BT

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 06-117695

54. TITULO **"ANTICUERPOS Y MOLECULAS DERIVADAS DE ESTOS QUE SE ENLAZAN A LAS PROTEINAS DE STEAP-1"**

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/00

71. SOLICITANTE **AGENSYS INC.**

DOMICILIO Santa Mónica, Estado de California, Estados Unidos de América.

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTA, D.C. 21 NOV 2006

(FORMA P 10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-117696- -00000-0000
Fec: 2006-11-21 16:14:46 Dep: 2020 NUECREACIONE
Tra: 11 PATENTEIYII
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 421

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL 22-Nov-06

(1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)	Nombre: **AGENSYS, INC.** Dirección: 1545-17th Street, Santa Monica, CA 90404, Estados Unidos de América. Nacionalidad o Domicilio:Santa Monica, Estado de California, Estados Unidos de América. Lugar de Constitución: Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACIÓN** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número_____
(3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5°, Bogotá- Colombia Teléfono: 3264270 Fax: 6069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual_____ Número 39.690.713 TP 53.215
(4) INVENTOR(ES) (72)	Nombre: JAKOBOVITS, Aya; ETESSAMI, Soudabeh; CHALLITA-EID, Pia, M.; PEREZ-VILLAR, Juan, J.; MORRISON, Karen, J.; JIA, Xiao-Chi; FARIS, Mary; GUDAS, Jean y RAITANO, Arthur, B. Dirección: 3135 Hutton Drive, Beverly Hills, CA 90210; 18336 Collins St., Tarzana, CA 91358; 15745 Morrison Street, Encino, CA 91436; 12424 Texas Avenue, Los Angeles, CA 90025; 1044 Yale Street, Santa Monica, CA 90403; 2262 Beverly Drive, Los Angeles, CA 90034; 2538 Almaden Court, Los Angeles, CA 90077; 17157 Palisades Circle, Pacific Palisades, CA 90272 y 12685 Rose Avenue, Los Angeles, CA 90066. Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.	

(5) PCT (86)
Solicitud Internacional No. PCT/US2004/012625 Fecha: 22/04/04
Publicación Internacional No. WO2005/113601 A2 Fecha: 01/12/05

(6) Título (54) ANTICUERPOS Y MÓLECULAS DERIVADAS DE ESTOS QUE SE ENLAZAN A LAS PROTEINAS DE STEAP-1

(7) Clasificación Internacional (51) C07K 16/00

(8) Prioridad SI ☐ NO ☒	(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud

(9) Comprobante de Pago No. 06-85.562 **Fecha:** 3 de Noviembre de 2006

(10) ANEXOS

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- [ ] Documento de Representación Legal
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- [ ] Declaraciones
- [ ] Copia de la solicitud internacional (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano (resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- [ ] Copia del examen preliminar internacional sobre patentabilidad
- [ ] Traducción del examen preliminar internacional sobre patentabilidad
- [ ] De ser el caso copia del contrato de acceso
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- [ ] Arte Final 12X12
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- [x] Otros Publicación con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción, Anexo Explicativo de Modificaciones a las Reivindicaciones y listado de secuencias

(11) FIGURA CARACTERÍSTICA

(12) Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: ANGIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 38 880 713 Usaquén T.P. 53 215

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-117696- -00000-0000
Fec: 2006-11-21 16:14:46 Dep: 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEIYII
Eve: 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 421

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 85,562
FECHA : NOVIEMBRE 3 DE 2006

C O N S I G N A C I O N

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
[redacted]REDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	59137772	03/11/2006	10,539,000.00

C O N C E P T O

CANT.	NEMTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	30005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
		TOTAL : $	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

8

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud: 06 – 117696	(51) Int Cl: C07K 16/00
22) Fecha de solicitud: 21-11-06	(71)Solicitante(s) AGENSYS, INC.
(30) Prioridad (31) *No. Prioridad* 32) *Fecha* (33) *País*	(72) Inventor(es) JAKOBOVITS, Aya; ETESSAMI, Soudabeh; CHALLITA-EID, Pia, M.; PEREZ-VILLAR, Juan, J.; MORRISON, Karen, J.; JIA, Xiao-Chi; FARIS, Mary; GUDAS, Jean y RAITANO, Arthur, B.
	(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: *22-11-06* (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: *22-04-04* No. de solicitud *PCT/US2004/012625*	(87) Publicación Internacional Fecha: *01-12-05* N° publicación: *WO2005/113601 A2*

(54) Título: **ANTICUERPOS Y MOLECULAS DERIVADAS DE ESTOS QUE SE ENLAZAN A LAS PROTEINAS DE STEAP-1**

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un sitio de enlace de antígeno que se enlaza específicamente a la proteína STEAP-1 (SEQ ID NO:).

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

(43) Fecha de Publicación Internacional
01 de diciembre de 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/113601 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes[7]: C07K 16/00,

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2004/012625

(22) Fecha de Registro Internacional: 22 de Abril de 2004 (22.04.2004)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(71) Solicitante (Para todos los estados designados excepto Estados Unidos): AGENSYS, INC. [US/US]; 1545-17th Street, Santa Monica, CA 90404 (US).

(72) Inventor; e

(75) Inventor/solicitante: (para US solamente): JAKOBOVITS, Aya [US/US]; 3135 Hutton Drive, Beverly Hills, CA 90210 (US). ETESSAMI, Soudabeh [US/US]; 18336 Collins St., Tarzana, CA 91358 (US) CHATTERTA-EID, Pia, M. [LB/US]; 15745 Morrison Street, Encino, CA 91436 (US). PEREZ-VILLAR, Juan, J. [ES/US]; 12424 Texas, Avenue, Los Angeles, CA 90025 (US). MORRISON, Karen, J. [GB/US]; 1044 Yale Street, Santa Monica, CA 90403 (US). JIA, Xiao-Chi [US/US]; 2262 Beverly Drive, Los Angeles, CA 90034 (US). FARIS, Mary [US/US]; 2538 Almaden Court, Los Angeles, CA 90077 (US). GUDAS, Jean [US/US]; 17157 Palisades Circle, Pacific Palisades, CA 90272 (US). RAITANO, Arthur, B. [US/US]; 12685 Rose Avenue, Los Angeles, CA 90066 (US).

