttttgc	tgtactgcat	gcaatttata	gtctgtctta	cccaatgagg	cgatcctaca	660
gatacaagtt	gctaaactgg	gcataatcaac	aggtccaaca	aaataaagaa	gatgcctgga	720
ttgagcatga	tgtttggaga	atggagattt	atgtgtctct	gggaattgtg	ggattggcaa	780
tactggctct	gttggctgtg	acatctattc	catctgtgag	tgactctttg	acatggagag	840
aatttccata	tattcaggta	aataatatat	aaaataaccc	taagaggtaa	atctcttttt	900
tgtgtttatg	atatagaata	tgttgacttt	acccataaaa	aaataacaaa	tgtttttcaa	960
cagcaagat	cttatacttg	ttccaattaa	taatgtgctc	tctgttgttt	ttccctattg	1020
cttctaatta	ggacaagtgt	ttcctagaca	taataaaaag	gcattaaaat	attcttttgt	1080
tttttttttt	tgtttgtttg	ttttttgttt	gtttgtttgt	ttttttgaga	tgaagtctcg	1140
ctctgttgcc	catgctggag	tacagtggca	cgatctcggc	tactgcaac	ctgcgcctcc	1200
tgggttcagg	cgattctctt	gcctcagcct	cctgagtagc	tgggattaca	ggcaccctc	1260
accatgtcca	gctaattttt	gtatttttag	tagagacagg	gttttcccat	gttggccagg	1320
ctggctctga	tctcctgacc	tcaaatgac	cgcccacctc	ggcctcccaa	agtgcctggg	1380
tgacagtgtg	gagccaccac	actcagcctg	ctctttctaa	tatttgaaac	ttgttagaca	1440
atattgtacc	catctaattg	gatattttag	gaatccaata	tgcattggtt	attatttctt	1500
aaaaaaaata	ttcttttacc	tgtcacctga	atttagtaat	gccttttatg	ttacacaaact	1560
tagcactttc	cagaaacaaa	aactctctcc	ttgaaataat	agagttttta	tctaccaaag	1620
atatgttagt	gtctcatttc	aaaggctgct	ttttccagct	tacattttat	atacttactc	1680
acttgaagtt	tctaaatatt	cttctaattt	taaaactatc	tcagattttac	tgaggtttat	1740
cttctgggtg	tagattatcc	ataagaagag	tgatgtgcca	gaatcactct	gggatccttg	1800
tctgacaaga	ttcaaaggac	ttaaattta	tcagtcatga	acactgccaa	ttaccgttta	1860
tgggtagaca	tctttggaaa	tttccacaag	gtcagacatt	cgcaactatc	ccttctacat	1920
gtccacacgt	atactccaac	actttattag	gcactctgatt	agtttgga	gtatgcctcc	1980
atctgaatta	gtccagtggt	gcttagagtt	ggtacaacat	tctcacagaa	tttcttaatt	2040
ttgtagggtc	agcctgataa	ccactggagt	tctttggtcc	tcattaaata	gctttcttca	2100
cacattgtct	tgcttgtttc	acatatgatg	aacactgctt	tttagacttc	attaggaatt	2160
taggactgca	tcttgacaac	tgagcctatt	ctactatatg	tacaatacct	agcccataat	2220
aggtatacaa	tacacatttg	gtaaaactaa	ttttcaacca	atgacatgta	tttttcaact	2280
agtaacctag	aaatgtttca	cttaaaatct	gagaactggg	tacactacaa	gttaccttgg	2340
agattcatat	atgaaaacgc	aaacttagct	atttgattgt	attcactggg	acttaagaat	2400
gcgcctgaat	aattgtgagt	tcgatttgtt	ctggcaggct	aatgaccatt	tccagtaaag	2460
tgaatagagg	tcagaagtgc	tataaaagag	gtgtgtcag	aacaccgttg	agattacata	2520
gggtaacaac	tatttttaag	caactttatt	tgtgtagtga	caaagcatcc	caatgcaggc	2580
tgaaatgttt	catcacatct	ctggatctct	ctattttgtg	cagacattga	aaaaattgtt	2640
catattatct	ccatgtttatc	agaatatttg	attttttaaa	aacataggcc	aagtctattc	2700
acttcattat	tcattttatca	aaatcagagt	gaatcacatt	agtcgccttc	acaactgata	2760
aagatcactg	aagtcacatt	gatttttgct	ataatcttca	atctacctat	atttaattga	2820
gaatctaaaa	tgtacaaatc	attgtgttga	ttctgcagtg	atcctgctat	aagtaagact	2880
cagtcctga	tttttaggtat	cctgtgaaaa	gcagaattaa	gacaaatata	caagagacaa	2940
agcacaaaaa	ataaatatca	taaggggatg	aacaaaatgg	tggagaaaga	gtagacaaag	3000
tttttgatca	cctgccttca	aagaaaggct	gtgaattttg	ttcacttaga	cagcttggag	3060
acaagaaat	accacaaagt	aagggtgagga	ggataggcaa	aaagagcaga	aagatgtgaa	3120
tggacattgt	tgagaaatgt	gataggaaaa	caatcataga	taaaggattt	ccaagcaca	3180
gagcatatcc	agatgaggta	ggatgggata	aactcttatt	gaaccaatct	tcaccaatct	3240
tgtttttctt	ttgcagagca	agctaggaat	tgtttccctt	ctactgggca	caatacacgc	3300
attgattttt	gcctggaata	agtggataga	tataaaacaa	tttgatgggt	atacacctcc	3360
aacttttatg	atagctgttt	tccttccaat	tgttgccttg	atatttaaaa	gcatactatt	3420
cctgccatgc	ttgaggaaga	agatactgaa	gattagacat	ggttgggaag	acgtcaccaa	3480
aattacaaa	actgagatat	gttcccagtt	gtagaattac	tgtttacaca	catttttgtt	3540
caatattgat	atattttatc	accaacattt	caagtttgta	tttgtaata	aaatgattat	3600
tcaaggaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaaaa				3627

<210> 7
 <211> 2453
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 <220>
 <221> CDS
 <222> (355)...(1719)
 <400> 7

```

ggacgcgtgg gcggacgcgt gggttcctcg ggccctcggc gccacaagct gtccgggcac      60
gcagccccta gcggcgcgtc gctgccaagc cggcctcggc gcgcctccct ccttccttct      120
ccccctggctg ttccgcgatcc agcttgggta ggccggggaag cagctggagt gcgaccgcca      180
cggcagccac cctgcaaccg ccagtcggag gtgcagtcgg taggccttg cccccgggtg      240
ggcccttggg gagtcggcgc cgtccccgag gagctgcaag gctcgccctt gcccggcgtg      300
gagggcgcgg ggggcgcgga ggatattctt ggtgatcttg gaagtgtccg tate atg      357
                                     Met
                                     1

gaa tca atc tct atg atg gga agc cct aag agc ctt agt gaa act tgt      405
Glu Ser Ile Ser Met Met Gly Ser Pro Lys Ser Leu Ser Glu Thr Cys
                    5                      10                      15

tta cct aat ggc ata aat ggt atc aaa gat gca agg aag gtc act gta      453
Leu Pro Asn Gly Ile Asn Gly Ile Lys Asp Ala Arg Lys Val Thr Val
                    20                      25                      30

ggg gtg att gga agt gga gat ttt gcc aaa tcc ttg acc att cga ctt      501
Gly Val Ile Gly Ser Gly Asp Phe Ala Lys Ser Leu Thr Ile Arg Leu
                    35                      40                      45

att aga tgc ggc tat cat gtg gtc ata gga agt aga aat cct aag ttt      549
Ile Arg Cys Gly Tyr His Val Val Ile Gly Ser Arg Asn Pro Lys Phe
                    50                      55                      60                      65

gct tct gaa ttt ttt cct cat gtg gta gat gtc act cat cat gaa gat      597
Ala Ser Glu Phe Phe Pro His Val Val Asp Val Thr His His Glu Asp
                    70                      75                      80

gct ctc aca aaa aca aat ata ata ttt gtt gct ata cac aga gaa cat      645
Ala Leu Thr Lys Thr Asn Ile Ile Phe Val Ala Ile His Arg Glu His
                    85                      90                      95

tat acc tcc ctg tgg gac ctg aga cat ctg ctt gtg ggt aaa atc ctg      693
Tyr Thr Ser Leu Trp Asp Leu Arg His Leu Leu Val Gly Lys Ile Leu
                    100                      105                      110

att gat gtg agc aat aac atg agg ata aac cag tac cca gaa tcc aat      741
Ile Asp Val Ser Asn Asn Met Arg Ile Asn Gln Tyr Pro Glu Ser Asn
                    115                      120                      125
  
```

gct gaa tat ttg gct tca tta ttc cca gat tct ttg att gtc aaa gga Ala Glu Tyr Leu Ala Ser Leu Phe Pro Asp Ser Leu Ile Val Lys Gly 130 135 140 145	789
ttt aat gtt gtc tca gct tgg gca ctt cag tta gga cct aag gat gcc Phe Asn Val Val Ser Ala Trp Ala Leu Gln Leu Gly Pro Lys Asp Ala 150 155 160	837
agc cgg cag gtt tat ata tgc agc aac aat att caa gcg cga caa cag Ser Arg Gln Val Tyr Ile Cys Ser Asn Asn Ile Gln Ala Arg Gln Gln 165 170 175	885
gtt att gaa ctt gcc cgc cag ttg aat ttc att ccc att gac ttg gga Val Ile Glu Leu Ala Arg Gln Leu Asn Phe Ile Pro Ile Asp Leu Gly 180 185 190	933
tcc tta tca tca gcc aga gag att gaa aat tta ccc cta cga ctc ttt Ser Leu Ser Ser Ala Arg Glu Ile Glu Asn Leu Pro Leu Arg Leu Phe 195 200 205	981
act ctc tgg aga ggg cca gtg gtg gta gct ata agc ttg gcc aca ttt Thr Leu Trp Arg Gly Pro Val Val Val Ala Ile Ser Leu Ala Thr Phe 210 215 220 225	1029
ttt ttc ctt tat tcc ttt gtc aga gat gtg att cat cca tat gct aga Phe Phe Leu Tyr Ser Phe Val Arg Asp Val Ile His Pro Tyr Ala Arg 230 235 240	1077
aac caa cag agt gac ttt tac aaa att cct ata gag att gtg aat aaa Asn Gln Gln Ser Asp Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Glu Ile Val Asn Lys 245 250 255	1125
acc tta cct ata gtt gcc att act ttg ctc tcc cta gta tac ctt gca Thr Leu Pro Ile Val Ala Ile Thr Leu Leu Ser Leu Val Tyr Leu Ala 260 265 270	1173
ggc ctt ctg gca gct gct tat caa ctt tat tac ggc acc aag tat agg Gly Leu Leu Ala Ala Ala Tyr Gln Leu Tyr Tyr Gly Thr Lys Tyr Arg 275 280 285	1221
aga ttt cca cct tgg ttg gaa acc tgg tta cag tgt aga aaa cag ctt Arg Phe Pro Pro Trp Leu Glu Thr Trp Leu Gln Cys Arg Lys Gln Leu 290 295 300 305	1269
gga tta cta agt ttt ttc ttc gct atg gtc cat gtt gcc tac agc ctc Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Met Val His Val Ala Tyr Ser Leu 310 315 320	1317
tgc tta ccg atg aga agg tca gag aga tat ttg ttt ctc aac atg gct Cys Leu Pro Met Arg Arg Ser Glu Arg Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala 325 330 335	1365
tat cag cag gtt cat gca aat att gaa aac tct tgg aat gag gaa gaa Tyr Gln Gln Val His Ala Asn Ile Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu 340 345 350	1413
gtt tgg aga att gaa atg tat atc tcc ttt ggc ata atg agc ctt ggc Val Trp Arg Ile Glu Met Tyr Ile Ser Phe Gly Ile Met Ser Leu Gly 355 360 365	1461
tta ctt tcc ctc ctg gca gtc act tct atc cct tca gtg agc aat gct Leu Leu Ser Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asn Ala 370 375 380 385	1509

```

tta aac tgg aga gaa ttc agt ttt att cag tct aca ctt gga tat gtc 1557
Leu Asn Trp Arg Glu Phe Ser Phe Ile Gln Ser Thr Leu Gly Tyr Val
390 395 400

gct ctg ctc ata agt act ttc cat gtt tta att tat gga tgg aaa cga 1605
Ala Leu Leu Ile Ser Thr Phe His Val Leu Ile Tyr Gly Trp Lys Arg
405 410 415

gct ttt gag gaa gag tac tac aga ttt tat aca cca cca aac ttt gtt 1653
Ala Phe Glu Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe Tyr Thr Pro Pro Asn Phe Val
420 425 430

ctt gct ctt gtt ttg ccc tca att gta att ctg gat ctt ttg cag ctt 1701
Leu Ala Leu Val Leu Pro Ser Ile Val Ile Leu Asp Leu Leu Gln Leu
435 440 445

tgc aga tac cca gac tga gctggaactg gaatttgtct tcctattgac 1749
Cys Arg Tyr Pro Asp *
450

tctacttctt taaaagcggc tgcccattac attcctcagc tgtccttgca gttaggtgta 1809
catgtgactg agtgttggcc agtgagatga agtctcctca aaggaaggca gcatgtgtcc 1869
tttttcaccc cttcatcttg ctgctgggat tgtggatata acaggagccc tggcagctgt 1929
ctccagagga tcaaagccac acccaaagag taaggcagat tagagaccag aaagaccttg 1989
actacttccc tacttccact gcttttccctg catttaagcc attgtaaatc tgggtgtgtt 2049
acatgaagtg aaaattaatt cttctgccc ttcagttctt tatcctgata ccatttaaca 2109
ctgtctgaat taactagact gcaataattc tttcttttga aagcttttaa aggataatgt 2169
gcaattcaca ttaaaattga ttttccattg tcaattagtt atactcattt tcctgccttg 2229
atctttcatt agatattttg tatctgcttg gaatatatta tcttcttttt aactgtgtaa 2289
ttggtaatta ctaaaactct gtaatctcca aaatattgct atcaaattac acaccatgtt 2349
ttctatcatt ctcatagatc tgccttataa acattttaat aaaaagtact atttaatgat 2409
ttaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa 2453

```

<210> 8

<211> 454

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

```

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

```

[illegible]

```
<210> 9
<211> 4419
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<220>
<221> CDS
<222> (85) ... (1464)
```

```
<400> 9
cgaaacttcc ctctaccgcg ccggcccgcg gcgcgcacgg ttggcgttg acgttcctc      60
cttgaagcg cctctccctc agtt atg gag aaa act tgt ata gat gca ctt      111
Met Glu Lys Thr Cys Ile Asp Ala Leu
1 5

cct ctt act atg aat tct tca gaa aag caa gag act gta tgt att ttt      159
Pro Leu Thr Met Asn Ser Ser Glu Lys Gln Glu Thr Val Cys Ile Phe
10 15 20 25

gga act ggt gat ttt gga aga tca ctg gga ttg aaa atg ctc cag tgt      207
Gly Thr Gly Asp Phe Gly Arg Ser Leu Gly Leu Lys Met Leu Gln Cys
30 35 40

ggg tat tct gtt gtt ttt gga agt cga aac ccc cag aag acc acc cta      255
Gly Tyr Ser Val Val Phe Gly Ser Arg Asn Pro Gln Lys Thr Thr Leu
45 50 55

ctg ccc agt ggt gca gaa gtc ttg agc tat tca gaa gca gcc aag aag      303
Leu Pro Ser Ser Gly Ala Glu Val Leu Ser Tyr Ser Glu Ala Ala Lys Lys
60 65 70
```

tct ggc atc ata atc ata gca atc cac aga gag cat tat gat ttt ctc Ser Gly Ile Ile Ile Ile Ala Ile His Arg Glu His Tyr Asp Phe Leu 75 80 85	351
aca gaa tta act gag gtt ctc aat gga aaa ata ttg gta gac atc agc Thr Glu Leu Thr Glu Val Leu Asn Gly Lys Ile Leu Val Asp Ile Ser 90 95 100 105	399
aac aac ctc aaa atc aat caa tat cca gaa tct aat gca gag tac ctt Asn Asn Leu Lys Ile Asn Gln Tyr Pro Glu Ser Asn Ala Glu Tyr Leu 110 115 120	447
gct cat ttg gtg cca gga gcc cac gtg gta aaa gca ttt aac acc atc Ala His Leu Val Pro Gly Ala His Val Val Lys Ala Phe Asn Thr Ile 125 130 135	495
tca gcc tgg gct ctc cag tca gga gca ctg gat gca agt cgg cag gtg Ser Ala Trp Ala Leu Gln Ser Gly Ala Leu Asp Ala Ser Arg Gln Val 140 145 150	543
ttt gtg tgt gga aat gac agc aaa gcc aag caa aga gtg atg gat att Phe Val Cys Gly Asn Asp Ser Lys Ala Lys Gln Arg Val Met Asp Ile 155 160 165	591
gtt cgt aat ctt gga ctt act cca atg gat caa gga tca ctc atg gca Val Arg Asn Leu Gly Leu Thr Pro Met Asp Gln Gly Ser Leu Met Ala 170 175 180 185	639
gcc aaa gaa att gaa aag tac ccc ctg cag cta ttt cca atg tgg agg Ala Lys Glu Ile Glu Lys Tyr Pro Leu Gln Leu Phe Pro Met Trp Arg 190 195 200	687
ttc ccc ttc tat ttg tct gct gtg ctg tgt gtc ttc ttg ttt ttc tat Phe Pro Phe Tyr Leu Ser Ala Val Leu Cys Val Phe Leu Phe Phe Tyr 205 210 215	735
tgt gtt ata aga gac gta atc tac cct tat gtt tat gaa aag aaa gat Cys Val Ile Arg Asp Val Ile Tyr Pro Tyr Val Tyr Glu Lys Lys Asp 220 225 230	783
aat aca ttt cgt atg gct att tcc att cca aat cgt atc ttt cca ata Asn Thr Phe Arg Met Ala Ile Ser Ile Pro Asn Arg Ile Phe Pro Ile 235 240 245	831
aca gca ctt aca ctg ctt gct ttg gtt tac ctc cct ggt gtt att gct Thr Ala Leu Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala 250 255 260 265	879
gcc att cta caa ctg tac cga ggc aca aaa tac cgt cga ttc cca gac Ala Ile Leu Gln Leu Tyr Arg Gly Thr Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Asp 270 275 280	927
tgg ctt gac cac tgg atg ctt tgc cga aag cag ctt ggc ttg gta gct Trp Leu Asp His Trp Met Leu Cys Arg Lys Gln Leu Gly Leu Val Ala 285 290 295	975
ctg gga ttt gcc ttc ctt cat gtc ctc tac aca ctt gtg att cct att Leu Gly Phe Ala Phe Leu His Val Leu Tyr Thr Leu Val Ile Pro Ile 300 305 310	1023
cga tat tat gta cga tgg aga ttg gga aac tta acc gtt acc cag gca Arg Tyr Tyr Val Arg Trp Arg Leu Gly Asn Leu Thr Val Thr Gln Ala 315 320 325	1071