(74) Agente: BECKER, Daniel, M; HELLER EHRMAN WHITE & MCAULIFFE LLP, 275 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025-3506 (US).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección nacional requerida): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

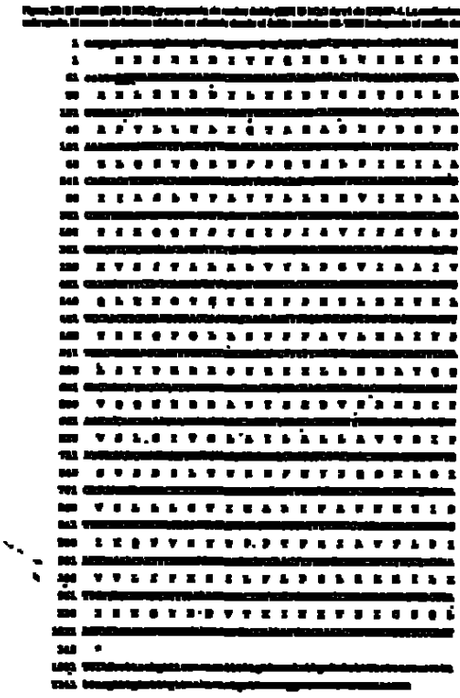
(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección regional requerida): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiatica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

- Sin *reporte de Búsqueda Internacional y para ser republicado al recibo de ese reporte.*

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54)Título: ANTICUERPOS Y MOLECULAS DERIVADAS DE ESTOS QUE SE ENLAZAN A LAS PROTEINAS DE STEAP-1



(57) Resumen: Se describen anticuerpos y moléculas derivadas de estos que se enlazan a la proteína de STEAP-1 novedosa, y variantes de la misma, en donde STEAP-1 exhibe expresión específica de tejido en tejido adulto normal, y está expresado aberrantemente en los cánceres listados en la tabla 1. En consecuencia, STEAP-1 provee un diagnóstico, pronóstico, objetivo profiláctico y/o terapéutico para el cáncer. El gen STEAP-1 o fragmento del mismo, o su proteína codificada o variantes del mismo, o un fragmento del mismo, se puede usar para elicitar una respuesta inmune humoral o celular; los anticuerpos o células T reactivas con STEAP-1 se pueden usar en la inmunización activa o pasiva.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
1 December 2005 (01.12.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/113601 A2

(51) International Patent Classification[7]: C07K 16/00

(21) International Application Number:
PCT/US2004/012625

(22) International Filing Date: 22 April 2004 (22.04.2004)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(71) Applicant (*for all designated States except US*): AGENSYS, INC. [US/US]; 1545-17th Street, Santa Monica, CA 90404 (US).

(72) Inventors; and

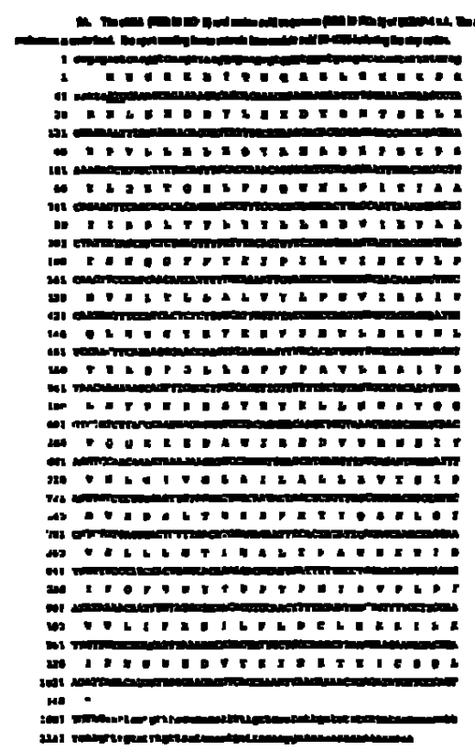
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): JAKOBOVITS, Aya [US/US]; 3135 Hutton Drive, Beverly Hills, CA 90210 (US). ETESSAMI, Soudabeh [US/US]; 18336 Collins St., tarzana, CA 91358 (US). CHALLITA-EID, Pia, M. [LB/US]; 15745 Morrison Street, Encino, CA 91436 (US). PEREZ-VILLAR, Juan, J. [ES/US]; 12424 Texas Avenue, Los Angeles, CA 90025 (US). MORRISON, Karen, J. [GB/US]; 1044 Yale Street, Santa Monica, CA 90403 (US). JIA, Xiao-Chi [US/US]; 2262 Beverly Drive, Los Angeles, CA 90034 (US). FARIS, Mary [US/US]; 2538 Almaden Court, Los Angeles, CA 90077 (US). GUDAS, Jean [US/US]; 17157 Palisades Circle, Pacific Palisades, CA 90272 (US). RAITANO, Arthur, B. [US/US]; 12685 Rose Avenue, Los Angeles, CA 90066 (US).

(74) Agent: BECKER, Daniel, M.; HELLER EHRMAN WHITE & MCAULIFFE LLP, 275 Middlefield Road, Menlo Park, CA 94025-3506 (US).

(81) Designated States (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,

[Continued on next page]

(54) Title: ANTIBODIES AND MOLECULES DERIVED THEREFROM THAT BIND TO STEAP-1 PROTEINS



(57) Abstract: Antibodies and molecules derived therefrom that bind to novel STEAP-1 protein, and variants thereof, are described wherein STEAP-1 exhibits tissue specific expression in normal adult tissue, and is aberrantly expressed in the cancers listed in Table I. Consequently, STEAP-1 provides a diagnostic, prognostic, prophylactic and/or therapeutic target for cancer. The STEAP-1 gene or fragment thereof, or its encoded protein, or variants thereof, or a fragment thereof, can be used to elicit a humoral or cellular immune response; antibodies or T cells reactive with STEAP-1 can be used in active or passive immunization.

WO 2005/113601 A2

MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION

8

REIVINDICACIONES:

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un sitio de enlace de antígeno que se enlaza específicamente a la proteína STEAP-1 (SEQ ID NO:).

2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es designado X92.1.30.1.1 (1) y se le asignó un número de Acceso A.T.C.C. No.: PTA-5802.

4. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es designado X120.545.1.1 y se le asignó un número de Acceso A.T.C.C. No.: PTA-5803.

5. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.

6. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el fragmento es un fragmento Fab, $F(ab')_2$, o Sfv.

7. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.

8. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el sitio de enlace de antígeno es un dominio de enlace de antígeno murino.

9. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, que se produce recombinantemente.

10. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 9, en donde la proteína recombinante comprende la región de enlace a antígeno.

11. El anticuerpo o fragmento de la reivindicacións 1, en donde el anticuerpo está acoplado a un marcador detectable, una toxina, o un agente terapéutico.

12. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 11, en donde el marcador

10

detectable es un radioisótopo, un quelante de metal, una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminescente o un compuesto quimioluminescente.

13. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 12, en donde el radioisótopo comprende ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{211}At, ^{125}i, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{213}Bi, ^{32}P, o Lu.

14. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 11, en donde la toxina comprende ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorubicina, un maitansinoide, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, dihidroxi antracin diona, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, glucocorticoide, auristatina, auromicina, itrio, bismuto, combrestatina, duocarmicinas, dolostatina, cc1065, o un cisplatino.

15. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el sitio de enlace a antígeno se enlaza específicamente a un epítopo dentro de los amino ácidos de una proteína de la Figura 2 (SEQ ID NO:).

16. Un animal transgénico que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2.

17. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2.

18. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la reivindicación 2.

19. El vector de la reivindicación 18 que es de cadena sencialla, que comprende dominios variables de cadenas pesadas y ligeras.

20. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 en una forma de dosis de unidad humana.

21. Un ensayo para detectar la presencia de una proteína STEAP-1 en una muestra biológica, que comprende contactar la muestra con un anticuerpo de la

reivindicación 1, y detectar el enlace de la proteína STEAP-1 (SEQ ID NO:) en la muestra.

22. Un método para inhibir el crecimiento de células que expresan STEAP-1 (SEQ ID NO:) en un sujeto, que comprende: administrar a dicho sujeto un vector que codifica un anticuerpo monoclonal de cadena sencilla, que comprende los dominios variables de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal que se enlaza específicamente a una proteína STEAP-1, de forma que el vector libera la secuencia de codificación del anticuerpo monoclonal de cadena sencilla a las células de cáncer y el anticuerpo de cadena sencilla codificado es expresado celularmente allí.

23. Un método para liberar un agete citotóxico o un agente de diagnóstico a una célula que expresa una proteína STEAP-1 (SEQ ID NO:), que comprende:

proveer un agente citotóxico o un agente de diagnóstico conjugado con el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, para formar un conjugado anticuerpo-agente o fragmento-agente; y,

exponer la célula al conjugado anticuerpo-agente o fragmento-agente.

24. El método de la reivindicación 23, en donde el agente citotóxico o el agente de diagnóstico es seleccionado del grupo que consiste de un marcador detectable, una toxina, y un agente terapéutico.

25. El método de la reivindicación 24, en donde el marcador detectable es un radioisótopo, un quelante de metal, una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminescente o un compuesto quimioluminescente.

26. El método de la reivindicación 25, en donde el radioisótopo comprende ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, ^{188}Re, ^{211}At, ^{125}I, ^{186}Re, ^{153}Sm, ^{213}Bi, ^{32}P, o Lu.

27. El método de la reivindicación 24, en donde la toxina comprende ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorubicina, un maitansinoide, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, dihidroxi antracin diona, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*,

glucocorticoide, auristatina, auromicina, itrio, bismuto, combrestatina, duocarmicinas, dolostatina, cc1065, o un cisplatino.

28. Un método para detectar una proteína STEAP-1 (SEQ IDNO:) en una muestra biológica, que comprende los pasos de:

proveer la muestra biológica y una muestra de control;

contactar la muestra biológica y la muestra de control con el anticuerpo de la reivindicación 1 que se enlaza específicamente a la proteína STEAP-1; y

determinar una cantidad de un complejo de la sustancia con la proteína STEAP-1 y el anticuerpo presente en la muestra biológica y la muestra de control.

29. El método de la reivindicación 28 que además comprende:

tomar la muestra biológica y la muestra de control de un paciente que tiene o es sospechoso de tener un cáncer listado en la Tabla I.

30. Una composición que comprende siARN de STEAP-1 (ARN decatenario) que corresponde al ácido nucleico que codifica una proteína indicada en la Figura 2 o una subsecuencia de la misma, en donde la subsecuencia es de 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de ARN contiguos de longitud y contiene las secuencias que son complementarias y no complementarias a al menos una porción de la secuencia que codifica mARN.

31. Un método para identificar una molécula que modula la proliferación celular, que comprende:

(a) introducir una molécula en un sistema que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de:

(i) la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO:1;

(ii) una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que consiste de la secuencia de amino ácido indicada en la Figura 3;

(iii) una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que es 90% o más idéntico a la secuencia de amino ácido indicada en la Figura 3; y

(iv) un fragmento de una secuencia de nucleótido de (i), (ii), o (iii); o introducir una molécula de prueba a un sistema que comprende una proteína codificada por una secuencia de nucleótido de (i), (ii), (iii), o (iv); y

(b) determinar la presencia o ausencia de una interacción entre la molécula y la secuencia de nucleótido o proteína,

por medio de la cual la presencia de una interacción entre la molécula y la secuencia de nucleótido o proteína identifica la molécula como una molécula que modula la proliferación celular.

32. El método de la reivindicación 31, en donde el sistema es *in vivo*.

33. El método de la reivindicación 31, en donde el sistema es *in vitro*.

34. El método de la reivindicación 31, en donde la molécula comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a la proteína codificada por la secuencia de nucleótido de (i), (ii), (iii), o (iv).

35. El método de la reivindicación 31, en donde la molécula es una composición que comprende siARN de STEAP-1 (ARN decatenario) que corresponde al ácido nucleico que codifica una proteína indicada en la Figura 2 o una subsecuencia de la misma, en donde la subsecuencia es de 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de ARN contiguos de longitud y contiene las secuencias que son complementarias y no complementarias a al menos una porción de la secuencia que codifica mARN.

36. Un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una molécula identificada mediante el método de la reivindicación 31, a un sujeto diagnosticado con cáncer, mediante el cual la molécula inhibe o retarda el cáncer en un sujeto.