ata ctc aag aag gag aat cca ttt agc acc tcc tca gcc tgg ctc agt Ile Leu Lys Lys Glu Asn Pro Phe Ser Thr Ser Ser Ala Trp Leu Ser 330 335 340 345	1119
gat tca tat gtg gct ttg gga ata ctt ggg ttt ttt ctg ttt gta ctc Asp Ser Tyr Val Ala Leu Gly Ile Leu Gly Phe Phe Leu Phe Val Leu 350 355 360	1167
ttg gga atc act tct ttg cca tct gtt agc aat gca gtc aac tgg aga Leu Gly Ile Thr Ser Leu Pro Ser Val Ser Asn Ala Val Asn Trp Arg 365 370 375	1215
gag ttc cga ttt gtc cag tcc aaa ctg ggt tat ttg acc ctg atc ttg Glu Phe Arg Phe Val Gln Ser Lys Leu Gly Tyr Leu Thr Leu Ile Leu 380 385 390	1263
tgt aca gcc cac acc ctg gtg tac ggt ggg aag aga ttc ctc agc cct Cys Thr Ala His Thr Leu Val Tyr Gly Gly Lys Arg Phe Leu Ser Pro 395 400 405	1311
tca aat ctc aga tgg tat ctt cct gca gcc tac gtg tta ggg ctt atc Ser Asn Leu Arg Trp Tyr Leu Pro Ala Ala Tyr Val Leu Gly Leu Ile 410 415 420 425	1359
att cct tgc aca tca agt ttg tcc taa tca tgc cat gtg tag aca aca Ile Pro Cys Thr Ser Ser Leu Ser * Ser Cys His Val * Thr Thr 430 435	1407
ccc tta caa gga tcc gcc agg gct ggg aaa gga act caa aac act aga Pro Leu Gln Gly Ser Ala Arg Ala Gly Lys Gly Thr Gln Asn Thr Arg 440 445 450 455	1455
aaa agc att gaatggaaaa tcaatattta aaacaaagtt caatttagct Lys Ser Ile	1504
ggattttctga actatggttt tgaatgttta aagaagaatg atgggtacag ttaggaaagt ttttttctta caccgtgact gagggaaaca ttgcttgcct ttgagaaatt gactgacata ctggaagaga acaccatttt atctcaggtt agtgaagaat cagtgcagggt ccctgactct tattttccca gagggcatgg agctgagatt gagactagcc ttgtggtttc actataaaga gtttccttgt tatgggcaac atgcctgacc taatgtcttg caaaatccaa tagaagtatt gcagcttctt tctctggctc aagggtgag ttaagtga aaagaaacag cacaatggtg accactgata aaggctttat taggtatata tgaggaaagt ggtcacatga aatgtaaaaa gggaatgagg tttttgttgt tttttggaag taaaggcaaa cataaatatt accatgatga attctagtga aatgaccctt tgactttgct tttcttaata cagatattta ctgagaggaa ctatttttat aacacaagaa aaatttacia ttgattaaaa gtatccatgt cttggataca tacgtatcta tagagctggc atgtaattct tctctataaa agaataaggta taggaaagac tgaataaaaa tggagggata tccccttgga ttctacttgc attgtgcaat aagcaaagaa gggttgataa aagttcttga tcaaaaagtt caaagaaacc agaatttttag acagcaagct aaataaatat tgtaaaattg cactatatta ggtaaagtat tatttaggta ttataaatatg ctttgtaaaat tttatatctc aaatattgct caatattttt catctattaa attaatctct agtgtaaaata agtagcttct atatctgtct tagtctatta taattgtaag gagtaaaatt aatgaatag tctgcaggta taaatttgaa caatgcatag atgatcgaaa attacggaaa atcatagggc agagaggtgt gaagattcat cattatgtga aatttggatc tttctcaaat ccttgctgaa atttaggatg gtctctactg tttttctgtg ctgatagtac cctttccaag gtgaccttca gggggattaa ccttcttagc tcaagcaatg agctaaaagg agccttatgc atgatcttcc cacatatcaa aataactaaa aggcactgag ttgggcattt tctgacctgc tctgctaaga cctttttttt ttttttactt tcattataac atattataca tgacattata caaaaatgat taaaatatat taaaacaaca tcaacaatcc aggatatttt tctataaaac tttttaaaaa taattgtatc tatatattca attttacatc ctttttcaaa ggctttgttt ttctaagggc tttgttttcc tttttattat ttttttcttt tttatttttt tgagacagtc ttgctctgtc gctcaggctg gagtgcagtg gcacgatctc agctcactgc aacctctcc tcccagggtc aagtgtattct tgttcatcag cctcccagat agctgggact acaggcatgt	1564 1624 1684 1744 1804 1864 1924 1984 2044 2104 2164 2224 2284 2344 2404 2464 2524 2584 2644 2704 2764 2824 2884 2944 3004 3064 3124

```

gccactatgc ccagctaatt tttgtacttt tagtagagac aggggtttcac cacattgggc 3184
aggctgggtct tgaatgctg gcgtcaagtg atctgcctgc ctccgcctta cgtaatatat 3244
tttcttaatg gctgcataat atcacatcaa ataggcattt ttcaaacctc tttccttatt 3304
aaacatgtag actatatcca ttttttacta aaataaataa catttcagat aatatctttg 3364
cactgataat gttgccaagc cttttctaaa gtgaccttat caatttaatt accattggat 3424
gaggggtgtg ctttcatcgc accattgtag attgtctttt ttatttcaat ttgcgtttat 3484
ttataactgg ttgcaaaggt acacagaaca cacgctcctt caacttatct ttgataaacc 3544
caagcaagga tacaaaaagt tggacgacat tgagtagagt catgggtatac ggtgctgacc 3604
ctacagtatc agtggaaaag ataaggaaaa tgtcactact cacctatggt atgcaaaaca 3664
ggttaggtgt ctggggctgg atactgctct tttacttgag cattgggtga ttaaagttta 3724
ggtaccatcc aggcctggtct agagaagtct ttggagttaa ccatgctctt tttgttaaag 3784
aagagagtaa tgtgtttatc ctggctcata gtccgtcacc gaaaatagaa aatgccatcc 3844
ataggtaaaa tgctgaccta tagaaaaaaa tgaactctac ttttatagcc tagtaaaaaat 3904
gctctacctg agtagttaaa agcaattcat gaagcctgaa gctaaaagagc actctgatgg 3964
ttttggcata atagctgcat ttccagacct gacctttggc cccaaccaca agtgctccaa 4024
gccccaccag ctgaccaaag aaagcccaag ttctccttct gtccttccca caacctcctt 4084
gctcccaaaa ctatgaaatt aatttgacca tattaacaca gctgactcct ccagtttact 4144
taaggtagaa agaagtaggt tacaacagat gaaaataagt gctttgggag aactgtattc 4204
cttttaacag atccaaacta ttttacattt aaaaaaaaag ttaaactaaa cttctttact 4264
gctgatatgt ttctgtatt ctagaaaaat ttttacactt tcacattatt tttgtacact 4324
ttcccatgt taagggatga tggcttttat aaatgtgtat tcattaaatg ttactttaaa 4384
aataaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 4419

```

<210> 10

<211> 458

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

```

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

```

Cys	Arg	Lys	Gln	Leu	Gly	Leu	Val	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	Leu	His
Val	290	Tyr	Thr	Leu	Val	295	Pro	Ile	Arg	Tyr	300	Val	Arg	Trp	Arg
305	Leu	Gly	Asn	Leu	Thr	310	Gln	Ala	Ile	Leu	315	Lys	Lys	Glu	Asn
Leu	Gly	Asn	Leu	Thr	Val	325	Thr	Gln	Ala	Ile	330	Lys	Lys	Glu	Asn
Phe	Ser	Thr	Ser	Ser	Ala	Trp	Leu	Ser	Asp	Ser	Tyr	Val	Ala	Leu	Gly
Ile	Leu	Gly	Phe	Phe	Leu	Phe	Val	Leu	Leu	Gly	Ile	Thr	Ser	Leu	Pro
Ser	Val	Ser	Asn	Ala	Val	Asn	Trp	Arg	Glu	Phe	Arg	Phe	Val	Gln	Ser
Lys	Leu	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Ile	Leu	Cys	Thr	Ala	His	Thr	Leu	Val
385	Tyr	Gly	Gly	Lys	Arg	390	Phe	Leu	Ser	Pro	Ser	Asn	Leu	Arg	Trp
Tyr	Gly	Gly	Lys	Arg	Phe	Leu	Ser	Pro	Ser	410	Asn	Leu	Arg	Trp	Tyr
Pro	Ala	Ala	Tyr	Val	Leu	Gly	Leu	Ile	Pro	Cys	Thr	Ser	Ser	Leu	Leu
Ser	Ser	Cys	His	Val	Thr	Thr	Pro	Leu	Gln	Gly	Ser	Ala	Arg	Ala	Gly
Lys	Gly	Thr	Gln	Asn	Thr	Arg	Lys	Ser	Ile						

```
<210> 11
<211> 322
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 11
gggcgacttt tcccttatcc ctttgtcaga gatctgattc atccatatgc tagaaaccaa 60
cagagtgcatt tttacaaaat tcctatagag attgtgaaat aaacctacc tatagttgcc 120
attacttttgc tcctccctagt atacccttgc ggtcttctgg cagctgctta tcaactttat 180
tacggcacca agtataggag atttccacct tgggtggaaa cctggttaca gtgtagaaaa 240
cagcttggat tactaagttg ttctctcgct atgggtccatg ttgcctacag cctctgctta 300
ccgatgagaa ggtcagagag att
322
```

```
<210> 12
<211> 183
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 12
    ttgacagctt tgcagataacc cagactgagc tggaaactgga atttgtcttc ctattgactc      60
    tacttcttta aaagcggctg ccctattacat tcttcagctg tccttgagct taggtgtaca      120
    tgtgactgag tgttggccag tgagatgaag tctcctcaaa ggaaggcagc atgtgtcctt      180
    ttt
```

```
<210> 13
<211> 448
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

```
<400> 13
aagaaggaga atccatttag cacctcctca gcctggctca gtgattcata tgtggctttg      60
ggaataacttg ggttttttct gtttgtactc ttgggaatca cttctttgcc atctggttagc      120
aatcgagctga actggagaga gttccgattt gtccagctca aactcgggta tttgaccttat      180
atcttggtgta cagcccaaac cctgggtgac ggtgggaaga gattcctcag cctttcaaat      240
ctcagatgggt atcttctctgc agcctacgtg ttaggggctta tcattccttg cactgtgctg      300
gtgatcaagt ttgtcctaata catgccatgt gtagacaaca cccttacaag gatccgccag      360
ggctgggaaa ggaactcaaa acactagaaa aagcattgaa tggaaaatca atattaaaa      420
caaaqttcaa tttatctgga aaaaaaaaaa                                     440
```

```
<210> 14
<211> 401
<212> ADN
<213> Homo sapiens
```

<220>

<221> misc_feature

<222> 11, 56, 233, 250, 310, 326, 377, 398

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

<400> 14

```

ggccgaggca nccgctacga cctgggtcaac ctggcagtcagc agcagggtctt ggccanacaa      60
gagccacctc tgggtgaagg aggaggtctg gcggatggag atctacctct ccctgggagt      120
gctggccctc ggacggtgt ccctgctggc cgtgacctca ctgccgtcca ttgcaaaactc      180
gctcaactgg agggagtcca gcttcgttca gtcctcactg ggctttgtgg ccntcgtgct      240
gagcacactn cacacgctca cctacggctg gaccgcgccc ttcgaggaga gccgctacaa      300
gttctacctn cctcccacct tcacgntcac gctgctgggtg ccctgcgttc gttcatcctg      360
ggccaaagcc ctgtttntac tgccttgcac tcagccgnag a      401

```

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Xaa = Qualquer aminoácido

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 16

ttaggacaac ttgatcacca gca 23

<210> 17

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 17

tgtccagtcc aaactgggtt attt 24

<210> 18

<211> 23

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 18

agggagttca gcttcgttca gtc 23

<210> 19

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 19

ggtagaactt gtagcggctc tcct 24

<210> 20

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 20

gactgagctg gaactggaat ttgt 24

<210> 21

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 21

tttgaggaga cttcatctca ctgg 24

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Trp	Lys	Met	Lys	Pro	Arg	Arg	Asn	Leu	Glu	Glu	Asp	Asp	Tyr	Leu
1				5					10					15

<210> 23

<211> 14

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 23

ttttgatcaa gctt 14

<210> 24
<211> 42
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 24
ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc ag 42

<210> 25
<211> 12
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 25
ggcccgtcct ag 12

<210> 26
<211> 40
<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 26
gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcggccgag 40

<210> 27
<211> 10
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 27
cggctcctag 10

<210> 28
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>
<223> iniciador

<400> 28
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 29
<211> 22
<212> ADN
<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 29

tcgagcggcc gcccgggcag ga 22

<210> 30

<211> 20

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 30

agcgtggtcg cggccgagga 20

<210> 31

<211> 25

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 31

atatcgccgc gctcgtcgtc gacaa 25

<210> 32

<211> 26

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> iniciador

<400> 32

agccacacgc agtcattgt agaagg 26

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> iniciador

<400> 33

Tyr	Gln	Gln	Val	Gln	Gln	Asn	Lys	Glu	Asp	Ala	Trp	Ile	Glu	His
1				5					10				15	

<210> 34

<211> 24

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> sequência FLAG

<400> 34

gattacaagg atgacgacga taag 24

<210> 35
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 35
acaagagcca cctctgggtg aa 22

<210> 36
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> iniciador

<400> 36
agttgagcga gtttgcaatg gac 23

<210> 37
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> local de clivagem para IgA-protease

<400> 37
cctcgacctc caacaccggg g 21

<210> 38
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 38
Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr
1 5 10 15
Lys Ile Pro Ile Leu Val
20

<210> 39
 <211> 34
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 39
Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val
1 5 10 15
Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met
20 25 30
Glu Ile

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 40

Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro Pro Thr Phe
 1 5 10 15

<210> 41

<211> 26

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 41

Tyr Ser Phe Val Arg Asp Val Ile His Pro Tyr Ala Arg Asn Gln Gln
 1 5 10 15
 Ser Asp Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Glu Ile
 20 25

<210> 42

<211> 33

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 42

Arg Arg Ser Glu Arg Tyr Leu Phe Leu Asn Met Ala Tyr Gln Gln Val
 1 5 10 15
 His Ala Asn Ile Glu Asn Ser Trp Asn Glu Glu Glu Val Trp Arg Ile
 20 25 30
 Glu

<210> 43

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 43

Lys Arg Ala Phe Glu Glu Tyr Tyr Arg Phe Tyr
 1 5 10

<210> 44

<211> 24

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 44

Tyr Pro Tyr Val Tyr Glu Lys Lys Asp Asn Thr Phe Arg Met Ala Ile
 1 5 10 15
 Ser Ile Pro Asn Arg Ile Phe Pro
 20

<210> 45

<211> 34

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 45

Tyr Tyr Val Arg Trp Arg Leu Gly Asn Leu Thr Val Thr Gln Ala Ile
 1 5 10 15
 Leu Lys Lys Glu Asn Pro Phe Ser Thr Ser Ser Ala Trp Leu Ser Asp
 20 25 30
 Ser Tyr

<210> 46

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 46

Ala	Leu	Gln	Leu	Gly	Pro	Lys	Asp	Ala	Ser	Arg	Gln	Val
1				5					10			

<210> 47

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 47

Ile	Glu	Asn	Ser	Trp	Asn	Glu	Glu	Glu	Val	Trp	Arg	Ile	Glu
1				5					10				

Lisboa, 2010-04-27

REIVINDICAÇÕES

1. Polipéptido compreendendo uma sequência de aminoácidos possuindo pelo menos 90% de identidade com a sequência de aminoácidos de comprimento completo apresentada na Fig. 9A-D.

2. Polipéptido da reivindicação 1 compreendendo a sequência de aminoácidos de STEAP-2 apresentada na Fig. 9A-D.

3. Polipéptido de STEAP-2 compreendendo

- (a) os resíduos de aminoácido 1 a 205 apresentados na Fig. 9A-D ou
- (b) os resíduos de aminoácido 229 a 254 apresentados na Fig. 9A-D ou
- (c) os resíduos de aminoácido 278 a 303 apresentados na Fig. 9A-D.

4. Polinucleótido isolado selecionado do grupo que consiste em:

- (a) um polinucleótido que codifica um polipéptido de qualquer uma das reivindicações 1 a 3;
- (b) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos desde a posição 355 até, e incluindo, a posição 1719 apresentada na Fig. 9A-D;
- (c) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos desde a posição 355 até, e incluindo, a posição 970 apresentada na Fig. 9A-D;
- (d) um polinucleótido compreendendo a sequência de nucleótidos desde a posição 1039 até, e incluindo, a posição 1115 apresentada na Fig. 9A-D;
- (e) o ADNc contido no plasmídeo 98P4B6-GTD3 como depositado na American Culture Collection com o número de acesso PTA-311; em que T pode também ser U; e
- (f) um polinucleótido que é completamente complementar a um polinucleótido de 4(a)-4(e).

5. Polinucleótido da reivindicação 4 marcado com um marcador detectável.

6. Vector de expressão recombinante que contém um polinucleótido da reivindicação 4.

7. Células hospedeira que contém o vector de expressão da reivindicação 6.

8. Processo para a produção de um polipéptido de STEAP-2 compreendendo a cultura de uma célula hospedeira da reivindicação 7 sob condições suficientes para a produção do polipéptido e a recuperação do polipéptido de STEAP-2.

9. Anticorpo ou seu fragmento, que se liga especificamente a um epítipo no interior dos aminoácidos 1-205, 229-254, 278-303, 100-108, 227-235 ou 306-314, da sequência de aminoácidos apresentada na Fig. 9A-D.

10. Anticorpo ou seu fragmento da reivindicação 9 que é monoclonal.

11. Proteína recombinante compreendendo a região de ligação ao antigénio de uma anticorpo monoclonal ou fragmento de anticorpo da reivindicação 10.

12. Anticorpo ou seu fragmento da reivindicação 9 ou da reivindicação 10, ou proteína recombinante da reivindicação 11, que estão marcados com um marcador detectável.

13. Anticorpo ou seu fragmento ou proteína recombinante da reivindicação 12, em que o marcador detectável compreende um radioisótopo, um quelante de metais, uma enzima ou um composto fluorescente, bioluminescente ou quimioluminescente.

14. Anticorpo ou seu fragmento ou proteína recombinante de qualquer uma das reivindicações 9-13 que é um anticorpo humano.

15. Anticorpo ou seu fragmento de qualquer uma das reivindicações 9-10 e 12-13, que compreende resíduos da região de ligação ao antigénio de murino e resíduos de anticorpo humano.

16. Ratinho transgénico que produz um anticorpo ou um fragmento de anticorpo de qualquer uma das reivindicações 9-10 ou 14-15.

17. Hibridoma que produz um anticorpo monoclonal de qualquer uma das reivindicações 10 ou 14-15.

18. Anticorpo monoclonal ou seu fragmento da reivindicação 10 que está conjugado com uma toxina, um radioisótopo ou um agente terapêutico.

19. Ensaio para detecção da presença de um polipéptido de STEAP-2 numa amostra compreendendo o contacto da amostra com um anticorpo, fragmento ou proteína recombinante de qualquer uma das reivindicações 9-12, e detecção da sua ligação ao polipéptido de STEAP-2 na amostra.

20. Ensaio para detecção da presença de um polinucleótido de STEAP-2 numa amostra compreendendo:

- (a) o contacto da amostra com uma sonda polinucleotídica que hibrida especificamente com um polinucleótido da reivindicação 4; e
- (b) a detecção da presença de um complexo de hibridação formado pela hibridação da sonda com polinucleótido de STEAP-2 na amostra, em que a presença do complexo de hibridação indica a presença de polinucleótido de STEAP-2 no interior da amostra.

21. Ensaio para detecção da presença de um polinucleótido de ARNm de STEAP-2 numa amostra biológica compreendendo:

- (a) a produção de ADNc a partir da amostra por transcrição inversa utilizando pelo menos um iniciador;
 - (b) a amplificação do ADNc assim produzido utilizando polinucleótidos de STEAP-2 como iniciadores de sentido directo e anti-sentido para amplificar ADNc de STEAP-2;
 - (c) a detecção da presença do ADNc de STEAP-2 amplificado,
- em que os polinucleótidos de STEAP-2 utilizados como iniciadores de sentido directo e anti-sentido são capazes de amplificar o polinucleótido da reivindicação 4.

22. Composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou um seu fragmento ou proteína recombinante de acordo com qualquer das reivindicações 9-15 ou reivindicação 18, um polipéptido de STEAP-2 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, ou um polinucleótido de STEAP-2 de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 ou 5, e um transportador fisiologicamente aceitável.

23. Composição de vacina compreendendo um polipéptido de STEAP-2 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, ou um polinucleótido de STEAP-2 de acordo com a reivindicação 4 e um transportador fisiologicamente aceitável.

24. Utilização de um vector que codifica um anticorpo monoclonal de cadeia simples que compreende os domínios variáveis das cadeias pesada e leve de um anticorpo monoclonal que se liga especificamente a um polipéptido de STEAP-2 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-3, na preparação de um medicamento para o tratamento de um cancro que expressa STEAP-2, tal que o vector entregue o anticorpo monoclonal de cadeia simples que codifica a sequência às células cancerosas e o anticorpo de cadeia simples codificado seja nelas expresso intracelularmente.

25. Anticorpo ou fragmento como reivindicados em qualquer uma das reivindicações 9, 10, 12-15 e 18 para utilização num método de tratamento de um cancro que expressa STEAP-2.

26. Utilização de um anticorpo ou fragmento como reivindicados em qualquer uma das reivindicações 9, 10, 12-15 e 18 no fabrico de um medicamento para um método de tratamento de um cancro que expressa STEAP-2.

Lisboa, 2010-04-27

FIG. 1A