37. El método de la reivindicación 36, en donde el cáncer es un cánces establecido en la Tabla I.

38. Un método para identificar un terapéutico para tratar un cáncer listado en la Tabla I, que comprende:

(a) introducir una molécula en un sistema que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótido seleccionada del grupo que consiste de:

(i) la secuencia de nucleótido de SEQ ID NO:1;

(ii) una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que consiste de la secuencia de amino ácido indicada en la Figura 3;

(iii) una secuencia de nucleótido que codifica un polipéptido que es 90% o más idéntico a la secuencia de amino ácido indicada en la Figura 3; y

(iv) un fragmento de una secuencia de nucleótido de (i), (ii), o (iii); o introducir una molécula de prueba a un sistema que comprende una proteína codificada por una secuencia de nucleótido de (i), (ii), (iii), o (iv); y

(b) determinar la presencia o ausencia de una interacción entre la molécula y la secuencia de nucleótido o proteína,

por medio de la cual la presencia de una interacción entre la molécula y la secuencia de nucleótido o proteína identifica la molécula como un terapéutico para tratar el cáncer de un tejido listado en la Tabla I.

39. El método de la reivindicación 38, en donde el sistema es *in vitro*.

40. El método de la reivindicación 38, en donde el sistema es *in vivo*.

41. El método de la reivindicación 38, en donde la molécula comprende un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que se enlaza específicamente a la proteína codificada por la secuencia de nucleótido de (i), (ii), (iii), o (iv).

42. El método de la reivindicación 38, en donde la molécula es una composición que comprende siARN de STEAP-1 (ARN decatenario) que corresponde al ácido nucleico que codifica una proteína indicada en la Figura 2 o una subsecuencia de la misma, en donde la subsecuencia es de 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de ARN contiguos de longitud y contiene las

secuencias que son complementarias y no complementarias a al menos una porción de la secuencia que codifica mARN.

43. Un método para tratar un cáncer en un sujeto, que comprende administrar una molécula identificada mediante el método de la reivindicación 38, a un sujeto diagnosticado con cáncer, mediante el cual la molécula inhibe o retarda el cáncer en un sujeto.

44. El método de la reivindicación 43, en donde el cáncer es un cáncer establecido en la Tabla I.

CLAIMS:

1. An antibody or fragment thereof comprising an antigen binding site that binds specifically to STEAP-1 protein (SEQ ID NO:).

2. The antibody or fragment of claim 1, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

3. The antibody or fragment of claim 2, wherein the antibody is designated X92.1.30.1.1(1) and assigned A.T.C.C. Accession No.: PTA-5802.

4. The antibody or fragment of claim 2, wherein the antibody is designated X120.545.1.1 and assigned A.T.C.C. Accession No.: PTA-5803.

5. The antibody or fragment of claim 2, wherein the monoclonal antibody is a humanized antibody.

6. The antibody or fragment of claim 1, wherein the fragment is an Fab, $F(ab')_2$, Fv or Sfv fragment.

7. The antibody or fragment of claim 1, wherein the antibody is a human antibody.

8. The antibody or fragment of claim 1, wherein the antigen binding site is a murine antigen binding domain.

9. The antibody or fragment of claim 1, which is recombinantly produced.

10. The antibody or fragment of claim 9, wherein the recombinant protein comprises the antigen binding region.

11. The antibody or fragment of claims 1, wherein the antibody is coupled to a detectable marker, a toxin, or a therapeutic agent.

12. The antibody or fragment of claim 11, wherein the detectable marker is a radioisotope, a metal chelator, an enzyme, a fluorescent compound, a bioluminescent compound or a chemiluminescent compound.

13. The antibody or fragment of claim 12, wherein the radioisotope comprises ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{211}At, ^{125}I, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{213}Bi, ^{32}P, or Lu.

14. The antibody or fragment of claim 11, wherein the toxin comprises ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, a maytansinoid, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy anthracin dione, actinomycin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, *sapaonaria officinalis* inhibitor, glucocorticoid, auristatin, auromycin, yttrium, bismuth, combrestatin, duocarmycins, dolostatin, cc1065, or a cisplatin.

16

15. The antibody or fragment of claim 1, wherein the antigen binding site specifically binds to an epitope within amino acids of a protein in Figure 2 (SEQ ID NO:).

16. A transgenic animal that produces the monoclonal antibody of claim 2.

17. A hybridoma that produces the monoclonal antibody of claim 2.

18. A vector comprising a polynucleotide encoding an antibody of claim 2.

19. The vector of claim 18 that is a single-chain comprising variable domains of heavy and light chains.

20. A pharmaceutical composition that comprises the antibody or fragment of claim 1 in a human unit dose form.

21. An assay for detecting the presence of a STEAP-1 protein in a biological sample comprising contacting the sample with an antibody of claim 1, and detecting the binding of STEAP-1 protein (SEQ ID NO:) in the sample.

22. A method of inhibiting growth of cells that express STEAP-1 (SEQ ID NO:) in a subject, comprising:

administering to said subject a vector encoding a single chain monoclonal antibody that comprises the variable domains of the heavy and light chains of a monoclonal antibody that specifically binds to a STEAP-1 protein, such that the vector delivers the single chain monoclonal antibody coding sequence to the cancer cells and the encoded single chain antibody is expressed intracellularly therein.

23. A method of delivering a cytotoxic agent or a diagnostic agent to a cell that expresses a STEAP-1 protein (SEQ ID NO:), comprising:

providing a cytotoxic agent or a diagnostic agent conjugated to the antibody or fragment of claim 1, to form an antibody-agent or fragment-agent conjugate; and,

exposing the cell to the antibody-agent or fragment-agent conjugate.

24. The method of claim 23, wherein the cytotoxic agent or the diagnostic agent is selected from the group consisting of a detectable marker, a toxin, and a therapeutic agent.

25. The method of claim 24, wherein the detectable marker is a radioisotope, a metal chelator, an enzyme, a fluorescent compound, a bioluminescent compound or a chemiluminescent compound.

26. The method of claim 25, wherein the radioisotope comprises ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{211}At, ^{125}I, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{213}Bi, ^{32}P, or Lu. .

27. The method of claim 24, wherein the toxin comprises ricin, ricin A-chain, doxorubicin, daunorubicin, a maytansinoid, taxol, ethidium bromide, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, dihydroxy

18

anthracin dione, actinomycin, diphtheria toxin, Pseudomonas exotoxin (PE) A, PE40, abrin, abrin A chain, modeccin A chain, alpha-sarcin, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, enomycin, curicin, crotin, calicheamicin, *sapaonaria officinalis* inhibitor, glucocorticoid, auristatin, auromycin, yttrium, bismuth, combrestatin, duocarmycins, dolostatin, cc1065, or a cisplatin.