```

5'   11      20      29      38      47      56
    GAG ACT CAC GGT CAA GCT AAG GCG AAG AGT GGG TGG CTG AAG CCA TAC TAT TTT
    ---

      65      74      83      92      101      110
    ATA GAA TTA ATG GAA AGC AGA AAA GAC ATC ACA AAC CAA GAA GAA CTT TGG AAA
    ---
              M   E   S   R   K   D   I   T   N   Q   E   E   L   W   K

      119      128      137      146      155      164
    ATG AAG CCT AGG AGA AAT TTA GAA GAA GAC GAT TAT TTG CAT AAG GAC ACG GGA
    ---
    M   K   P   R   R   N   L   E   E   D   D   Y   L   H   K   D   T   G

      173      182      191      200      209      218
    GAG ACC AGC ATG CTA AAA AGA CCT GTG CTT TTG CAT TTG CAC CAA ACA GCC CAT
    ---
    E   T   S   M   L   K   R   P   V   L   L   H   L   H   Q   T   A   K

      227      236      245      254      263      272
    GCT GAT GAA TTT GAC TGC CCT TCA GAA CTT CAG CAC ACA CAG GAA CTC TTT CCA
    ---
    A   D   E   F   D   C   P   S   E   L   Q   H   T   Q   E   L   F   P

      281      290      299      308      317      326
    CAG TGG CAC TTG CCA ATT AAA ATA GCT GCT ATT ATA GCA TCT CTG ACT TTT CTT
    ---
    Q   W   H   L   P   I   K   I   A   A   I   I   A   S   L   T   F   L

      335      344      353      362      371      380
    TAC ACT CTT CTG AGG GAA GTA ATT CAC CCT TTA GCA ACT TCC CAT CAA CAA TAT
    ---
    Y   T   L   L   R   E   V   I   H   P   L   A   T   S   H   Q   Q   Y

      389      398      407      416      425      434
    TTT TAT AAA ATT CCA ATC CTG GTC ATC AAC AAA GTC TTG CCA ATG GTT TCC ATC
    ---
    F   Y   K   I   P   I   L   V   I   N   K   V   L   P   M   V   S   I

      443      452      461      470      479      488
    ACT CTC TTG GCA TTG GTT TAC CTG CCA GGT GTG ATA GCA GCA ATT GTC CAA CTT
    ---
    T   L   L   A   L   V   Y   L   P   G   V   I   A   A   I   V   Q   L

      497      506      515      524      533      542
    CAT AAT GGA ACC AAG TAT AAG AAG TTT CCA CAT TGG TTG GAT AAG TGG ATG TTA
    ---
    H   N   G   T   K   Y   K   K   F   P   H   W   L   D   K   W   M   L

      551      560      569      578      587      596
    ACA AGA AAG CAG TTT GGG CTT CTC AGT TTC TTT TTT GCT GTA CTG CAT GCA ATT
    ---
    T   R   K   Q   F   G   L   L   S   F   F   F   A   V   L   H   A   I

```

FIG. 1B

605	614	623	632	641	650
TAT AGT CTG TCT TAC CCA ATG AGG CGA TCC TAC AGA TAC AAG TTG CTA AAC TGG					
Y S L S Y P M R R S Y R Y K L L N W					
659	668	677	686	695	704
GCA TAT CAA CAG GTC CAA CAA AAT AAA GAA GAT GCC TGG ATT GAG CAT GAT GTT					
A Y Q Q V Q Q N K E D A W I E H D V					
713	722	731	740	749	758
TGG AGA ATG GAG ATT TAT GTG TCT CTG GGA ATT GTG GGA TTG GCA ATA CTG GCT					
W R M E I Y V S L G I V G L A I L A					
767	776	785	794	803	812
CTG TTG GCT GTG ACA TCT ATT CCA TCT GTG AGT GAC TCT TTG ACA TGG AGA GAA					
L L A V T S I P S V S D S L T W R E					
821	830	839	848	857	866
TTT CAC TAT ATT CAG AGC AAG CTA GGA ATT GTT TCC CTT CTA CTG GGC ACA ATA					
F H Y I Q S K L G I V S L L L G T I					
875	884	893	902	911	920
CAC GCA TTG ATT TTT GCC TGG AAT AAG TGG ATA GAT ATA AAA CAA TTT GTA TGG					
H A L I F A W N K W I D I K Q F V W					
929	938	947	956	965	974
TAT ACA CCT CCA ACT TTT ATG ATA GCT GTT TTC CTT CCA ATT GTT GTC CTG ATA					
Y T P P T F M I A V F L P I V V L I					
983	992	1001	1010	1019	1028
TTT AAA AGC ATA CTA TTC CTG CCA TGC TTG AGG AAG AAG ATA CTG AAG ATT AGA					
F K S I L F L P C L R K K I L K I R					
1037	1046	1055	1064	1073	1082
CAT GGT TGG GAA GAC GTC ACC AAA ATT AAC AAA ACT GAG ATA TGT TCC CAG TTG					
H G W E D V T K I N K T E I C S Q L					
1091	1100	1109	1118	1127	1136
TAG AAT TAC TGT TTA CAC ACA TTT TTG TTC AAT ATT GAT ATA TTT TAT CAC CAA					
* N Y C L H T F L F N I D I F Y H Q					
1145	1154	1163	1172	1181	1190
CAT TTC AAG TTT GTA TTT GTT AAT AAA ATG ATT ATT CAA GGA AAA AAA AAA AAA					
H F K F V F V N K M I I Q G K K K K					

AAA AA 3'

K

FIG. 1C

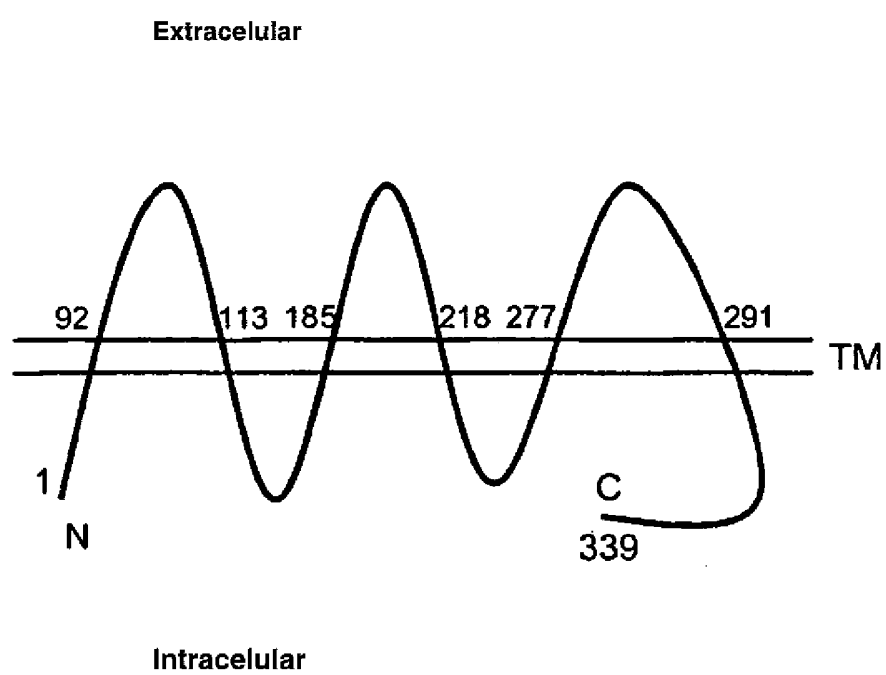


FIG. 1D

5' GGC GGA GGC GGA GGC GGA GGG CGA GGG GCG GGG AGC GCC GCC TGG AGC GCG
GCA GGT CAT ATT GAA CAT TCC AGA TAC CTA TCA TTA CTC GAT GCT GTT GAT
AAC AGC AAG 3'

FIG. 2A

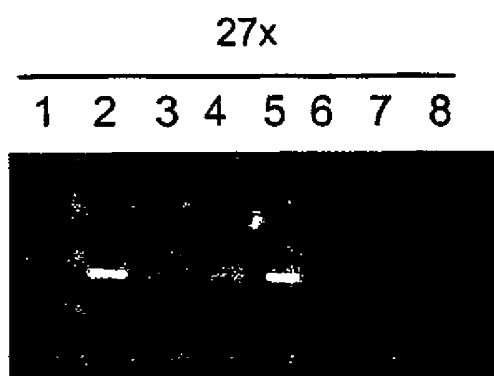
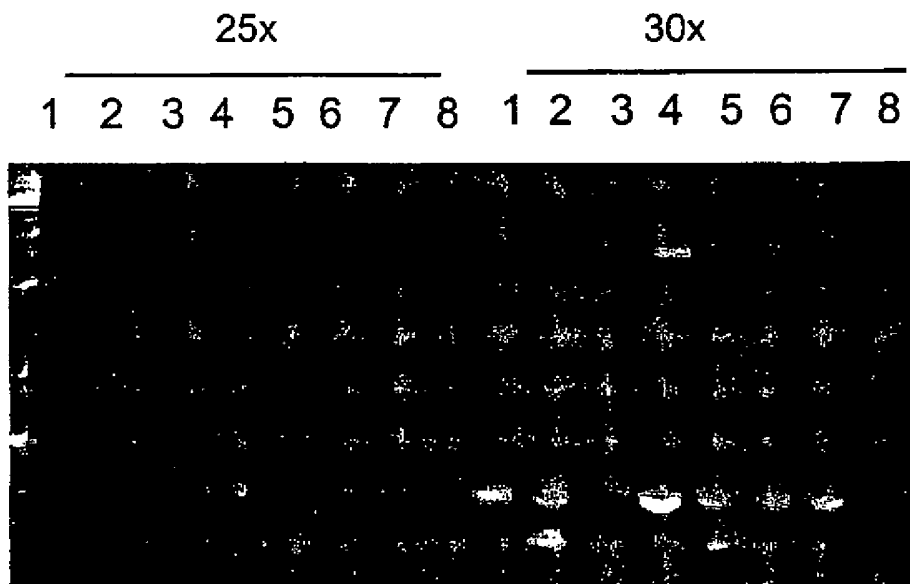


FIG. 2B

FIG. 2C



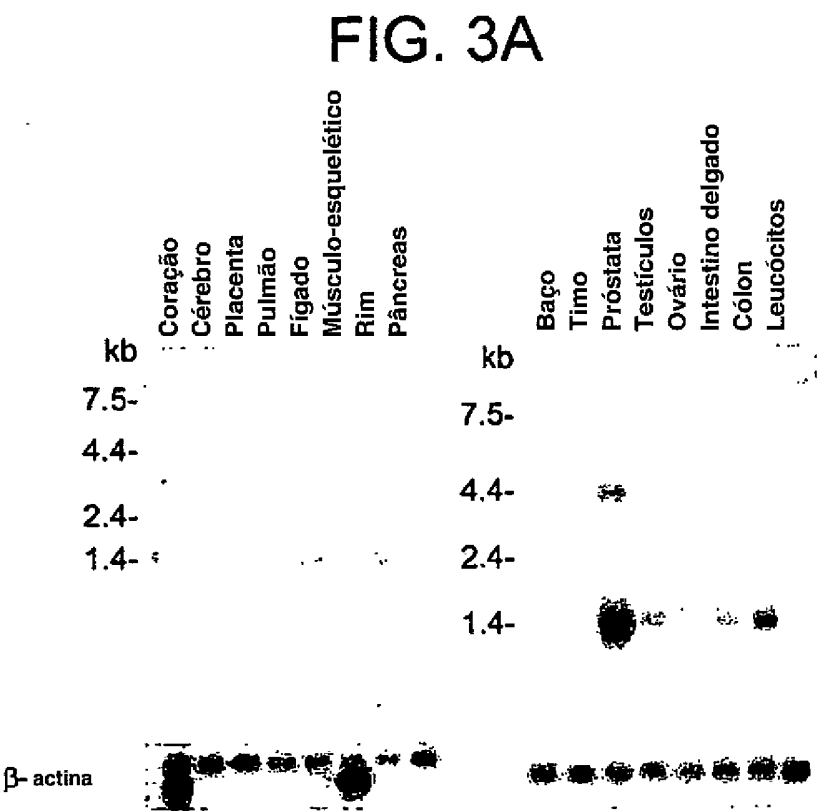
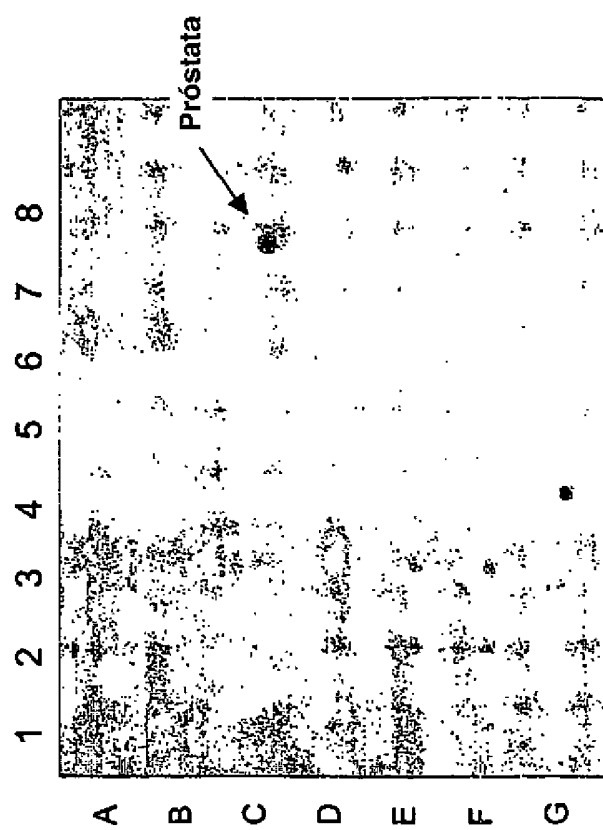


FIG. 3B



GGGGCCCGCACCTCTGGGCAGCAGCGGCAGCCGAGACTCACGGTCAAGCTAAGGCGAAGACTGGGTGGCTGAAGCG
ATACTATTTTATAGAATTAATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAAACCAAGAAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTAGG
AGAAATTTAGAAAGAAGACGATTATTTGCATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTTGC
ATTTGCACCAAACAGCCCATGCTGATGAATTTGACTGCCCTTCAGAACTTCAGCACACACAGGAACTCTTTCCACA
GTGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTACACTCTTCTGAGGGGAAGTAATT
CACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTTATAAAATTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGG
TTTCCATCACTCTCTTGGCATTGGTTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACCAA
GTATAAGAAGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTTTCTTTTTT
GCTGTACTGCATGCAATTTATAGTCTGTCTTACCCAATGAGGGCATCCTACAGATACAAGTTGCTAAACTGGGCAT
ATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGATTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAGATTTATGTGTCTCT
GGGAATTTGGGATTGGCAATACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGG
AGAGAATTTCACTATATTCAGGTAAATAATATATAAAATAACCCTAAGAGGTAAATCTTCTTTTTGTGTTTATGAT
ATAGAATATGTTGACTTTACCCCATAAAAAATAACAAATGTTTTTCAACAGCAAAGATCTTATACTTGTTCCAATT
AATAATGTGCTCTCCTGTTGTTTTCCCTATTGCTTCTAATTAGGACAAGTGTTCCTAGACATAAATAAAAGGCAT
TAAATATTTCTTTGTTTTTTTTTTTTTGTGTTGTTGTTGTTTTGTTGTTGTTGTTTTTTGAGATGAAGTCTCG
CTCTGTTGCCCATGCTGGAGTACAGTGGCACGATCTCGGCTCACTGCAACCTGCGCCTCCTGGGTTACAGGCGATT
TCTTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGGATTACAGGCACCCATCACCATGTCCAGCTAATTTTTGTATTTTATGTA
GAGACAGGGTTTTCCCATGTTGGCCAGGCTGGTCTCGATCTCCTGACCTCAAATGATCCGCCCACCTCGGCCTCCC
AAAGTGCTGGGATGACAGTTGTGAGCCACCACACTCAGCCTGCTCTTTCTAATATTTGAAACTTGTTAGACAATTT
GCTACCCATCTAATGTGATATTTTAGGAATCCAATATGCATGGTTATTATTTCTTAAAAAAAATATTTCTTTTACC
TGTCACTGAATTTAGTAATGCCTTTTATGTTACACAACTTAGCACTTTCAGAAACAAAAAATCTCTCCTTGAAA
TAATAGAGTTTTTATCTACCAAAGATATGCTAGTGTCTCATTTCAAAGGCTGCTTTTTCCAGCTTACATTTTATAT
ACTTACTCACTTGAAGTTTCTAAATATTTCTGTAATTTTAAACTATCTCAGATTTACTGAGGTTTATCTTCTGGT
GGTAGATTATCCATAAGAAGAGTGATGTGCCAGAATCACTCTGGGATCCTGTGTGACAAGATTCAAAGGACTAAA
TTTAATTCACTCATGAACACTGCCAATTACCGTTTTATGGGTAGACATCTTTGGAAATTTCCACAAGGTCAGACATT
CGCAACTATCCCTTCTACATGTCCACACGTATACTCCAACACTTTATTAGGCATCTGATTAGTTTGGAAAGTATGC

FIG. 4B

CTCCATCTGAATTAGTCCAGTGTGGCTTAGAGTTGGTACAACATTCTCACAGAATTCCTAATTTTGTAGGTTTCAG
CCTGATAACCACTGGAGTTCTTTGGTCCTCATTAAATAGCTTTCTTCACACATTGCTCTGCCTGTTACACATATGA
TGAACACTGCTTTTTAGACTTCATTAGGAATTTAGGACTGCATCTTGACAAGTGGAGCCTATTCTACTATATGTACA
ATACCTAGCCCATAAATAGGTATACAATACACATTTGGTAAAATAATTTTCAACCAATGACATGTATTTTCAACT
AGTAACCTAGAAATGTTTCACTTAAAATCTGAGAACTGGTTACTACTACAAGTTACCTTGGAGATTCATATATGAAA
ACGCAAACTTAGCTATTTGATTGTATTCACTGGGACTTAAGAATGCGCCTGAATAATTGTGAGTTCGATTTGTTCT
GGCAGGCTAATGACCATTTCCAGTAAAGTGAATAGAGGTGAGAAGTCGTATAAAAGAGGTGTTGTCAGAACACCGT
TGAGATTACATAGGTGAACAACATTTTTTAAGCAACTTTATTTGTGTAGTGACAAAGCATCCCAATGCAGGCTGAA
ATGTTTCATCACATCTCTGGATCTCTCTATTTTGTGCAGACATTGAAAAAATTGTTTCATATTATTTCCATGTTATC
AGAATATTTGATTTTTTAAAAACATAGGCCAAGTTCATTCACCTCATTATTCATTTATCAAATCAGAGTGAATCA
CATTAGTCGCCTTCACAACTGATAAAGATCACTGAAGTCAAATTGATTTTTTGCTATAATCTTCAATCTACCTATAT
TTAATTGAGAATCTAAAATGTACAAATCATTGTGTGATTCTGCAGTGATCCTGCTATAAGTAAGACTCAGTCCCT
GATTTTAGGTATCCTGTGAAAAGCAGAATTAAGACAAATACACAAGAGACAAAGCACAAAAATAAATATCATAAG
GGGATGAACAAAATGGTGGAGAAAGAGTAGACAAAGTTTTTGATCACCTGCCTTCAAAGAAAGGCTGTGAATTTTG
TTCACCTAGACAGCTTGGAGACAAGAAATTACCCAAAAGTAAGGTGAGGAGGATAGGCAAAAAGAGCAGAAAGATG
TGAATGGACATTGTTGAGAAATGTGATAGGAAAAAATCATAGATAAAGGATTTCCAAGCAACAGAGCATATCCAG
ATGAGGTAGGATGGGATAAACTCTTATTGAACCAATCTTCACCAATTTTGTTTTTCTTTTGAGAGCAAGCTAGGA
ATTGTTTCCCTTCTACTGGGCACAATACCGCATTGATTTTTGCCTGGAATAAGTGGATAGATATAAAACAATTTG
TATGGTATACACCTCCAACCTTTATGATAGCTGTTTTCTTCCAATTGTTGTCCTGATATTTAAAGCATACTATT
CCTGCCATGCTTGAGGAAGAAGATACTGAAGATTAGACATGGTTGGGAAGACGTCACCAAAATTAACAAAACCTGAG
ATATGTTCCCAAGTTGAGAAATTACTGTTTACACACATTTTGTTCATATTGATATATTTTATCACCAACATTTCA
AGTTTGTATTTGTTAATAAAATGATTATTCAAGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIG. 5A

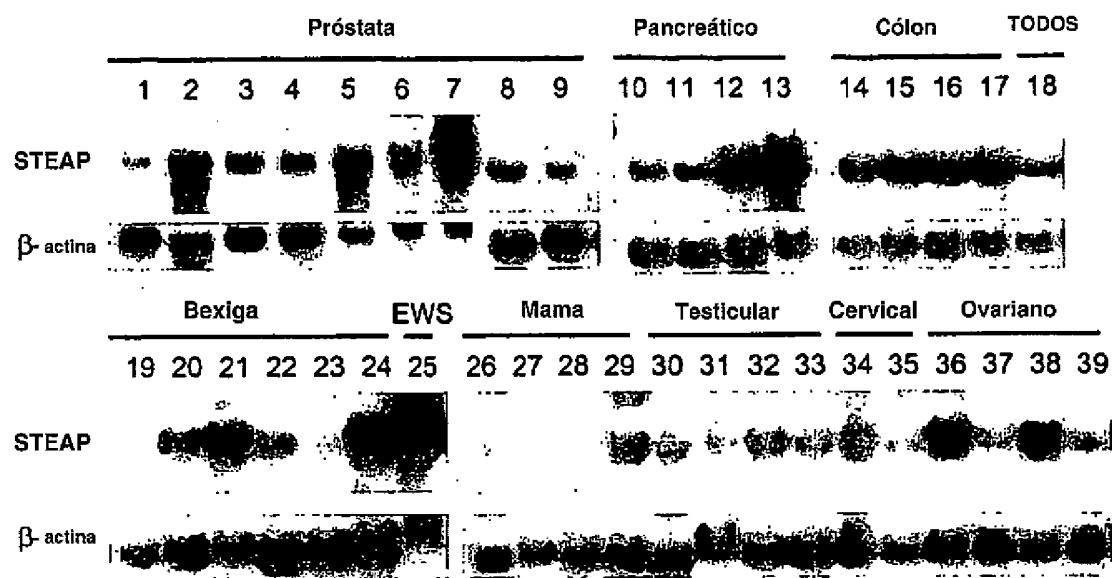


FIG. 5B

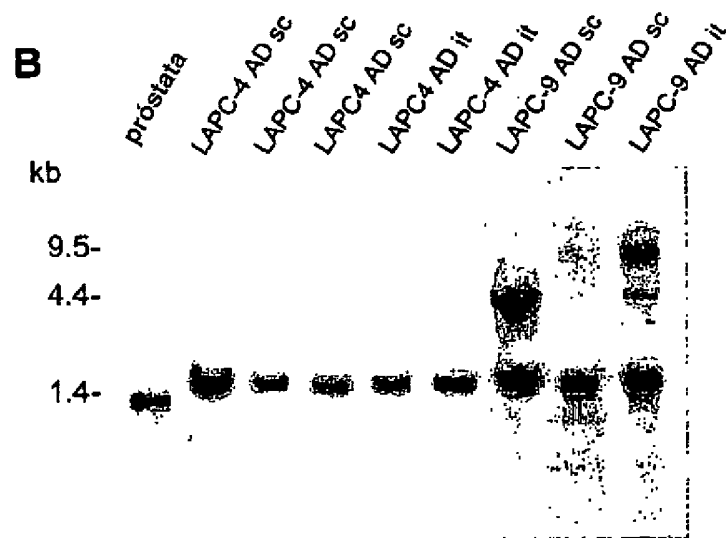


FIG. 6A

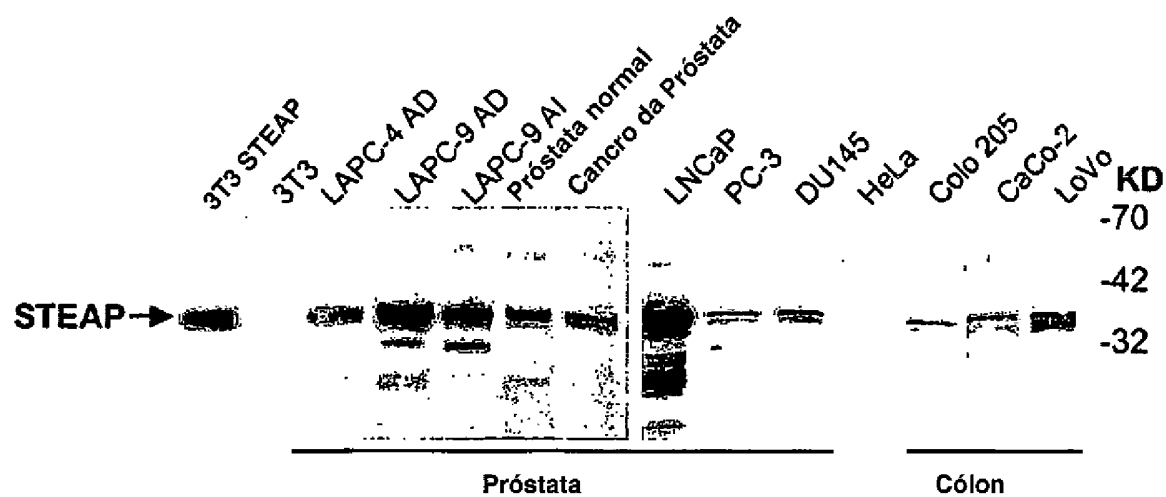


FIG. 6B

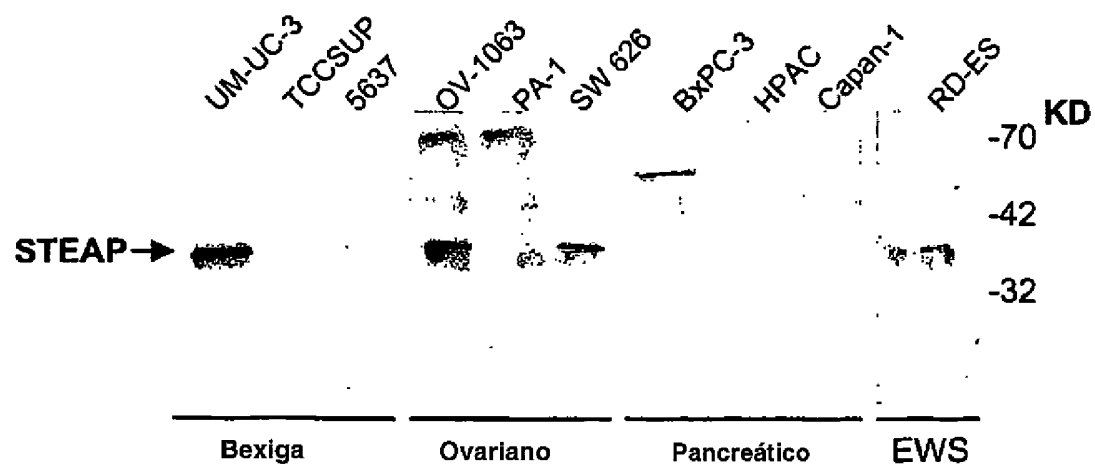


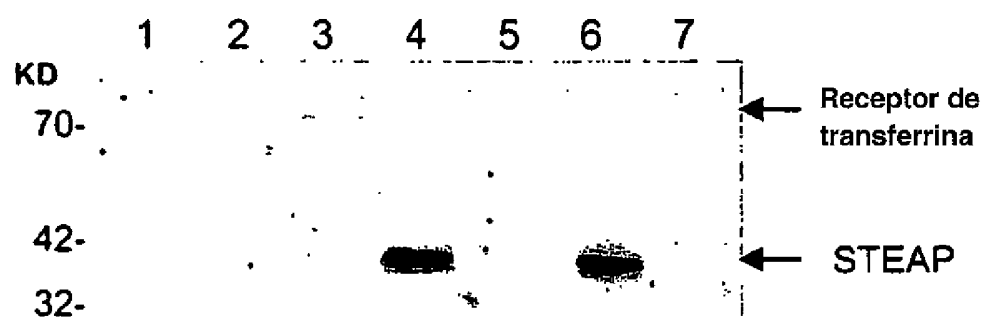
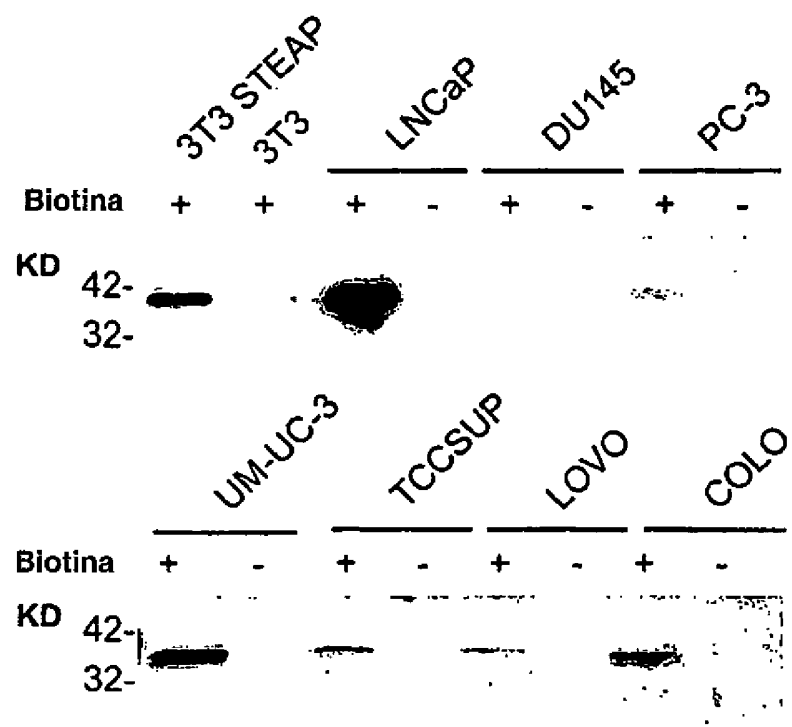
FIG. 7A**FIG. 7B**

FIG. 8A

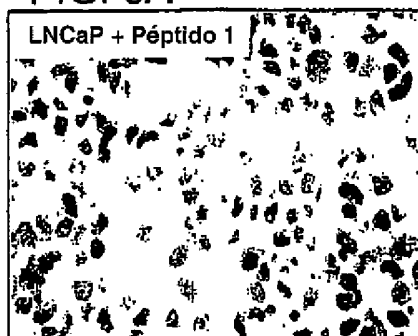


FIG. 8B

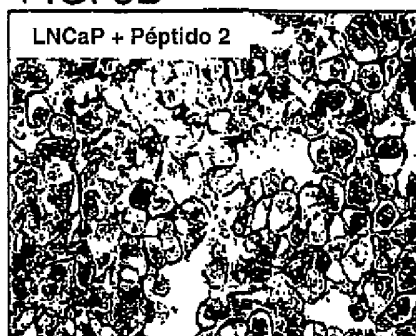


FIG. 8C

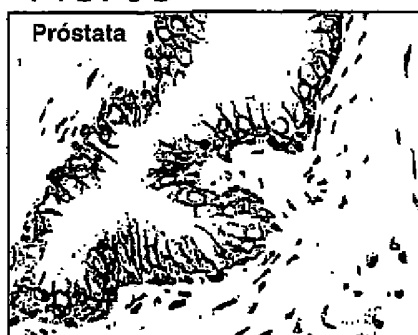


FIG. 8D

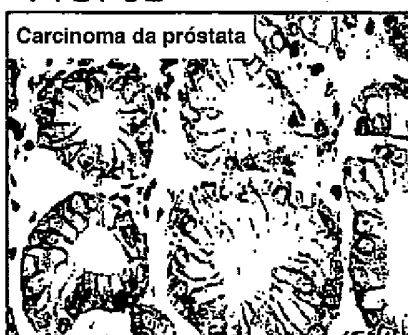


FIG. 8E



FIG. 8F

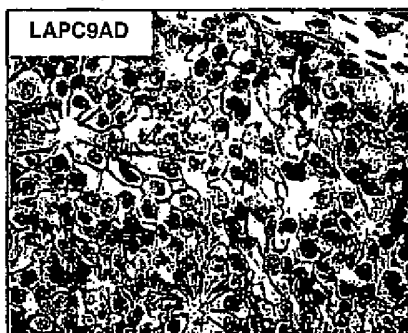


FIG. 8G

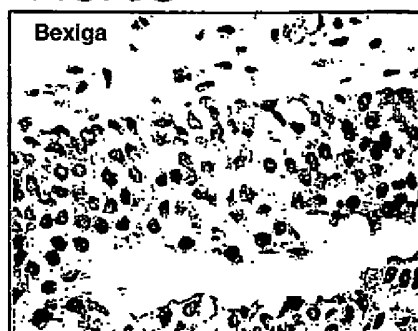


FIG. 8H

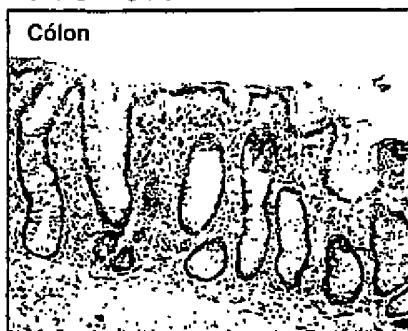


FIG. 9A