28. A method for detecting a STEAP-1 protein (SEQ ID NO:) in a biological sample, comprising steps of:

providing the biological sample and a control sample;

contacting the biological sample and the control sample with the antibody of claim 1 that specifically binds to the STEAP-1 protein; and

determining an amount of a complex of the substance with the STEAP-1 protein and the antibody present in the biological sample and the control sample.

29. The method of claim 28 further comprising:

taking the biological sample and the control sample from a patient who has or who is suspected of having a cancer listed in Table I.

30. A composition comprising STEAP-1 siRNA (double stranded RNA) that corresponds to the nucleic acid that encodes a protein set forth in Figure 2 or a subsequence thereof, wherein the subsequence is 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 contiguous RNA nucleotides in length and contains sequences that are complementary and non-complementary to at least a portion of the mRNA coding sequence.

31. A method for identifying a molecule that modulates cell proliferation, which comprises:

(a) introducing a molecule to a system which comprises a nucleic acid comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1;

(ii) a nucleotide sequence which encodes a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in Figure 3;

(iii) a nucleotide sequence which encodes a polypeptide that is 90% or more identical to the amino acid sequence set forth in Figure 3; and

(iv) a fragment of a nucleotide sequence of (i), (ii), or (iii); or introducing a test molecule to a system which comprises a protein encoded by a nucleotide sequence of (i), (ii), (iii), or (iv); and

(b) determining the presence or absence of an interaction between the molecule and the nucleotide sequence or protein,

whereby the presence of an interaction between the molecule and the nucleotide sequence or protein identifies the molecule as a molecule that modulates cell proliferation.

32. The method of claim 31, wherein the system is *in vivo*.

33. The method of claim 31, wherein the system is *in vitro*.

18

34. The method of claim 31, wherein the molecule comprises an antibody or antibody fragment that specifically binds the protein encoded by the nucleotide sequence of (i), (ii), (iii), or (iv).

35. The method of claim 31, wherein the molecule is a composition comprising STEAP-1 siRNA (double stranded RNA) that corresponds to the nucleic acid that encodes a protein set forth in Figure 2 or a subsequence thereof, wherein the subsequence is 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 contiguous RNA nucleotides in length and contains sequences that are complementary and non-complementary to at least a portion of the mRNA coding sequence.

36. A method for treating a cancer in a subject, which comprises administering a molecule identified by the method of claim 31 to a subject diagnosed with cancer, whereby the molecule inhibits or retards a cancer in the subject.

37. The method of claim 36, wherein the cancer is a cancer set forth in Table I.

38. A method for identifying a therapeutic for treating a cancer listed in Table I, which comprises:

(a) introducing a molecule to a system which comprises a nucleic acid comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(i) the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1;

(ii) a nucleotide sequence which encodes a polypeptide consisting of the amino acid sequence set forth in Figure 3;

(iii) a nucleotide sequence which encodes a polypeptide that is 90% or more identical to the amino acid sequence set forth in Figure 3; and

(iv) a fragment of a nucleotide sequence of (i), (ii), or (iii); or introducing a test molecule to a system which comprises a protein encoded by a nucleotide sequence of (i), (ii), (iii), or (iv); and

(b) determining the presence or absence of an interaction between the molecule and the nucleotide sequence or protein,

whereby the presence of an interaction between the molecule and the nucleotide sequence or protein identifies the molecule as a therapeutic for treating a cancer of a tissue listed in Table I.

39. The method of claim 38, wherein the system is *in vitro*.

40. The method of claim 38, wherein the system is *in vivo*.

41. The method of claim 38, wherein the molecule comprises an antibody or antibody fragment that specifically binds the protein encoded by the nucleotide sequence of (i), (ii), (iii), or (iv).

42. The method of claim 38, wherein the molecule is a composition comprising STEAP-1 siRNA (double stranded RNA) that corresponds to the nucleic acid that encodes a protein set forth in Figure 2 or a subsequence thereof, wherein the subsequence is 19, 20, 21, 22, 23, 24, or 25 contiguous RNA nucleotides in length and contains sequences that are complementary and non-complementary to at least a portion of the mRNA coding sequence.

10

19

43. A method for treating a cancer in a subject, which comprises administering a molecule identified by the method of claim 38 to a subject diagnosed with cancer, whereby the molecule inhibits or retards a cancer in the subject.

44. The method of claim 43, wherein the cancer is a cancer set forth in Table I.

21

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Articulo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capitulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

ANTICUERPOS Y MOLECULAS DERIVADAS DE ESTOS QUE SE ENLAZAN A LAS PROTEINAS DE STEAP-1

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

Se describen anticuerpos y moléculas derivadas de estos que se enlazan a la proteína de STEAP-1 novedosa, y variantes de la misma, en donde STEAP-1 exhibe expresión específica de tejido en tejido adulto norma, y está expresado aberrantemente en los cánceres listados en la tabla 1. En consecuencia, STEAP-1 provee un diagnóstico, pronóstico, objetivo profiláctico y/o terapéutico para el cáncer. El gen STEAP-1 o fragmento del mismo, o su proteína codificada o variantes del mismo, o un fragmento del mismo, se puede usar para elicitar una respuesta inmune humoral o celular; los anticuerpos o células T reactivas con STEAP-1 se pueden usar en la inmunización activa o pasiva.

ANTICUERPOS Y MOLECULAS DERIVADAS DE ESTOS QUE SE ENLAZAN A LAS PROTEINAS DE STEAP-1

DECLARACION DE DERECHOS A INVENCIONES HECHAS BAJO LA INVESTIGACION PATROCINADA DEFERALMENTE

No aplicable.