```

      10      19      28      37      46      55
5'  GGA CGC GTG GGC GGA CGC GTG GGT TCC TCG GGC CCT CGG CGC CAC AAG CTG TCC
    ---
      64      73      82      91     100     109
    GGG CAC GCA GCC CCT AGC GGC GCG TCG CTG CCA AGC CGG CCT CCG CGC GCC TCC
    ---
     118     127     136     145     154     163
    CTC CTT CCT TCT CCC CTG GCT GTT CGC GAT CCA GCT TGG GTA GGC GGG GAA GCA
    ---
     172     181     190     199     208     217
    GCT GGA GTG CGA CCG CCA CGG CAG CCA CCC TGC AAC CGC CAG TCG GAG GTG CAG
    ---
     226     235     244     253     262     271
    TCC GTA GGC CCT GGC CCC CGG GTG GGC CCT TGG GGA GTC GGC GCC GCT CCC GAG
    ---
     280     289     298     307     316     325
    GAG CTG CAA GGC TCG CCC CTG CCC GGC GTG GAG GGC GCG GGG GGC GCG GAG GAT
    ---
     334     343     352     361     370     379
    ATT CTT GGT GAT CTT GGA AGT GTC CGT ATC ATG GAA TCA ATC TCT ATG ATG GGA
    ---
                                M  E  S  I  S  M  M  G

      388     397     406     415     424     433
    AGC CCT AAG AGC CTT AGT GAA ACT TGT TTA CCT AAT GGC ATA AAT GGT ATC AAA
    ---
      S  P  K  S  L  S  E  T  C  L  P  N  G  I  N  G  I  K

      442     451     460     469     478     487
    GAT GCA AGG AAG GTC ACT GTA GGT GTG ATT GGA AGT GGA GAT TTT GCC AAA TCC
    ---
      D  A  R  K  V  T  V  G  V  I  G  S  G  D  F  A  K  S

      496     505     514     523     532     541
    TTG ACC ATT CGA CTT ATT AGA TGC GGC TAT CAT GTG GTC ATA GGA AGT AGA AAT
    ---
      L  T  I  R  L  I  R  C  G  Y  H  V  V  I  G  S  R  N

      550     559     568     577     586     595
    CCT AAG TTT GCT TCT GAA TTT TTT CCT CAT GTG GTA GAT GTC ACT CAT CAT GAA
    ---
      P  K  F  A  S  E  F  F  P  H  V  V  D  V  T  H  H  E

      604     613     622     631     640     649
    GAT GCT CTC ACA AAA ACA AAT ATA ATA TTT GTT GCT ATA CAC AGA GAA CAT TAT
    ---
      D  A  L  T  K  T  N  I  I  F  V  A  I  H  R  E  H  Y

      658     667     676     685     694     703
    ACC TCC CTG TGG GAC CTG AGA CAT CTG CTT GTG GGT AAA ATC CTG ATT GAT GTG
    ---
      T  S  L  W  D  L  R  H  L  L  V  G  K  I  L  I  D  V

      712     721     730     739     748     757
    AGC AAT AAC ATG AGG ATA AAC CAG TAC CCA GAA TCC AAT GCT GAA TAT TTG GCT
    ---
      S  N  N  M  R  I  N  Q  Y  P  E  S  N  A  E  Y  L  A

```

FIG. 9B

766	775	784	793	802	811
TCA TTA TTC CCA GAT TCT TTG ATT GTC AAA GGA TTT AAT GTT GTC TCA GCT TGG					

S L F P D S L I V K G F N V V S A W					
820	829	838	847	856	865
GCA CTT CAG TTA GGA CCT AAG GAT GCC AGC CGG CAG GTT TAT ATA TGC AGC AAC					

A L Q L G P K D A S R Q V Y I C S N					
874	883	892	901	910	919
AAT ATT CAA GCG CGA CAA CAG GTT ATT GAA CTT GCC CGC CAG TTG AAT TTC ATT					

N I Q A R Q Q V I E L A R Q L N F I					
928	937	946	955	964	973
CCC ATT GAC TTG GGA TCC TTA TCA TCA GCC AGA GAG ATT GAA AAT TTA CCC CTA					

P I D L G S L S S A R E I E N L P L					
982	991	1000	1009	1018	1027
CGA CTC TTT ACT CTC TGG AGA GGG CCA GTG GTG GTA GCT ATA AGC TTG GCC ACA					

R L F T L W R G P V V V A I S L A T					
1036	1045	1054	1063	1072	1081
TTT TTT TTC CTT TAT TCC TTT GTC AGA GAT GTG ATT CAT CCA TAT GCT AGA AAC					

F F F L Y S F V R D V I H P Y A R N					
1090	1099	1108	1117	1126	1135
CAA CAG AGT GAC TTT TAC AAA ATT CCT ATA GAG ATT GTG AAT AAA ACC TTA CCT					

Q Q S D F Y K I P I E I V N K T L P					
1144	1153	1162	1171	1180	1189
ATA GTT GCC ATT ACT TTG CTC TCC CTA GTA TAC CTT GCA GGT CTT CTG GCA GCT					

I V A I T L L S L V Y L A G L L A A					
1198	1207	1216	1225	1234	1243
GCT TAT CAA CTT TAT TAC GGC ACC AAG TAT AGG AGA TTT CCA CCT TGG TTG GAA					

A Y Q L Y Y G T K Y R R F P P W L E					
1252	1261	1270	1279	1288	1297
ACC TGG TTA CAG TGT AGA AAA CAG CTT GGA TTA CTA AGT TTT TTC TTC GCT ATG					

T W L Q C R K Q L G L L S F F F A M					
1306	1315	1324	1333	1342	1351
GTC CAT GTT GCC TAC AGC CTC TGC TTA CCG ATG AGA AGG TCA GAG AGA TAT TTG					

V H V A Y S L C L P M R R S E R Y L					
1360	1369	1378	1387	1396	1405
TTT CTC AAC ATG GCT TAT CAG CAG GTT CAT GCA AAT ATT GAA AAC TCT TGG AAT					

F L N M A Y Q Q V H A N I E N S W N					

FIG. 9C

1414	1423	1432	1441	1450	1459
GAG GAA GAA GTT TGG AGA ATT GAA ATG TAT ATC TCC TTT GGC ATA ATG AGC CTT					
E E E V W R I E M Y I S F G I M S L					
1468	1477	1486	1495	1504	1513
GGC TTA CTT TCC CTC CTG GCA GTC ACT TCT ATC CCT TCA GTG AGC AAT GCT TTA					
G L L S L L A V T S I P S V S N A L					
1522	1531	1540	1549	1558	1567
AAC TGG AGA GAA TTC AGT TTT ATT CAG TCT ACA CTT GGA TAT GTC GCT CTG CTC					
N W R E F S F I Q S T L G Y V A L L					
1576	1585	1594	1603	1612	1621
ATA AGT ACT TTC CAT GTT TTA ATT TAT GGA TGG AAA CGA GCT TTT GAG GAA GAG					
I S T F H V L I Y G W K R A F E E E					
1630	1639	1648	1657	1666	1675
TAC TAC AGA TTT TAT ACA CCA CCA AAC TTT GTT CTT GCT CTT GTT TTG CCC TCA					
Y Y R F Y T P P N F V L A L V L P S					
1684	1693	1702	1711	1720	1729
ATT GTA ATT CTG GAT CTT TTG CAG CTT TGC AGA TAC CCA GAC TGA GCT GGA ACT					
I V I L D L L Q L C R Y P D *					
1738	1747	1756	1765	1774	1783
GGA ATT TGT CTT CCT ATT GAC TCT ACT TCT TTA AAA GCG GCT GCC CAT TAC ATT					
1792	1801	1810	1819	1828	1837
CCT CAG CTG TCC TTG CAG TTA GGT GTA CAT GTG ACT GAG TGT TGG CCA GTG AGA					
1846	1855	1864	1873	1882	1891
TGA AGT CTC CTC AAA GGA AGG CAG CAT GTG TCC TTT TTC ATC CCT TCA TCT TGC					
1900	1909	1918	1927	1936	1945
TGC TGG GAT TGT GGA TAT AAC AGG AGC CCT GGC AGC TGT CTC CAG AGG ATC AAA					
1954	1963	1972	1981	1990	1999
GCC ACA CCC AAA GAG TAA GGC AGA TTA GAG ACC AGA AAG ACC TTG ACT ACT TCC					
2008	2017	2026	2035	2044	2053
CTA CTT CCA CTG CTT TTC CTG CAT TTA AGC CAT TGT AAA TCT GGG TGT GTT ACA					
2062	2071	2080	2089	2098	2107
TGA AGT GAA AAT TAA TTC TTT CTG CCC TTC AGT TCT TTA TCC TGA TAC CAT TTA					
2116	2125	2134	2143	2152	2161
ACA CTG TCT GAA TTA ACT AGA CTG CAA TAA TTC TTT CTT TTG AAA GCT TTT AAA					

FIG. 9D

2170	2179	2188	2197	2206	2215
GGA TAA TGT GCA ATT CAC ATT AAA ATT GAT TTT CCA TTG TCA ATT AGT TAT ACT					
---	---	---	---	---	---
2224	2233	2242	2251	2260	2269
CAT TTT CCT GCC TTG ATC TTT CAT TAG ATA TTT TGT ATC TGC TTG GAA TAT ATT					
---	---	---	---	---	---
2278	2287	2296	2305	2314	2323
ATC TTC TTT TTA ACT GTG TAA TTG GTA ATT ACT AAA ACT CTG TAA TCT CCA AAA					
---	---	---	---	---	---
2332	2341	2350	2359	2368	2377
TAT TGC TAT CAA ATT ACA CAC CAT GTT TTC TAT CAT TCT CAT AGA TCT GCC TTA					
---	---	---	---	---	---
2386	2395	2404	2413	2422	2431
TAA ACA TTT AAA TAA AAA GTA CTA TTT AAT GAT TTA AAA AAA AAA AAA AAA AAA					
---	---	---	---	---	---
2440	2449				
AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AA 3'					
---	---	---	---	---	---

FIG. 10A

```

1  CGAAACTTCC CTCTACCCGC CCGGCCCGCG GCGCGCACCG TTGGCGCTGG ACGCTTCCTC
   GCTTTGAAGG GAGATGGGCG GGCCGGGGCG CCGCGTGGC AACCGCGACC TGCGAAGGAG

           M E K T C I D A L P L T
61  CTTGGAAGCG CCTCTCCCTC AGTTATGGAG AAAACTTGTA TAGATGCACT TCCTCTTACT
   GAACCTTCGC GGAGAGGGAG TCAATACCTC TTTTGAACAT ATCTACGTGA AGGAGAATGA

           M N S S E K Q E T V C I F G T G D F G R
121 ATGAATTCTT CAGAAAAGCA AGAGACTGTA TGTATTTTGG GAACTGGTGA TTTTGGGAAGA
   TACTTAAGAA GTCTTTTCGT TCTCTGACAT ACATAAAAAC CTTGACCACT AAAACCTTCT

           S L G L K M L Q C G Y S V V F G S R N P
181 TCACTGGGAT TGAATGCT CCAGTGTGGT TATTCTGTTG TTTTGGGAAG TCGAAACCCC
   AGTGACCCTA ACTTTTACGA GGTACACCA ATAAGACAAC AAAACCTTC AGCTTTGGGG

           Q K T T L L P S G A E V L S Y S E A A K
241 CAGAAGACCA CCCTACTGCC CAGTGGTGCA GAAGTCTTGA GCTATTCAGA AGCAGCCAAG
   GTCTTCTGGT GGGATGACGG GTCACCACGT CTTCAGAACT CGATAAGTCT TCGTCGGTTC

           K S G I I I I A I H R E H Y D F L T E L
301 AAGTCTGGCA TCATAATCAT AGCAATCCAC AGAGAGCATT ATGATTTTCT CACAGAATTA
   TTCAGACCGT AGTATTAGTA TCGTTAGGTG TCTCTCGTAA TACTAAAAGA GTGTCTTAAT

           T E V L N G K I L V D I S N N L K I N Q
361 ACTGAGGTTT TCAATGGAAA AATATTGGTA GACATCAGCA ACAACCTCAA AATCAATCAA
   TGACTCCAAG AGTTACCTTT TTATAACCAT CTGTAGTCGT TGTGGAGTT TTAGTTAGTT

           Y P E S N A E Y L A H L V P G A H V V K
421 TATCCAGAAT CTAATGCAGA GTACCTTGCT CATTTGGTGC CAGGAGCCCA CGTGGTAAAA
   ATAGTGCTTA GATTACGTCT CATGGAACGA GTAAACCACG GTCCTCGGGT GCACCATTTT

           A F N T I S A W A L Q S G A L D A S R Q
481 GCATTTAACA CCATCTCAGC CTGGGCTCTC CAGTCAGGAG CACTGGATGC AAGTCGGCAG
   CGTAAATTGT GGTAGAGTCG GACCCGAGAG GTCAGTCCTC GTGACCTACG TTCAGCCGTC

           V F V C G N D S K A K Q R V M D I V R N
541 GTGTTTGTGT GTGGAATGA CAGCAAAGCC AAGCAAAGAG TGATGGATAT TGTTTCGTAAT
   CACAAACACA CACCTTTACT GTCGTTTCGG TTCGTTTCTC ACTACCTATA ACAAGCATT

           L G L T P M D Q G S L M A A K E I E K Y
601 CTTGGACTTA CTCCAATGGA TCAAGGATCA CTCATGGCAG CCAAAGAAAT TGAAAAGTAC
   GAACCTGAAT GAGGTTACCT AGTTCCTAGT GAGTACCGTC GGTTCCTTTA ACTTTTCATG

           P L Q L F P M W R F P F Y L S A V L C V
661 CCCCTGCAGC TATTTCCAAT GTGGAGGTTT CCCTTCTATT TGTCTGCTGT GCTGTGTGTC
   GGGGACGTCG ATAAAGGTTA CACCTCCAAG GGGGAAGATAA ACAGACGACA CGACACACAG

           F L F F Y C V I R D V I Y P Y V Y E K K
721 TTCTTGTGTT TCTATTGTGT TATAAGAGAC GTAATCTACC CTTATGTTTA TGAAAAGAAA
   AAGAACAAAA AGATAACACA ATATTCTCTG CATTAGATGG GAATACAAAT ACTTTTCTTT

```

FIG. 10B

D N T F R M A I S I P N R I F P I T A L
 781 GATAATACAT TTCGTATGGC TATTTCCATT CCAAATCGTA TCTTTCCAAT AACAGCACTT
 CTATTATGTA AAGCATACCG ATAAAGGTAA GGTTTAGCAT AGAAAGGTTA TTGTCGTGAA

T L L A L V Y L P G V I A A I L Q L Y R
 841 ACACTGCTTG CTTTGGTTTA CCTCCCTGGT GTTATTGCTG CCATTCTACA ACTGTACCGA
 TGTGACGAAC GAAACCAAAT GGAGGGACCA CAATAACGAC GGTAAGATGT TGACATGGCT

G T K Y R R F P D W L D H W M L C R K Q
 901 GGCACAAAAT ACCGTCGATT CCCAGACTGG CTTGACCACT GGATGCTTTG CCGAAAGCAG
 CCGTGTTTTA TGGCAGCTAA GGGTCTGACC GAACTGGTGA CCTACGAAAC GGCTTTCGTC

L G L V A L G F A F L H V L Y T L V I P
 961 CTTGGCTTGG TAGCTCTGGG ATTTGCCTTC CTTTATGTCC TCTACACACT TGTGATTCTT
 GAACCGAACC ATCGAGACCC TAAACGGAAG GAAGTACAGG AGATGTGTGA AACTAAGGA

I R Y Y V R W R L G N L T V T Q A I L K
 1021 ATTCGATATT ATGTACGATG GAGATTGGGA AACTTAACCG TTACCCAGGC AATACTCAAG
 TAAGCTATAA TACATGCTAC CTCTAACCTT TTGAATTGGC AATGGGTCCG TTATGAGTTC

K E N P F S T S S A W L S D S Y V A L G
 1081 AAGGACAATC CATTTAGCAC CTCCTCAGCC TGGCTCAGTG ATTCATATGT GGCTTTGGGA
 TTCCTCTTAG GTAAATCGTG GAGGAGTCGG ACCGAGTCAC TAAGTATACA CCGAAACCTT

I L G F F L F V L L G I T S L P S V S N
 1141 ATACTTGGGT TTTTCTGTT TGTACTCTTG GGAATCACTT CTTTGCCATC TGTTAGCAAT
 TATGAACCCA AAAAAGACAA ACATGAGAAC CCTTAGTGAA GAAACGGTAG ACAATCGTTA

A V N W R E F R F V Q S K L G Y L T L I
 1201 GCAGTCAACT GGAGAGAGTT CCGATTGTGC CAGTCCAAAC TGGGTATTAT GACCCGTGATC
 CGTCAGTTGA CCTCTCTCAA GGCTAAACAG GTCAGGTTTG ACCCAATAAA CTGGGACTAG

L C T A H T L V Y G G K R F L S P S N L
 1261 TTGTGTACAG CCCACACCCT GGTGTACGGT GGGAAGAGAT TCCTCAGCCC TTCAAATCTC
 AACACATGTC GGGTGTGGGA CCACATGCCA CCCTTCTCTA AGGAGTCGGG AAGTTTAGAG

R W Y L P A A Y V L G L I I P C T V L V
 1321 AGATGGTATC TTCCTGCAGC CTACGTGTTA GGGCTTATCA TTCCTTGACAC TGTGCTGGTG
 TCTACCATAG AAGGACGTCG GATGCACAAT CCCGAATAGT AAGGAACGTG ACACGACCAC

I K F V L I M P C V D N T L T R I R Q G
 1381 ATCAAGTTTG TCCTAATCAT GCCATGTGTA GACAACACCC TTACAAGGAT CCGCCAGGGC
 TAGTTCAAAC AGGATTAGTA CGGTACACAT CTGTTGTGGG AATGTTCTTA GGCGGTCCCG

W E R N S K H
 1441 TGGGAAAGGA ACTCAAAACA CTAGAAAAAG CATTGAATGG AAAATCAATA TTTAAACAA
 ACCCTTTCCT TGAGTTTGTG GATCTTTTTC GTAACCTACC TTTTAGTTAT AAATTTTGT

FIG. 10C

```

1501 AGTTCAATTT AGCTGGATTT CTGAACATG GTTTTGAATG TTTAAAGAAG AATGATGGGT
    TCAAGTTAAA TCGACCTAAA GACTTGATAC CAAAACCTAC AAATTTCTTC TTACTACCCA

1561 ACAGTTAGGA AAGTTTTTTT CTTACACCGT GACTGAGGGA AACATTGCTT GTCTTTGAGA
    TGTCATCCTT TTCAAAAAAA GAATGTGGCA CTGACTCCCT TTGTAACGAA CAGAAACTCT

1621 AATTGACTGA CATACTGGAA GAGAACACCA TTTTATCTCA GGTTAGTGAA GAATCAGTGC
    TTAAGTGAAT GTATGACCTT CTCTTGTGGT AAAATAGAGT CCAATCACTT CTTAGTCACG

1681 AGGTCCCTGA CTCTTATTTT CCCAGAGGCC ATGGAGCTGA GATTGAGACT AGCCTTGTGG
    TCCAGGGACT GAGAATAAAA GGGTCTCCGG TACCTCGACT CTAAGTCTGA TCGGAACACC

1741 TTTACACTA AAGAGTTTCC TTGTTATGGG CAACATGCAT GACCTAATGT CTTGCAAAAT
    AAAGTGTGAT TTCTCAAAGG AACAATACCC GTTGTACGTA CTGGATTACA GAACGTTTTA

1801 CCAATAGAAG TATTGCAGCT TCCTTCTCTG GCTCAAGGGC TGAGTTAAGT GAAAGGAAAA
    GGTATCTTTC ATAACGTCGA AGGAAGAGAC CGAGTTCCCG ACTCAATTCA CTTTCCTTTT

1861 ACAGCACAAT GGTGACCACT GATAAAGGCT TTATTAGGTA TATCTGAGGA AGTGGGTCAC
    TGTCGTGTTA CCACTGGTGA CTATTTCCGA AATAATCCAT ATAGACTCCT TCACCCAGTG

1921 ATGAAATGTA AAAAGGGAAT GAGGTTTTTG TTGTTTTTTG GAAGTAAAGG CAAACATAAA
    TACTTTACAT TTTTCCCTTA CTCCAAAAAC AACAAAAAAC CTTCAATTCC GTTTGTATTT

1981 TATTACCATG ATGAATTCTA GTGAAATGAC CCCTTGACTT TGCTTTTCTT AATACAGATA
    ATAATGGTAC TACTTAAGAT CACTTTACTG GGGAAGTAA ACGAAAAGAA TTATGTCTAT

2041 TTTACTGAGA GGAAGTATTT TTATAACACA AGAAAAATTT ACAATTGATT AAAAGTATCC
    AAATGACTCT CCTTGATAAA AATATTGTGT TCTTTTAAA TGTAACTAA TTTTCATAGG

2101 ATGTCTTGGT TACATACGTA TCTATAGAGC TGGCATGTAA TTCTTCCTCT ATAAAGAATA
    TACAGAACCT ATGTATGCAT AGATATCTCG ACCGTACATT AAGAAGGAGA TATTTCTTAT

2161 GGTATAGGAA AGACTGAATA AAAATGGAGG GATATCCCCT TGGATTTCAC TTGCATTGTG
    CCATATCCTT TCTGACTTAT TTTTACCTCC CTATAGGGGA ACCTAAAGTG AACGTAACAC

2221 CAATAAGCAA AGAAGGGTTG ATAAAAGTTC TTGATCAAAA AGTTCAAAGA AACCAGAATT
    GTTATTCGTT TCTTCCCAAC TATTTTCAAG AACTAGTTTT TCAAGTTTCT TTGGTCTTAA

2281 TTAGACAGCA AGCTAAATAA ATATTGTAAA ATTGCACTAT ATTAGGTTAA GTATTATTTA
    AATCTGTCGT TCGATTTATT TATAACATTT TAACGTGATA TAATCCAATT CATAATAAAT

2341 GGTATTATAA TATGCTTTGT AAATTTTATA TTCCAAATAT TGCTCAATAT TTTTCATCTA
    CCATAATATT ATACGAAACA TTTAAAATAT AAGGTTTATA ACGAGTTATA AAAAGTAGAT

2401 TTAAATTAAT TTCTAGTGTA AATAAGTAGC TTCTATATCT GTCTTAGTCT ATTATAATTG
    AATTTAATTA AAGATCACAT TTATTCATCG AAGATATAGA CAGAATCAGA TAATATTAAC

```

FIG. 10D

2461 TAAGGAGTAA AATTAAATGA ATAGTCTGCA GGTATAAATT TGAACAATGC ATAGATGATC
 ATTCCTCATT TTAATTTACT TATCAGACGT CCATATTTAA ACTTGTTACG TATCTACTAG
 2521 GAAAATTACG GAAAATCATA GGGCAGAGAG GTGTGAAGAT TCATCATTAT GTGAAATTTG
 CTTTAAATGC CTTTAGTAT CCCGTCTCTC CACACTTCTA AGTAGTAATA CACTTTAAAC
 2581 GATCTTTCTC AAATCCTTGC TGAATTTAG GATGGTTCTC ACTGTTTTTC TGTGCTGATA
 CTAGAAAGAG TTTAGGAACG ACTTTAAATC CTACCAAGAG TGACAAAAAG ACACGACTAT
 2641 GTACCCTTTC CAAGGTGACC TTCAGGGGGA TTAACCTTCC TAGCTCAAGC AATGAGCTAA
 CATGGGAAAG GTTCCACTGG AAGTCCCCCT AATTGGAAGG ATCGAGTTCC TTACTCGATT
 2701 AAGGAGCCTT ATGCATGATC TTCCACATA TCAAATAAC TAAAAGGCAC TGAGTTTGGC
 TTCTCGGAA TACGTACTAG AAGGGTGTAT AGTTTTATTG ATTTTCCGTG ACTCAAACCG
 2761 ATTTTTCTGC CTGCTCTGCT AAGACCTTTT TTTTTTTTTT ACTTTCATTA TAACATATTA
 TAAAAAGACG GACGAGACGA TTCTGGAAAA AAAAAAAAAA TGAAAGTAAT ATTGTATAAT
 2821 TACATGACAT TATACAAAAA TGATTAAAT ATATTAAAC AACATCAACA ATCCAGGATA
 ATGTACTGTA ATATGTTTTT ACTAATTTTA TATAATTTTG TTGTAGTTGT TAGGTCCTAT
 2881 TTTTTCTATA AAACTTTTTA AAAATAATTG TATCTATATA TTCAATTTTA CATCCTTTTT
 AAAAAGATAT TTTGAAAAAT TTTTATTAAC ATAGATATAT AAGTTAAAT GTAGGAAAAA
 2941 CAAAGGCTTT GTTTTCTAA AGGCTTTGTT TTCCTTTTTA TTATTTTTTT CTTTTTATT
 GTTTCCGAAA CAAAAAGATT TCCGAAACAA AAGGAAAAAT AATAAAAAAA GAAAAATAA
 3001 TTTTGTAGAC AGTCTTGCTC TGTCGCTCAG GCTGGAGTGC AGTGGCACGA TCTCAGCTCA
 AAAAATCTCT TCAGAACGAG ACAGCGAGTC CGACCTCACG TCACCGTGCT AGAGTCGAGT
 3061 CTGCAACCTC CTCCTCCCAG GTTCAAGTGA TTCTTGTTCA TCAGCCTCCC GAGTAGCTGG
 GACGTTGGAG GAGGAGGGTC CAAGTTCACT AAGAACAAGT AGTCGGAGGG CTCATCGACC
 3121 GACTACAGGC ATGTGCCACT ATGCCAGCT AATTTTTGTA CTTTATAGTAG AGACAGGGTT
 CTGATGTCCG TACACGGTGA TACGGGTCCA TTAAAAACAT GAAAATCATC TCTGTCCCAA
 3181 TCACCACATT GGTGAGGCTG GTCTTGAAAT GCTGGCGTCA AGTGATCTGC CTGCCTCCGC
 AGTGGTGTA CAGTCCGAC CAGAACTTTA CGACCGCAGT TCACTAGACG GACGGAGGCG
 3241 CTTACGTAAT ATATTTCTT AATGGCTGCA TAATATCACA TCAAATAGGC ATTTTCAAAA
 GAATGCATTA TATAAAGAA TTACCGACGT ATTATAGTGT AGTTTATCCG TAAAAAGTTT
 3301 CCTCTTTCCT TATTAAACAT GTAGACTATA TCCATTTTTT ACTAAAATAA ATAACATTC
 GGAGAAAGGA ATAATTTGTA CATCTGATAT AGGTAAAAAA TGATTTTATT TATTGTAAAG
 3361 AGATAATATC TTTGCACTGA TAATGTTGCC AAGCCATTTT TAAAGTGACC TTATCAATTT
 TCTATTATAG AAACGTGACT ATTACAACGG TTCGGTAAAG ATTTCACTGG AATAGTTAAA

FIG. 10E

```

3421 AATTACCATT GGATGAGGGT GTTGCTTTCA TCGCACCATT GTAGATTGTC TTTTTTATTT
    TTAATGGTAA CCTACTCCCA CAACGAAAGT AGCGTGGTAA CATCTAACAG AAAAAATAAA

3481 CAATTTGCGT TTATTTATAA CTGGTTGCAA AGGTACACAG AACACACGCT CCTTCAACTT
    GTTAAACGCA AATAAATATT GACCAACGTT TCCATGTGTC TTGTGTGCGA GGAAGTTGAA

3541 ATCTTTGATA AACCCAAGCA AGGATACAAA AAGTTGGACG ACATTGAGTA GAGTCATGGT
    TAGAAACTAT TTGGGTTCGT TCCTATGTTT TTCAACCTGC TGTAACCTCAT CTCAGTACCA