CAMPO DE LA INVENCION

La invención descrita aquí se relaciona con anticuerpos, así como com fragmentos de enlace de los mismos y moléculas diseñadas de ellos, que se enlazan a proteínas, llamadas STEAP-1. La invención se relaciona además con métodos de diagnóstico, pronóstico, profilácticos y terapéuticos y las composiciones útiles en el tratamiento de cánceres que expresan STEAP-1.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

El cáncer es la segunda causa líder de la muerte humana después de la enfermedad coronaria. Mundialmente, millones de personas mueren de cáncer cada año. Solo en los Estados Unidos, como lo reporta la Sociedad de Cáncer Americana, el cáncer produce la muerte de más de medio millón de personas anualmente, con más de 1.2 millones de casos nuevos diagnosticados por año. Aunque las muertes por enfermedad cardiaca han disminuido significativamente, las producidas por cáncer generalmente están en aumento. En la primera parte del siguiente siglo, se predice que el cáncer se vuelva la cause líder de muerte.

Mundialmente, varios cánceres se destacan como asesinos líderes. En particular, los carcinomas del pulmón, próstata, seno, colon, páncreas, ovario, y vejiga representan las causas primarias de muerte por cáncer. Estos y virtualmente otros carcinomas comparten una característica letal común. Con muy pocas excepciones, la enfermedad metastásica de un carcinoma es fatal. Más aún, incluso para aquellos pacientes con cáncer que inicialmente sobreviven a sus cánceres, la experiencia común ha mostrado que sus vidas son alteradas dramáticamente. Muchos pacientes con cáncer experimentan ansiedades fuertes llevadas por la conciencia del potencial de recurrencia o falla del tratamiento. Muchos pacientes con cáncer experimentan debilitamiento

físico después del tratamiento. Adicionalmente, muchos pacientes con cáncer experimentan una recaída.

Mundialmente, el cáncer de próstata es el cuarto cáncer más frecuente en hombres. En América del Norte y Europa del Norte, es de lejos el cáncer más común en hombres y es la segunda causa líder de muerte por cáncer en hombres. En los Estados Unidos, más de 30,000 hombres mueren anualmente de esta enfermedad – segundada solamente al cáncer pulmonar. A pesar de la magnitud de estas cifras, aún no hay tratamiento efectivo para el cáncer de próstata metastásico. La prostatectomía quirúrgica, terapia de radiación, terapia de ablación hormonal, la castración quirúrgica y la quimioterapia continúan siendo las modalidades de tratamiento principales. Desafortunadamente, estos tratamientos no son efectivos para muchos y usualmente asociados con consecuencias indeseables.

En el frente de diagnóstico, la falta de un marcador de tumor de próstata que pueda detectar en forma precisa tumores localizados en estado temprano sigue siendo una limitación significativa en el diagnóstico y manejo de esta enfermedad. Aunque el ensayo de antígeno específico de próstata en suero (PSA) ha sido una herramienta muy útil, su especificidad y utilidad general, sin embargo, es considerada ampliamente como carente de varios aspectos importantes.

El progreso en la identificación de marcados específicos adicionales para el cáncer de próstata se ha mejorado mediante la generación de xenoinjertos de cáncer de próstata que pueden recapitular diferentes estados de la enfermedad en ratones. Los xenoinjertos de LAPC (Los Angeles Prostate Cancer) son xenoinjertos de cáncer de próstata que han sobrevivido el paso en ratones deficientes inmunes deficientes combinados (SCID) y han exhibido la capacidad de imitar la transición de andrógeno dependencia a andrógeno independencia (Klein *et al.*, 1997, Nat. Med. 3: 402). Los marcadodes de cáncer de próstata identificados más recientemente incluyen PCTA-1 (Su *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7252), antígeno de membrana específico de próstata (PSM) (Pinto *et al.*, Clin Cancer Res 1996 Sep 2 (9): 1445-51), STEAP (Hubert, *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA. 1999 Dic 7; 96(25):14523-8) y antígeno de célula troncal de próstata (PSCA) (Reiter *et al.*, 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1735).

Aunque los marcadores identificados previamente, tales como PSA, PSM, PCTA y PSCA han facilitado los esfuerzos para diagnosticar y tartar el cáncer de próstata, existe una necesidad para la identificación de marcadores adicionales y objetivos terapéuticos para los cánceres de próstata y relacionados con el fin de mejorar más el diagnóstico y la terapia.

El carcinoma celular renal (RCC) asciende a aproximadamente el 3 porciento de las malignancias de adultos. Una vez los adenomas alcanzan un diámetro de 2 a 3 cm existe una malignancia potencial. En el adulto, los dos tumours renales malignos principales son el adenocarcinoma de célula renal y el carcinoma de célula de transición de la pelvis renal o uréter. La incidencia del adenocarcinoma celular renal en más de 29,000 casos en los Estados Unidos, y más de 11,600 pacientes murieron por esta enfermedad en 1998. El carcinoma cellular de transición es menos frecuente, con una incidencia de aproximadamente 500 casos al año en los Estados Unidos.

La cirujía ha sido la terapia primaria para el adenocarcinoma celular renal por muchas décadas. Hasta recientemente, la enfermedad metastásica no ha respondida a ninguna terapia sistémica. Con desarrollos recientes en teraplas sistémicas, particularlmente inmunoterapias, el carcinoma celular renal metastásico puede ser enfocado agresivamente en pacientes apropiados con una posibilidad de respuestas duraderas. Sin embargo, permanence una necesidad de terapias efectivas para estos pacientes.

De todos los casos nuevos de cáncer en los Estados Unidos, el cáncer de vejoga representa aproximadamente 5 por ciento en hombres (quinto neoplasma más común) y 3 por ciento en mujeres (octavo neoplasma más común). La incidencia está aumentando lentamente, concurrente con una población mayor en aumento. En 1998, se estimó en 54,500 casos, incluyendo 39,500 en hombres y 15,000 en mujeres. La incidencia ajustada a la edad en los Estados Unidos es de 32 por 100,000 para hombres y ocho por 100,000 en mujeres. La proporción histórica hombre/mujer de 3:1 puede disminuir con relación con los patrones de fumadores en mujeres. Hubo un estimado de 11,000 muertes de cáncer de vejoga en 1998 (7,800 en hombres y 3,900 en mujeres). La incidencia y mortalidad del cáncer de vejiga aumenta fuertemente con la edad y será un problema en aumento en la medida en que la población se vuelve más anciana.