3601 ATACGGTGCT GACCCACAG TATCAGTGGA AAAGATAAGG AAAATGTCAC TACTCACCTA
    TATGCCACGA CTGGGATGTC ATAGTCACCT TTTCTATTCC TTTTACAGTG ATGAGTGGAT

3661 TGTTATGCAA AACAGTTAGG TGTGCTGGGG CTGGATACTG CTCTTTTACT TGAGCATTGG
    ACAATACGTT TTGTCAATCC ACACGACCCC GACCTATGAC GAGAAAATGA ACTCGTAACC

3721 TTGATTAAAG TTTAGGTACC ATCCAGGCTG GTCTAGAGAA GTCTTTGGAG TTAACCATGC
    AACTAATTTT AATCCATGG TAGGTCCGAC CAGATCTCTT CAGAAACCTC AATTGGTACG

3781 TCTTTTTGTT AAAGAAGAGA GTAATGTGTT TATCCTGGCT CATAGTCCGT CACCGAAAAT
    AGAAAAACAA TTTCTTCTCT CATTACACAA ATAGGACCGA GTATCAGGCA GTGGCTTTTA

3841 AGAAAATGCC ATCCATAGGT AAAATGCTGA CCTATAGAAA AAAATGAACT CTACTTTTAT
    TCTTTTACGG TAGGTATCCA TTTTACGACT GGATATCTTT TTTTACTTGA GATGAAAATA

3901 AGCCTAGTAA AAATGCTCTA CCTGAGTAGT TAAAAGCAAT TCATGAAGCC TGAAGCTAAA
    TCGGATCATT TTTACGAGAT GGAATCATCA ATTTTCGTTA AGTACTTCGG ACTTCGATTT

3961 GAGCACTCTG ATGGTTTTGG CATAATAGCT GCATTTCCAG ACCTGACCTT TGGCCCCAAC
    CTCGTGAGAC TACCAAAACC GTATTATCGA CGTAAAGGTC TGGACTGGAA ACCGGGGTTG

4021 CACAAGTGCT CCAAGCCCCA CCAGCTGACC AAAGAAAGCC CAAGTTCTCC TTCTGTCTTT
    GTGTTACGGA GGTTCGGGGT GGTGCGACTG TTTCTTTCGG GTTCAAGAGG AAGACAGGAA

4081 CCCACAACCT CCCTGCTCCC AAAACTATGA AATTAATTTG ACCATATTAA CACAGCTGAC
    GGGTGTGGA GGGACGAGGG TTTTGATACT TTAATTAAAC TGGTATAATT GTGTCGACTG

4141 TCCTCCAGTT TACTTAAGGT AGAAAGAATG AGTTTACAAC AGATGAAAAT AAGTGCTTTG
    AGGAGGTCAA ATGAATTCCA TCTTTCTTAC TCAAATGTTG TCTACTTTTA TTCACGAAAC

4201 GGCGAACTGT ATTCCTTTTA ACAGATCCAA ACTATTTTAC ATTTAAAAAA AAAGTTAAAC
    CCGCTTGACA TAAGGAAAAT TGTCTAGGTT TGATAAAATG TAAATTTTTT TTTCATTTG

4261 TAAACTTCTT TACTGCTGAT ATGTTTCCTG TATTCTAGAA AAATTTTAC ACTTTCACAT
    ATTTGAAGAA ATGACGACTA TACAAAGGAC ATAAGATCTT TTTAAAAATG TGAAAGTGTA

4321 TATTTTTGTA CACTTCCCC ATGTTAAGGG ATGATGGCTT TTATAAATGT GTATTCATTA
    ATAAAAACAT GTGAAAGGGG TACAATTCCC TACTACCGAA AATATTTACA CATAAGTAAT

4381 AATGTTACTT TAAAAATAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA
    TTACAATGAA ATTTTTATTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT

```

FIG. 10F

STEAP-1, AA508880 (NCI_CGAP Pr6)

ggtcgacttttccctttattcccttggcagagatctgattcatccatatgctagaaaccaacagagtgcacttttaca
aaattccctatagagattgtgaataaaaccttacctatagttgccattactttgctctccctagtataccttgcagg
tcttctggcagctgcttatcaactttattacggcaccaagtataggagattccaccttgggtggaaacctgggtta
cagtgtagaaaacagcttggattactaagttgtttcttcgctatgggtccatgttgctacagccctctgcttaccga
tgagaaggtcagagagat

STEAP-2, fragmento SSH de 98P4B6

TTTGACGCTTTGCAGATACCCAGACTGAGCTGGAAGTGAATTTGTCTTCCTATTGACTCTACTTCTTTAAAGCG
GCTGCCATTACATTCTCAGCTGTCCTTGCAAGTTAGGTGTACATGTGACTGAGTGTGGCCAGTGAGATGAAGTC
TCCTCAAAGGAAGGCAGCATGTGTCCTTTTT

STEAP-3, A1139607 (EST de testículos)

aagaaggagaatccatttagcacctcctcagccctggctcagtgattcatatgtggctttgggaataacttgggtttt
tctgtttgtactcttgggaatcacttcttggccatctgttagcaatgcagtcacctggagagagttccgatttgt
ccagtcctaaactgggttatttgacctgatcttgtgtacagcccacacctgggtgtacgggtgggaagagattcctc
agcccttcaaatctcagatgggtatcttccctgcagcctacgtgttagggcttatcattccttgcactgtgctgggtga
tcaagtttgtcctaatacatgccatgtgttagacaacaccttacaaggatccgccagggctgggaaaggaaactcaaa
acactagaaaaagcattgaatggaaaaatcaatatataaaacaaagttcaatttagctggaaaaaaaaa

STEAP-4, R80991 (EST de placenta)

ggccgcggcancgcctacgaacctgggtcaacctggcagtcgaagcaggtcttggccanacaagagccacctctgggtg
aaggaggaggtctggcggtggagatctacctctccctgggagtgctggccctcggcacgttgtccctgctggccg
tgacctcactgcccgtccattgcaaaactcgctcaactggagggagttcagcttcgttcagtcctcactgggcttctgt
ggccntcgtgctgagcacactncacacgctcacctacggctggaccgcgccttcgaggagagccgctacaagttc
tacctnccctcccacettcaagntcacgctgctgggtgccctgcttcgttcacacctgggccaagccctgtttntac
tgcccttgcatccagccgnaga

FIG. 11A

1	15	16	30	31	45	46	60	61	75	76	90
2	STAP2	MESISMMGSPKSLSE	TC---	LPNGINGIKD	ARKVTVGVIGSDPA	KSLTIRLIRGTHV	IGSRNPKFASEFFPH	VVDVTHHEDALITKN	87		
3	STAP3	-----NEK	TCIDALPLTMNSSE-	-KQETVCIFGTDEG	RLSLGLKMLQCGKSVV	FGSRNPKQIT-LLPS	GAEMLSYSEAAKSG	75			
4	STAP1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0			
5	STAP4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0			
91	105	106	120	121	135	136	150	151	165	166	180
2	STAP2	IFVAIHREHYTSW	DURHLVVKILIDVS	NNMKNQYPSNAEY	LAQLPDSLVKGFN	VVSAAALQGLPKDAS	QOVYICSNINIOARQQ	177			
3	STAP3	IFVAIHREHYDFT	ELTEVANGKILVDIS	NNLKINQYPSNAEY	LAHLVFGARHVYKAFN	TLSAAALQSGALDAS	QOVYICGNDKAKQR	165			
4	STAP1	-----	-----	-----	-----	-----	QBELMKMK-PRRNLE	EDDYL--HKDTGETS	36		
5	STAP4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0			
181	195	196	210	211	225	226	240	241	255	256	270
2	STAP2	VIELARQLNF-IRID	IGSLSSARETENLPI	RLFTLNRGPPVVVAIS	LAATFFLYSFVRDVI	APYARNQSDIFYKIP	TEIVNKTLPVATIL	266			
3	STAP3	VMDIVENVGL-TPMD	QGSIMAAKEIEKVPD	QLFPMWRFPFYLSAV	LCVLEFPCVCIKDV	YPAVYKDKNTFRMA	LSLPMRIPTATIL	254			
4	STAP1	MLKRPVLHHTQTAH	ADEFDCPSELQH-TQ	ELFPQWHLPIKIAAI	IASLITFLYTLIRREVI	HPLATSHQQVIFYKIP	ILVINRVLPMVSTIL	125			
5	STAP4	-----	-----	-----	-----	-----	-----	0			
271	285	286	300	301	315	316	330	331	345	346	360
2	STAP2	LSLVVLAGLIAAAVQ	LKVGTKYRFPFPMLE	TMLQCRKQLGLISEF	FAMVHVAYSICLPMR	RSERYFLMAYQQV	HANIENSWNEEEVWR	356			
3	STAP3	LALVYLPGVIAAALQ	LYRGTKYRFPFPMLE	HMMLCRKQLGLVAG	FATFHLVLTAVIPIR	YVVRWRGLNLTVTQA	ILAKENPFTSSAWL	344			
4	STAP1	LALVYLPGVIAAIVQ	LQNGTKYKFPFPMLE	KMMLTRKQFGLISEF	FAMVHAIYSISYPMR	RSYRYGLMAYQQV	QONKEDAMIEHDVWR	215			
5	STAP4	-----	-----	-----	-----	-----	AAKATTTWSTWQSSRS	WPXKSHLVVKEEYWR	31		

FIG. 11C

```

STEAP-1      67  LFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLRLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMSITLL
STEAP-2      208  LFTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYARNQQSDFYKIPIEIVNKTLPIVAITLL
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
STEAP-1      127  ALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKMWLTRKQFGLLSFFFVAVLHAIYSLSPMRR
STEAP-2      268  SLVYLAGLAAAYQLYYGTYRRFPWLETWLQCRKQLGLLSFFFAMVHVAYSICLPMRR
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
STEAP-1      187  SYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSLT
STEAP-2      326  SERYFLNWAYQQVHANIENSWNEEEVWRIEYISFGIMSLGLLSLAVTSIPSVSNALN
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
STEAP-1      247  WREFPHYIQSKLGIVSLLGTTIHALIFAWNKNIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVILI
STEAP-2      188  WREFSFIQSTLGLYVALLISTFHVLIYGWKRAFEIEEYRFYTPPNFVLALVLPISVIL
               * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

FIG. 11D

STEAP1 66 ELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMSITL
STEAP3 195 QLFPMWRFPPFYLSAVLCVFLFFYCVIRDVIYPYVYEKKONTFRMAISIPNRIFPITALTL
*** * * * * * * * * * * *

STEAP1 126 LALVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLRAIYSLSYPMR
STEAP3 255 LALVYLPGVIAAILQLYRGTKYRRFPDWLDHWMLCRKQLGLVALGFAFLHVLYTLVIPR
***** ** * * * * * * * * * * *

STEAP1 186 RSYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSL
STEAP3 315 YYVRWRLGNLTVTQAILKKENPFSTSSAWLSDSYVALGILGFFLFVLLGITSLSVSNV
* * * * * * * * * * * * * * *

STEAP1 246 TWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLIFK
STEAP3 375 NWREFRFVQSKLGYLTILCTAHTLVYGGKRFLSPSNLRWYLPAAAYVLGLIIPCTVLVIK
***** * * * * * * * * * * *

STEAP1 306 SILFLPCLRKKILKIRHGVEDVTK
STEAP3 435 FVLIMPCVDNTLTRIRQGWERNK
* * * * * * * * *

FIG. 11E

```

STEAP2  29  RKVTVGVIGSGDFAKSLTIRLIRCGYHVVIGSRNPKFASEFFPHVVDVTHHEDALTKTNI
STEAP3  18  KQETVCIFGTGDFGRSLGLKMLQCGYSVVFGSRNPQ-KTTLLPSGAEVLSYSEAAKSGI
          **  * *** **          *** ** * ***          *  *          *  *

STEAP2  89  IFVAIHREHYTSLWDLRHLLVGKILIDVSNMNRINQYPESNAEYLASLFPDSLIVKGENV
STEAP3  77  IIIAIREHYDFLTELTEVLNGKILVDISNNLKINQYPESNAEYLAHLVPGAHVVKAFNT
          *  * *** ** *  *  * *** * ***  * *** ** *  *  * *** **

STEAP2 149  VSAWALQLGPKDASRQVYICSNNIQARQQVIELARQLNFIPIDLGSLSSAREIENLPLRL
STEAP3 137  ISAWALQSGALDASRQVFVCGNDSKAKQVRMDIVRNLGLTPMDQGSLMAAKEIEKYPLQL
          * *** ** * *** ** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

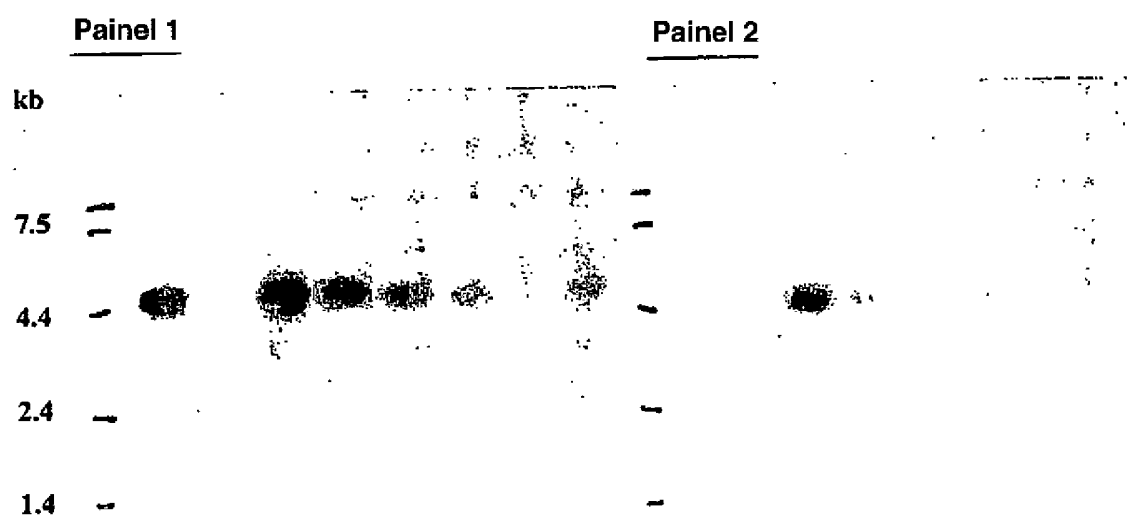
STEAP2 209  FTLWRGPVVVAISLATFFFLYSFVRDVIHPYARNQQSDFYKIPIEIVNKTLPIVAITLLS
STEAP3 197  FPMWRFPFYLSAVLCVFLFFYCVIDRDIYPYVYEKKDNTFRMAISIPNRIFPITALTLLA
          *  * *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

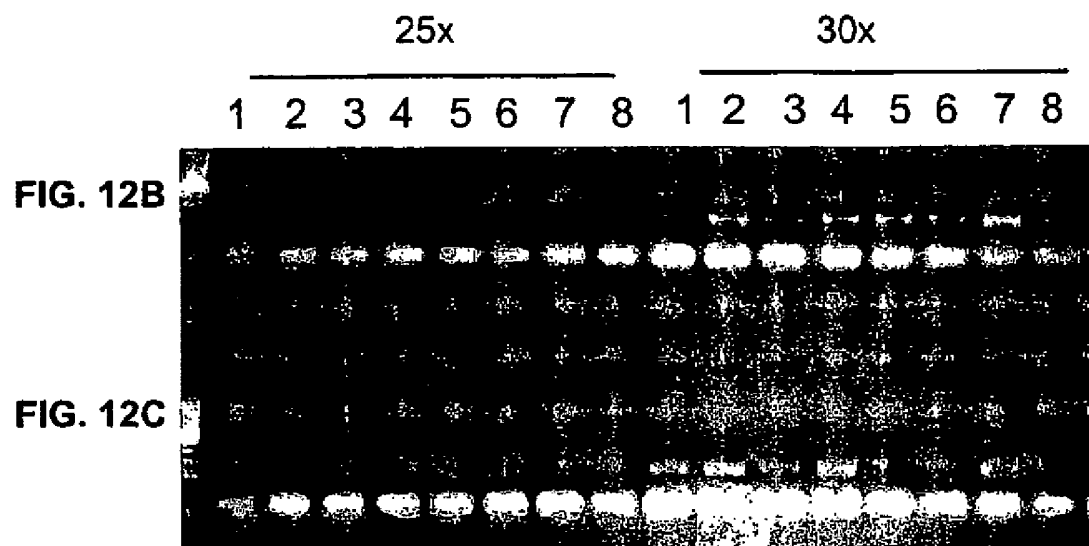
STEAP2 269  LVYLAGLLAAAYQLYGYTKYRRFPPWLETWLQCRKQLGLLSFFFAMVHVAYSCLPMRRS
STEAP3 257  LVYLPGVIAAILQLYRGTKYRRFPDWLDHWMLCRKQLGLVALGFAFLHVLYTLVIPIRYY
          * *** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

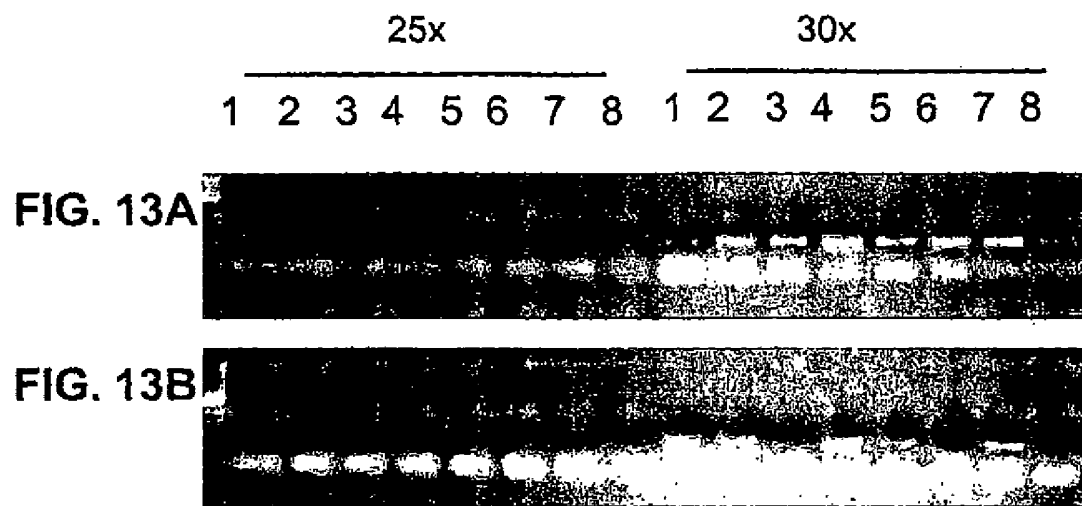
STEAP2 329  ERYLFLNMAYQQVHANIENSWNEEEVWRIEMYISFGIMSLGLLSLLAVTSIPSVSNALNW
STEAP3 317  VRWRLGNLTVTQAILKKENPFSTSSAWLSDSYVALGILGFFLFVLLGITSLSVSNVAVNW
          *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

STEAP2 389  REFSFIQSTLGYVALLISTFHVLIYGWKRAFEIEYRFYTPPNFVLALVLPISIVIL
STEAP3 377  REFRFVQSKLGYLTLILCTAHTLVYGGKRFLSPSNLRWYLPAAAYVLGLIIPCTVLV
          *** * *** ** *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *

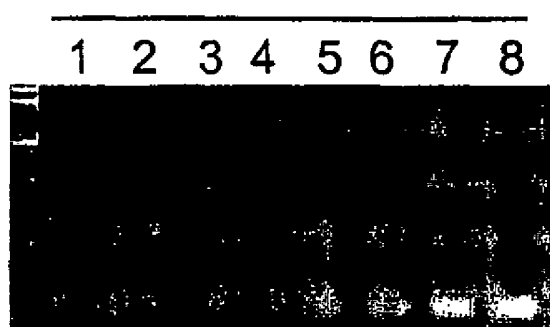
```

FIG. 12A





26x



1 2 3 4 5 6 7 8

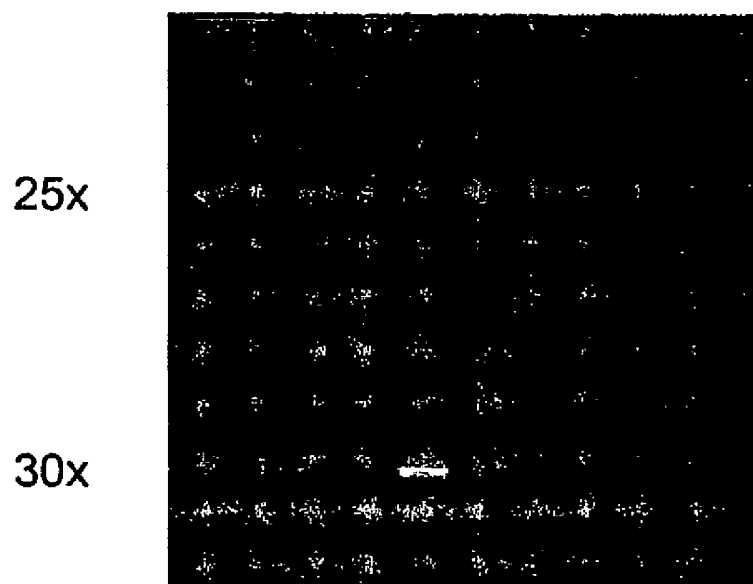


FIG. 15C

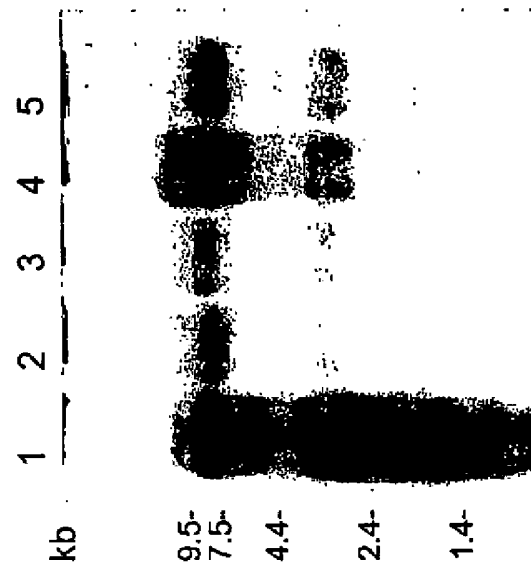


FIG. 15B

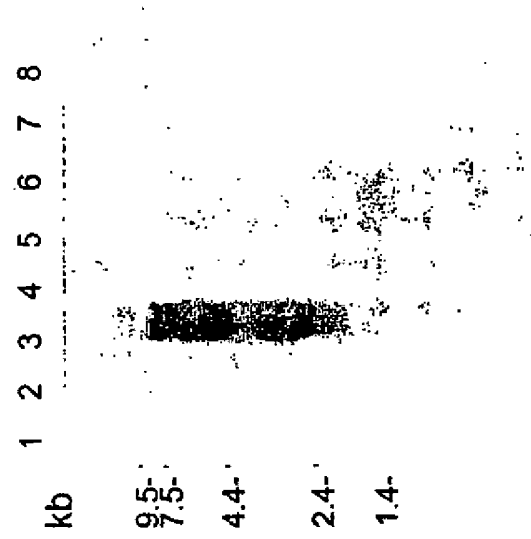


FIG. 15A

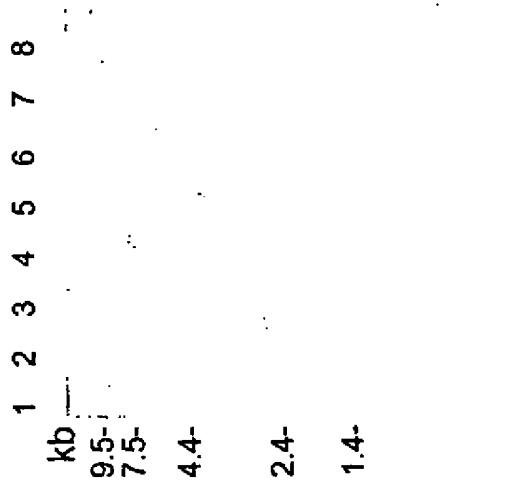


FIG. 16

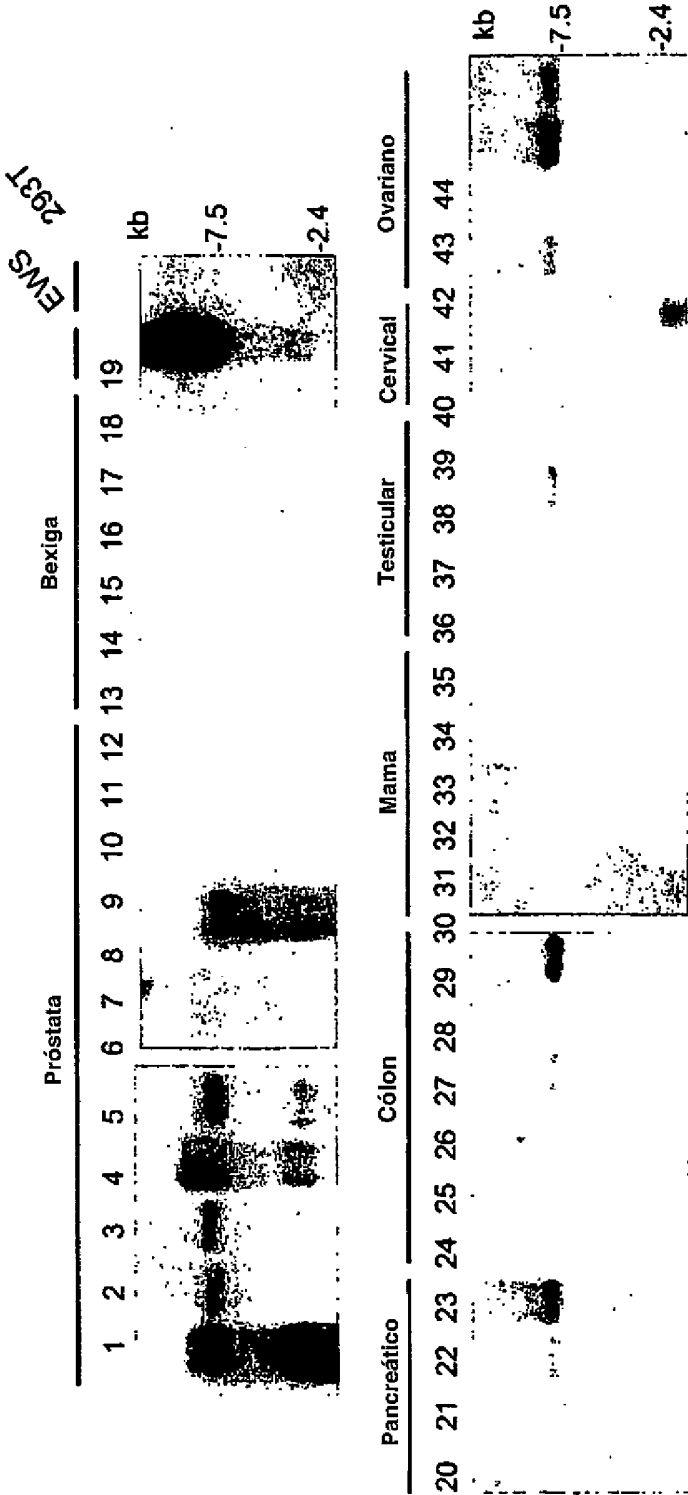


FIG. 17

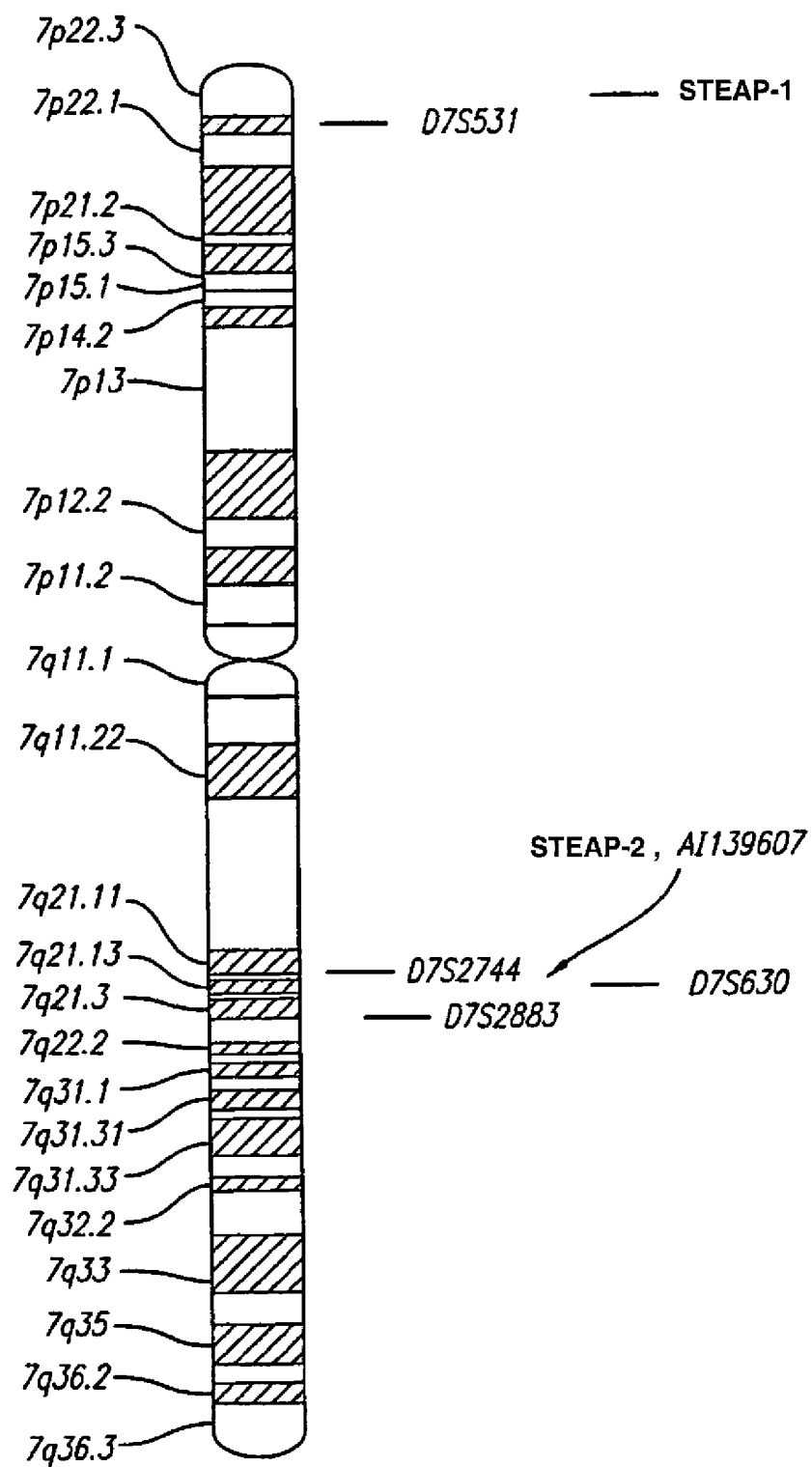


FIG. 18



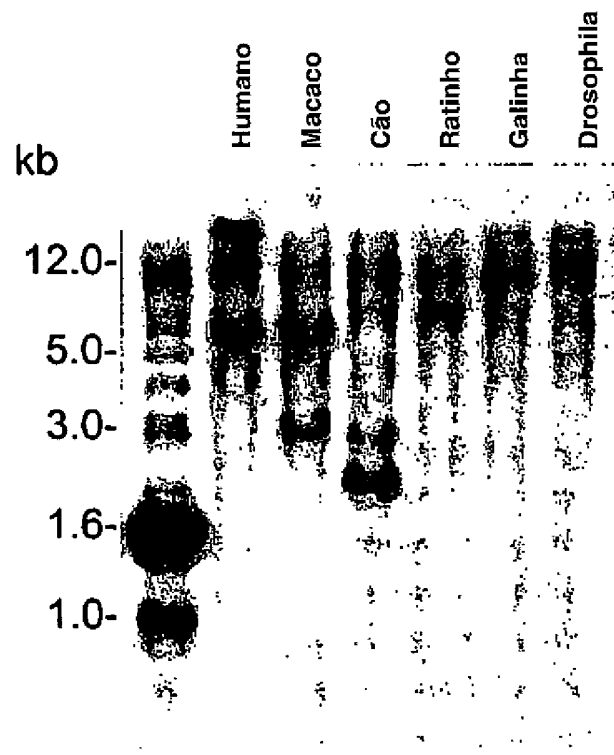
FIG. 19

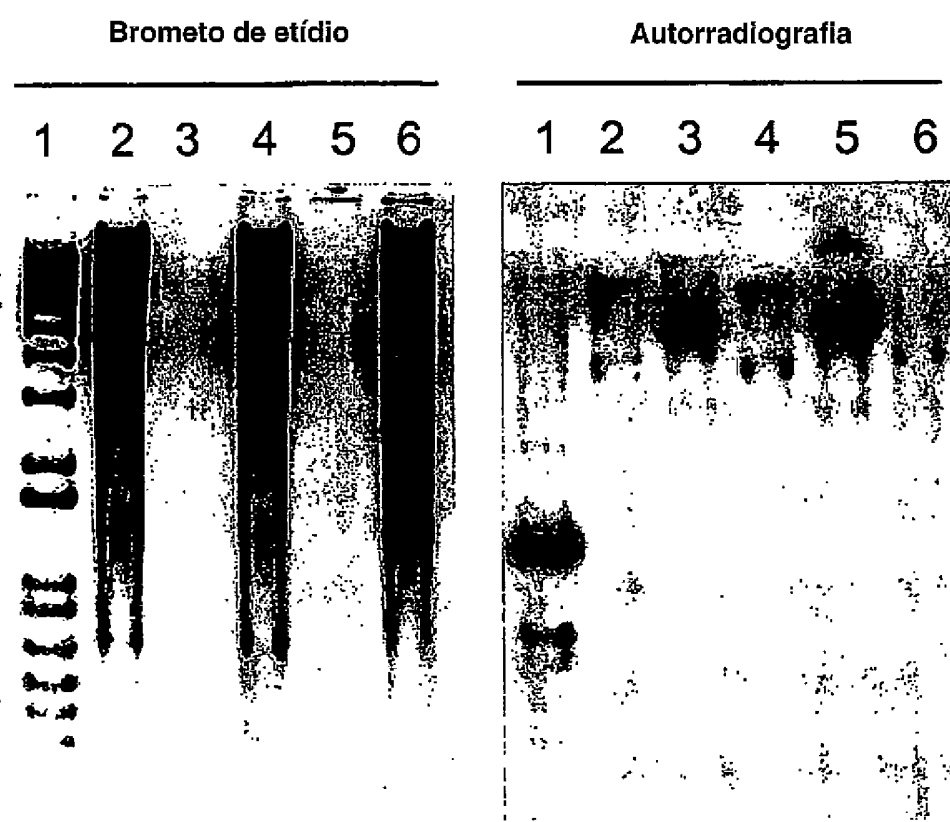
FIG. 20

Fig. 21B



Fig. 21D



Fig. 21A



Fig. 21C



Fig. 22A



Fig. 22B

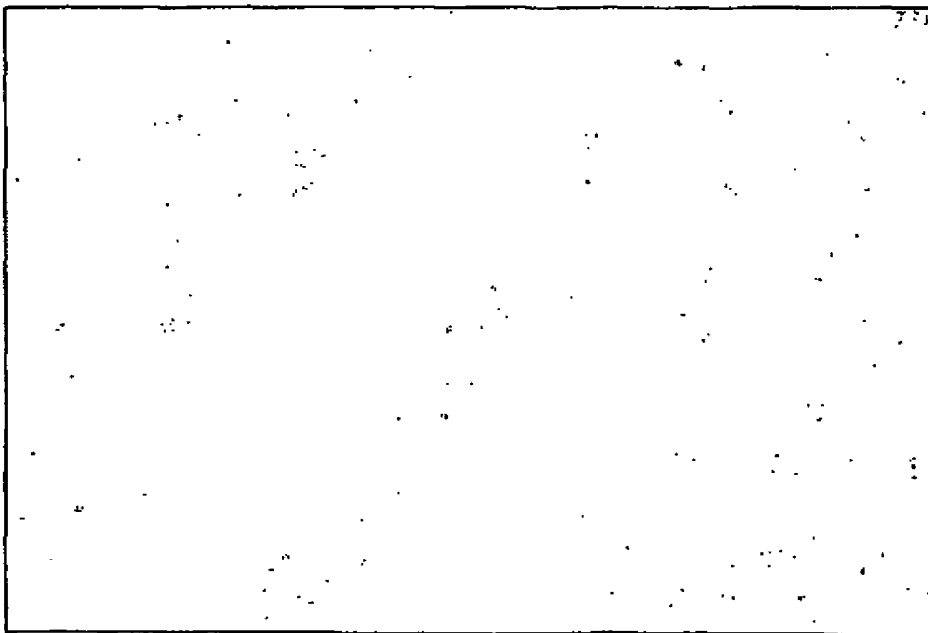


Fig. 23A

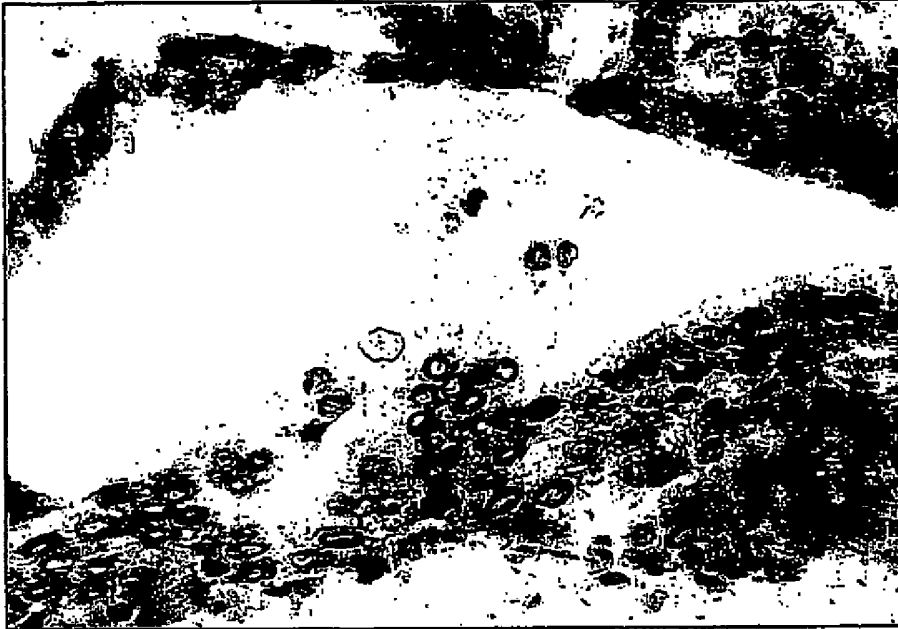


Fig. 23B

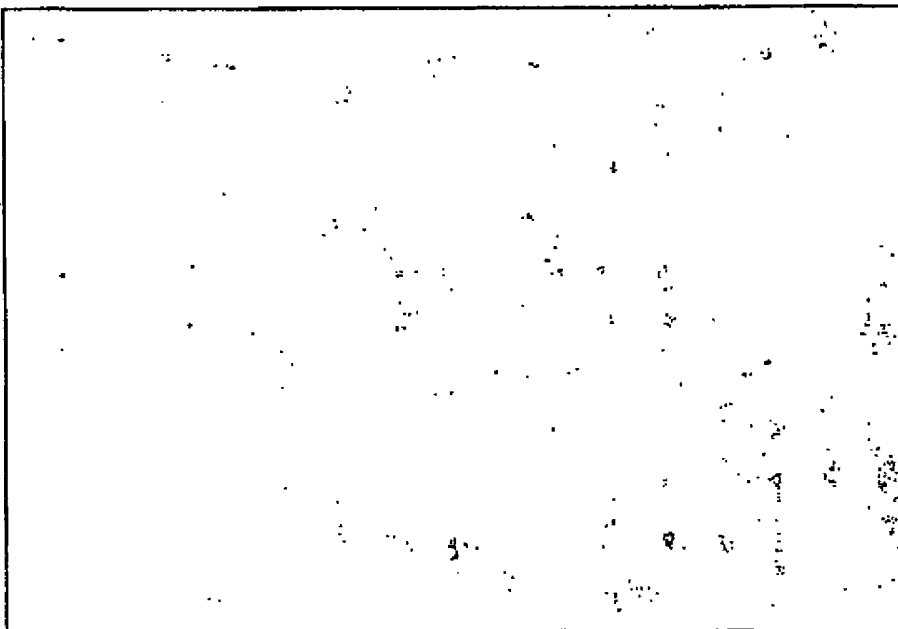


Fig. 24

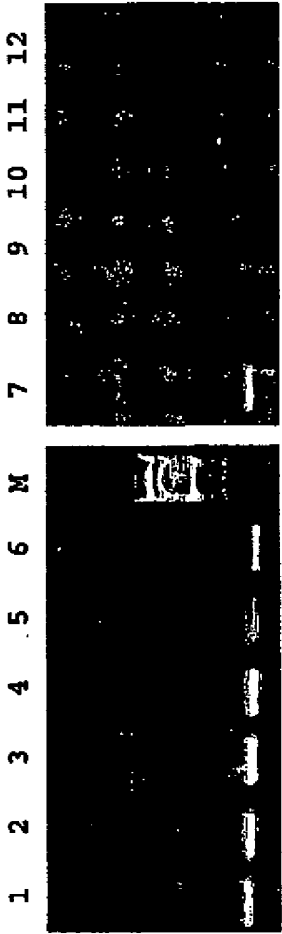


Fig. 25

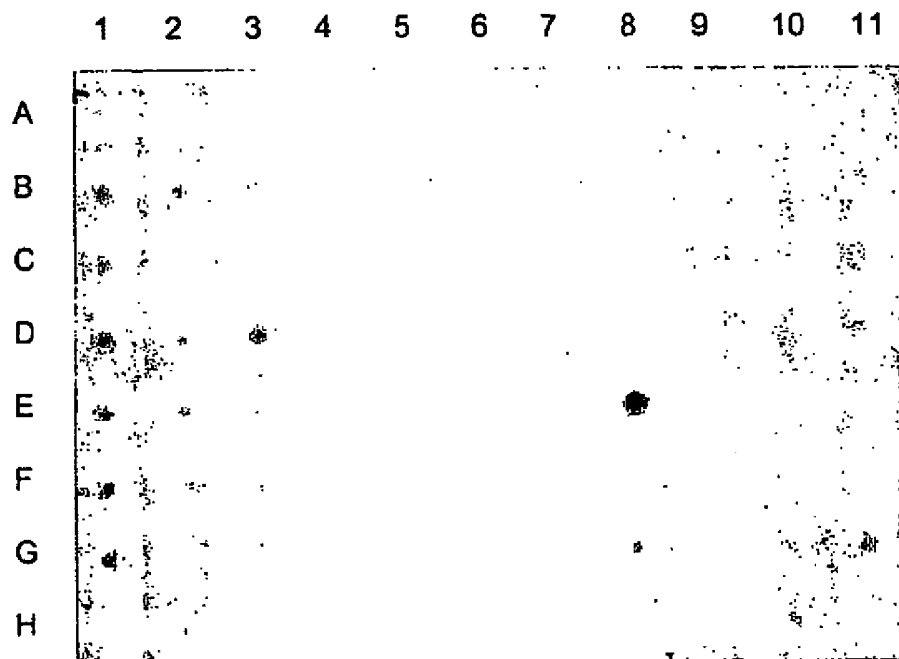
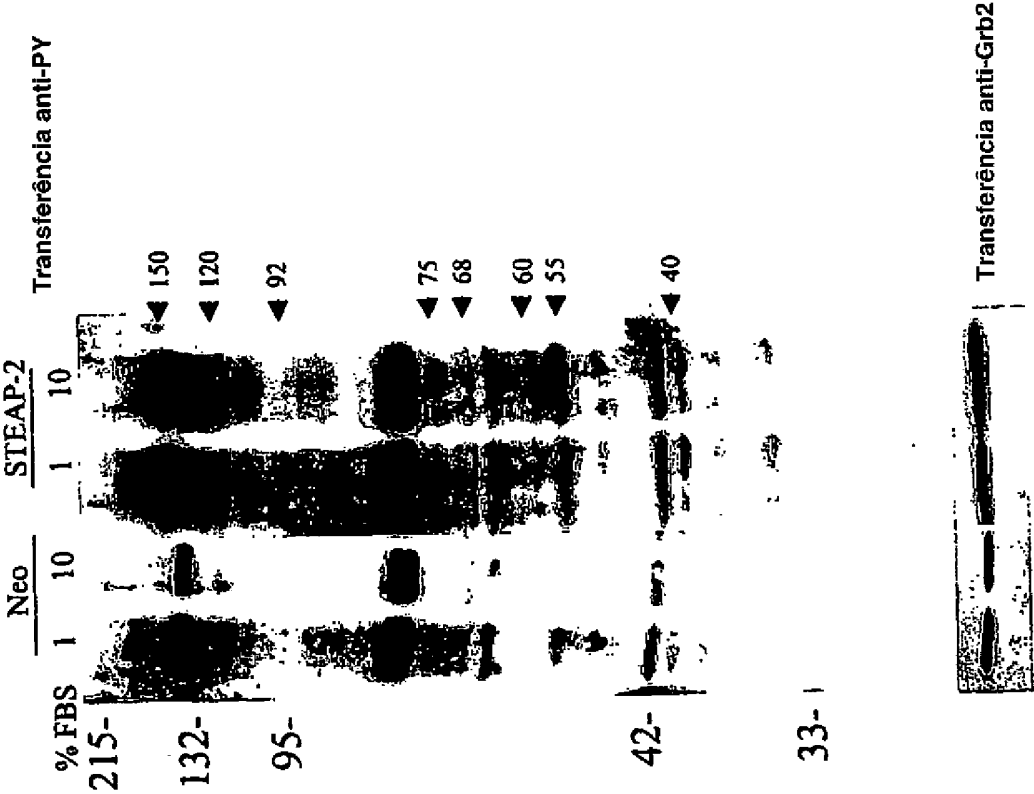