La mayoría de los cánceres de vejiga vuelven a aparecer en la vejiga. El cáncer de vejiga es manejado con una combinación de resección transuretral de la vejiga (TUR) y quimioterapia intravesical o inmunoterapia. La naturaleza multifocal y recurrente del cáncer de vejiga señala las limitaciones del TUR. La mayoría de los cánceres invasivos a músculos no son curados solamente por TUR. La cistectomía radical y la diversión urinaria es el medio más efectivo para eliminar el cáncer pero carga un impacto innegable en la función urinaria y sexual. Continúa siendo una necesidad significativa las modalidades de tratamiento que sean benéficas para los pacientes con cáncer de vejiga.

Un estimado de 130,200 casos de cáncer colorrectal se presentaron en el 2000 en los Estados Unidos, incluyendo 93,800 casos de cáncer de colon y 36,400 de cáncer rectal. Los cánceres colorrectales son los terceros cánceres más comúnes en hombres y mujeres. Las proporciones de indidencia disminuyeron significativamente durante 1992-1996 (-2.1 % por año). La investigación sugiere que estas disminuciones se han debido a la selección aumentada y removión de pólipos, evitando la porgresión de pólipos a cánceres invasivos. Hubo un estimado de 56,300 muertes (47,700 de cáncer de colon, 8,600 de cáncer rectal) en 2000, sumando aproximadamente 11% de todas las muertes por cáncer en U.S.

Actualmente, la cirujía es la forma más común de terapia para el cáncer colorrectal, y para cánceres que no se han diseminado, esto es frecuentemente curativo. La quimioterapia, o quimioterapia más radiación, se administra antes o después de la cirujía a la mayoría de pacientes cuyo cáncer ha perforado profundamente la pared intestinal o se ha diseminado a las gándulas linfáticas. Una colostomía permanente (creación de una abertura abdominal para eliminación de desechos corporales) es ocasionalmente necesaria para el cáncer de colon y es poco frecuente que sea requerida para el cáncer rectal. Continúa una necesidad de modalidades efectivas de diagnóstico y tratamiento para el cáncer colorrectal.

Hubo un estimado de 164,100 casos nuevos de cáncer pulmonary y bronquial en 2000, sumando el 14% de todos los diagnósticos de cáncer en U.S.. La proporción de incidencia de cáncer pulmonary y bronquial está disminuyendo significativamente en hombres, de un alto de 85.6 por 100,000 en 1984 a 70.0 en 1996. En los 1990s, la proporción de aumento entre mujeres empezó a disminuir. En 1996, la proporción de incidencia en mujeres fue de 42.3 por 100,000.

El cáncer pulmonar y bronquial produjo un estimado de 156,900 muertes en 2000, sumando el 28% de todas las muertes por cáncer. Durante 1992-1996, la mortalidad del cáncer pulmonary disminuyó significativamente entre hombres (-1.7% por año) mientras que las proporciones para mujeres fueron aún significativamente en aumento (0.9% por año). Desde 1987, más mujeres han muerto cada año de cáncer pulmonary que de cáncer de seno, los que, por más de 40 años, fue la causa de muerte por cáncer en las mujeres. La incidencia en descenso de cáncer pulmonary y las tasas de mortalidad se produjo más probablemente por las tasas de fumadores reducidas durante los 30 años anteriores; sin embargo, los patrones de fumadores en descenso entre mujeres estaba retrasado con respecto al de los hombres. Preocupantemente, aunque el descenso del uso del tabaco en adultos se ha vuelto más lento, el uso del tabaco en la juventud está aumentando de nuevo.

Las opciones de tratamiento para el cáncer pulmonar o bronquial son determinadas por el tipo y estado del cáncer e incluyen cirujía, terapia de radiación y quimioterapia. Para muchos cánceres localizados, la cirujía es ususalmente el tratamiento de elección. Como la enfermedad usualmente se ha diseminado en el tiempo, se descrubre que la terapia de radiación y quimioterapia son usualmente necesarias en combinación con la cirujía. La quimioterapia sola o combinada con la radiación es el tratamiento de elección para el cáncer pulmonar de célula pequeña; en este régimen, un gran porcentaje de pacientes experimentan remisión, que en algunos casos es de larga duración. Sin embargo, existe una necesidad en curso de tratamiento efectivo y criterios de diagnóstico para los cánceres pulmonar y bronquial.

Se esperaba que un estimado de 182,800 nuevos casos invasivos de cáncer de seno ocurrieran en los Estados Unidos durante el 2000. Adicionalmente, cerca de 1,400 nuevos casos de cáncer se seno se esperaba fueran diagnosticados en hombres en el 2000. Después de aumentar aproximadamente 4% por año en los 1980s, las porporciones de incidencia de cáncer de seno en mujeres se ha estabilizado en los 1990s a aproximadamente 110.6 casos por 100,000.

Solo en los U. S., hubo un estimado de 41,200 muertes (40,800 mujeres, 400 hombres) en 2000 debido al cáncer de seno. El cáncer de seno se clasifica como segundo entre las muertes por cáncer en mujeres. De acuerdo con los datos más recientes, las tasas de mortalidad disminuyeron significativamente

durante 1992-1996 con las disminuciones más grandes en mujeres más jovenes, tanto blancas como negras. Estas disminuciones fueron probablemente el resultado de la detección temprana y tratamiento mejorado.

Teniendo en cuenta las circunstancias médicas y las preferencias del paciente, el tratamiento de cáncer de seno puede incolucrar nodulectomía (remoción local del tumor) y remoción de las glándulas linfáticas debajo del brazo; mastectomía (remoción quirúrgica del seno) y remoción de las glándulas linfáticas debajo del brazo; terapia de radiación; quimioterapia; o terapia de hormonas. Usualmente se usan dos o más métodos en combinación. Numerosos estudios han mostrado que, para la enfermedad en estado temprano, las tasas de supervivencia a largo plazo después de nodulectomía más radioterapia son similares a las tasas de supervivencia después de la mastectomía radical modificada. Avances significativos en técnicas de reconstrucción proveen varias opciones para la reconstrucción del seno después de la mastectomía. Recientemente, tal reconstrucción se ha hecho al mismo tiempo que la mastectomía.

La extirpación local del carcinoma ductal *in situ* (DCIS) con cantidades adecuadas de tejido de seno normal circundante puede evitar la recurrencia local del DCIS. La radiación del seno y/o el tamoxifeno puede reducer la posibilidad que aparezca DCIS en el tejido de seno restante. Esto es importante porque el DCIS, si permanence sin tratar, puede dessarrollar cáncer de seno invasivo. Sin embargo, existen efectos secundarios serios o secuelas a estos tratamientos. Por lo tanto existe una necesidad de tratamientos de cáncer de seno efectivos.