FIG. 26



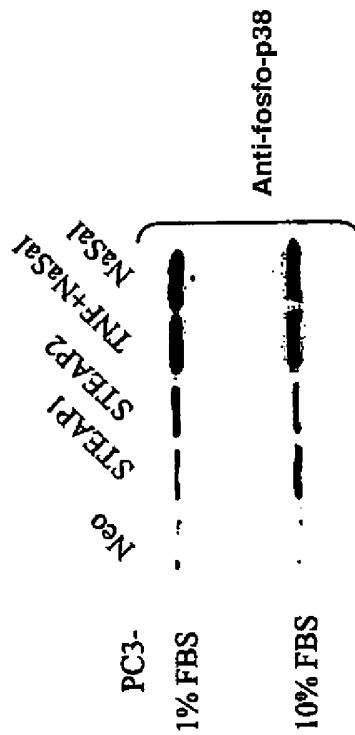


FIG. 27A

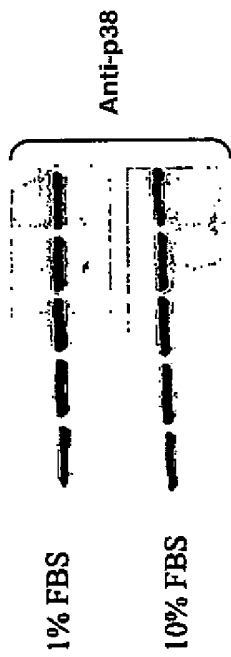


FIG. 27B

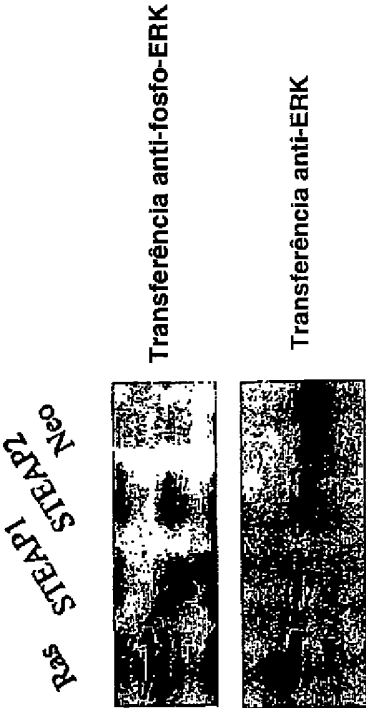


FIG. 28A

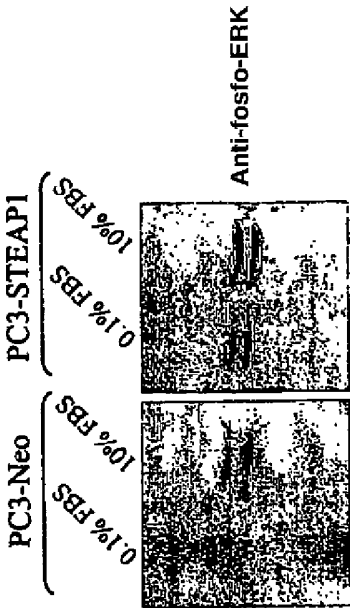


FIG. 28B

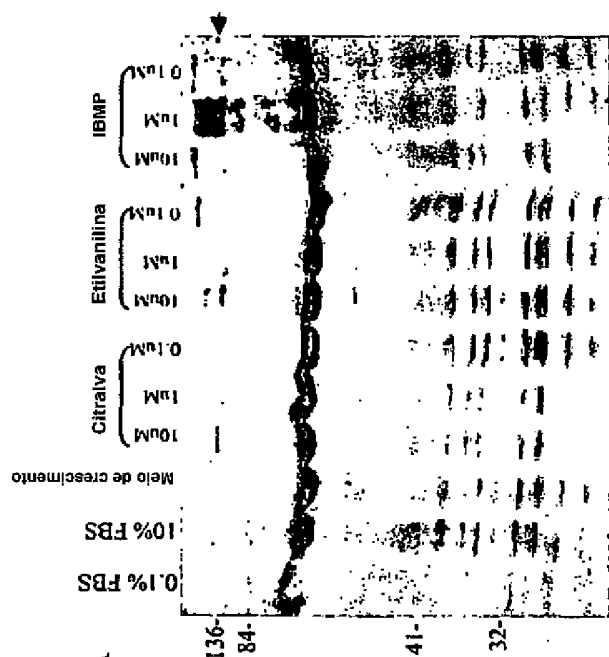


FIG. 29A
PC3-Neo

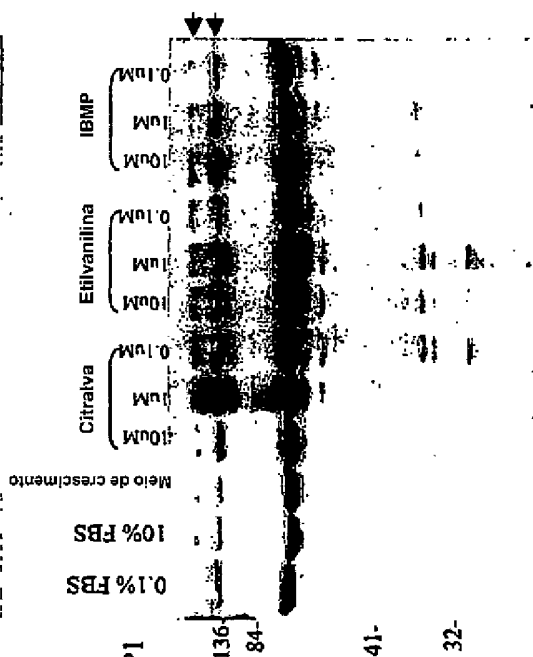


FIG. 29B
PC3-STEAPI

FIG. 30

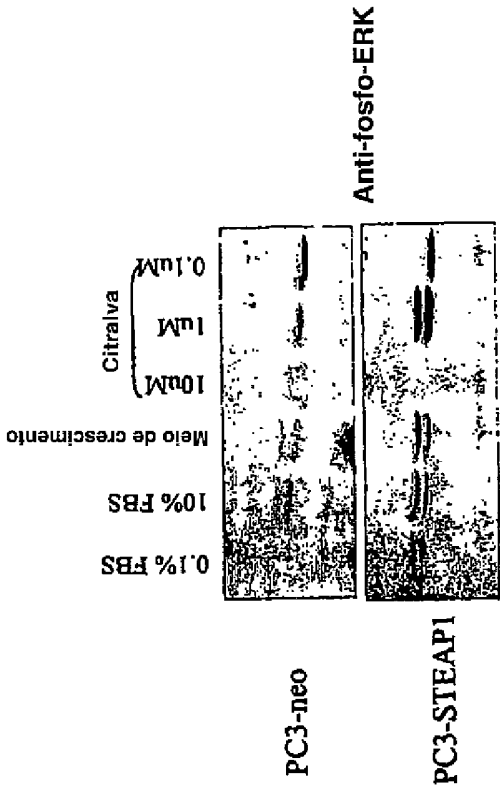


Fig. 31A



Fig. 31B

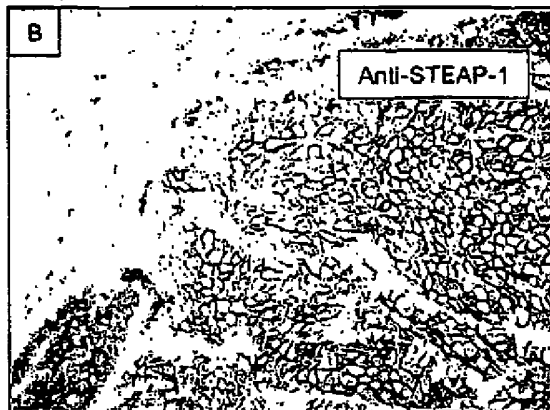


Fig. 31C

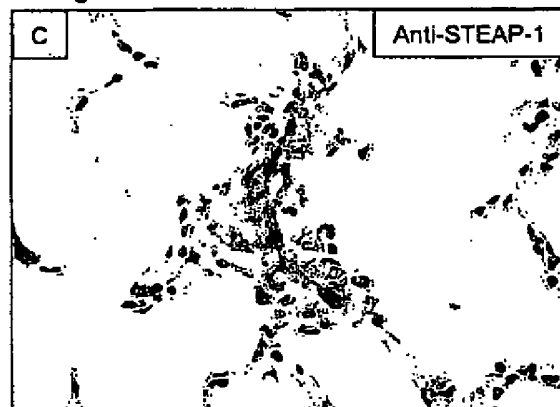


Fig. 31D

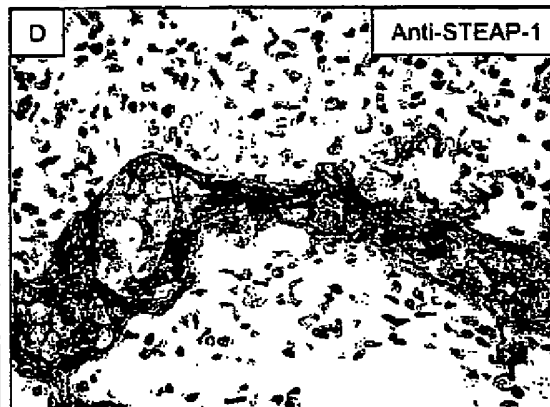


Fig. 31E

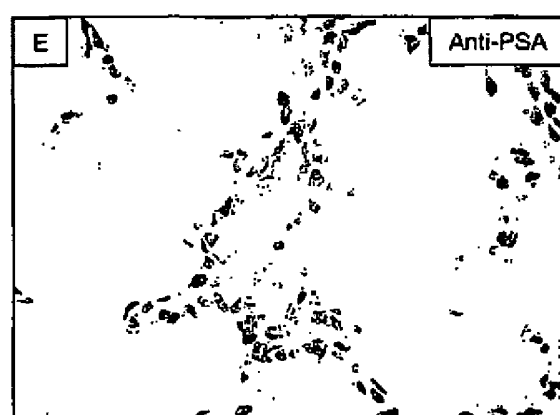


Fig. 31F

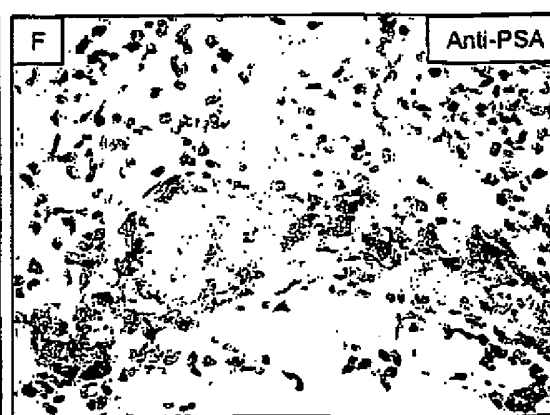


Fig. 32A

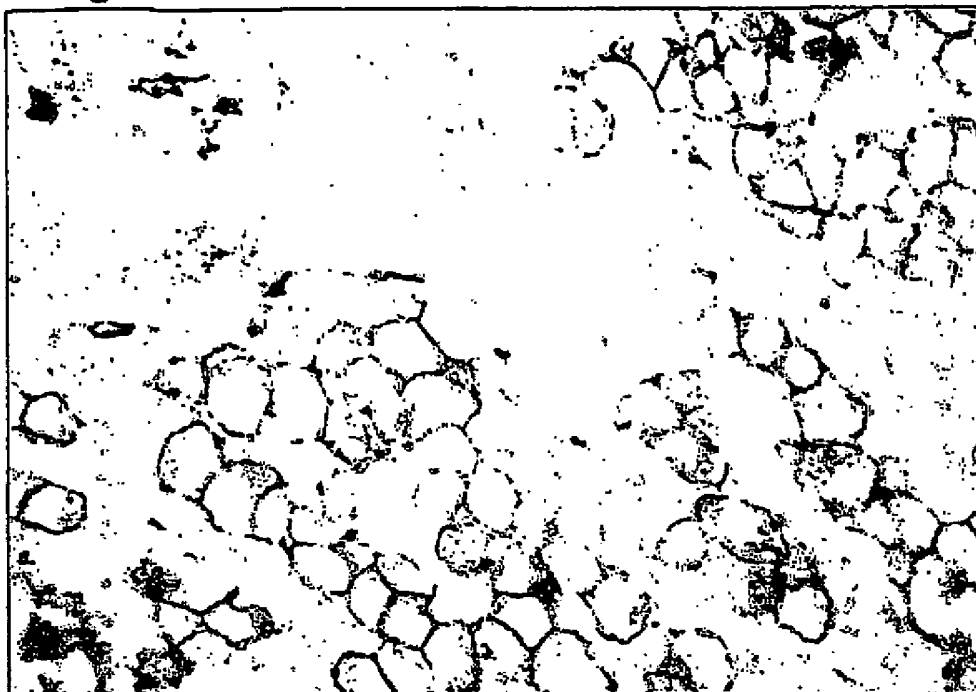


Fig. 32B

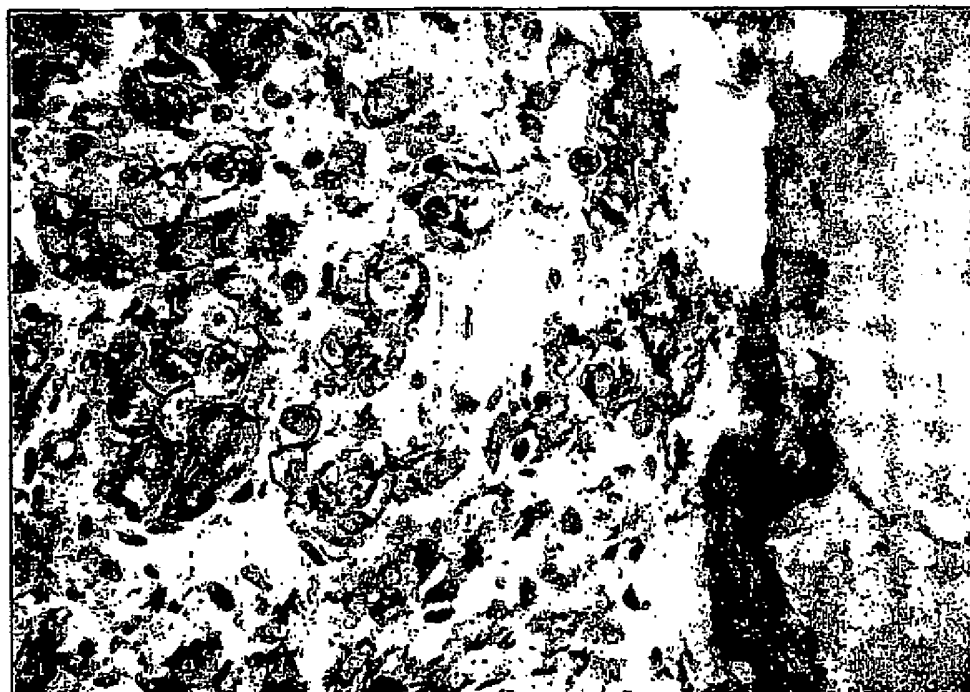


FIG. 33