Hubo un estimado de 23,100 nuevos casos de cáncer de ovario en los Estados Unidos en el 2000. Suma el 4% de todos los cánceres entre mujeres y se clasifica secundo entre los cánceres ginecológicos. Durante 1992-1996, las tasas de incidencia de cáncer de ovario fueron significativamente en descenso. Consecuente con el cáncer de ovario, hubo un estimado de 14,000 muertes en el 2000. El cáncer de ovario produce más muertes que cualquier otro cáncer del sistema reproductor femenino.

La cirujía, terapia de radiación, y quimioterapia son opciones de tratamiento para el cáncer de ovario. La cirujía usualmente incluye la remoción de uno o ambos ovarios, las trompas de Falopio (salpingo-ooforectomía), y el útero (histerectomía). En algunos tumores muy tempranos, solamente el ovario

involucrado será removido, especialmente en mujeres jóvenes que desean tener hijos. En estado avanzado, se hace un intento para remover toda la enfermedad intra-abdominal para mejorar el efecto de la quimioterapia. Continúa siendo una necesidad importante opciones de tratamiento efectivas para cáncer de ovario.

Hubo un estimado de 28,300 casos nuevos de cáncer pancreático en los Estados Unidos en 2000. Durante los pasados 20 años, las tasas de cáncer pancreático han disminuido en los hombres. Las tasas entre mujeres han permanecido aproximadamente constantes pero pueden empezar a decliner. El cancer pancreático produjo un estimado de 28,200 muertes en el 2000 en los Estados Unidos. Durante los pasados 20 años, ha habido una disminución ligera pero significativa en las tasas de mortalidad entre hombres (aproximadamente -0.9% por año) mientras que las tasas han aumentado ligeramente entre mujeres.

La cirujía, terapia de radiación, y quimioterapia son las opciones de tratamiento para el cáncer pancreático. Estas opciones de tratamiento pueden extender la supervivencia y/o aliviar los síntomas en muchos pacientes pero no es probable que produzca una cura para la mayoría. Existe una necesidad significativa de opciones adicionales terapéuticas y diagnósticas para los cánceres. Estas incluyen el uso de anticuerpos, vacunas, y moléculas pequeñas como modalidades de tratamiento. Adicionalmente, también existe una necesidad de usar estas modalidades como herramientas de investigación para diagnosticar, detector, monitorear, y más, el estado de la técnica en todas las áreas del tratamiento y los estudios del cáncer.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La invención provee anticuerpos así como fragmentos de enlace de los mismos y moléculas diseñadas a partir de estos, que se enlazan a proteínas de STEAP-1 y fragmentos de polipéptido de proteínas de STEAP-1. Como se usa aquí, el término STEAP-1 es sinónimo de 8P1D4. La invención comprende anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos murinos y de otros mamíferos, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y totalmente humanos, y anticuerpos marcados con un marcados detectable o agente terapéutico. En ciertas realizaciones, hay una *condición* que la secuencia de ácido nucleico entera de la Figura 2 no está codificada y/o la secuencia de

amino ácido entera de la Figura 2 no está preparada. En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico entera de la Figura 2 está codificada y/o la secuencia de amino ácido entera de la Figura 2 está preparada, cualquiera de las cuales está en las formas de dosis unitarias humanas respectiva.

La invención provee además métodos para detector la presencia y estatus de polinucleótidos STEAP-1 y proteínas en varias muestras biológicas, asó como métodos para identificar células que expresan STEAP-1. Una realización de esta invención provee métodos para monitorear productos de gen STEAP-1 en un tejido o muestra de hematología que tiene o se sospecha que tiene alguna forma de desregulación de crecimiento tal como cáncer.

La invención provee además varias composiciones inmunogénicas o terapéuticas y estrategias para tartar cánceres que expresan STEAP-1 tales como los cánceres de tejidos listados en la Tabla I, incluyendo teraplas destinadas a inhibir la transcripción, translación, procesamiento o función de STEAP-1 así como vacunas para el cáncer. En un aspecto, la invención provee composiciones, y métodos que las comprenden, para el tratamiento de un cáncer que expresa STEAP-1 en un sujeto humano, en donde la composición comprende un vehículo adecuado para uso humano y una dosis de unidad humana de uno o más de un agente que inhibe la producción o función de STEAP-1. Preferiblemente, el vehículo es un vehículo unicamente humano. En otro aspecto de la invención, el agente es una mitad que es inmunoreactiva con la proteína STEAP-1. Ejemplos no limitantes de tales mitades incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos (tales como anticuerpos de cadena sencilla, monoclonales, policlonales, humanizados, quiméricos, o humanos), equivalentes funcionales de los mismos (que se encuentran naturalmente o sintéticos), y combinaciones de los mismos. Los anticuerpos pueden estar conjugados a una mitad de diangóstico o terapéutica. En otro aspecto, el agente es una molécula pequeña como se define aquí.

En otro aspecto, el agente comprende uno o más de un péptido que comprende un epítopo de linfocito T citotóxico (CTL) que se enlaza a una molécula de HLA clase I en un humano para elicitar una respuesta CTL a STEAP-1 y/o uno o más de un péptido que comprende un epítopo de linfocito T auxiliar (HTL) que se enlaza a una molécula HLA clase II en un humano para elicitar una respuesta HTL. Los péptidos de la invención pueden estar en las mismas o en una o más moléculas de péptido separadas. En un aspecto adicional de la invención, el agente comprende una o más de una molécula de

ácido nucleico que expresa uno o más péptidos que estimulan una respuesta de CTL o HTL como se describieron anteriormente. En aún otro aspecto de la invención, la una o más de una molécula de ácido nucleico puede expresar una mitad que es inmunológicamente reactiva como STEAP-1 como se describió anteriormente. La una o más de una molécula de ácido nucleico también puede ser, o codificar, una molécula que se inhibe la producción de STEAP-1. Ejemplos no limitantes de tales moléculas incluyen, pero no se limitan a, aquellas complementarias a una secuencia de nucleótido esencial para la producción de STEAP-1 (e. g., secuencias o moléculas en sentido contrario que forman una hélice triple con una hélice doble de nucleótido esencial para la producción de STEAP-1) o una ribozima efectiva para lisar el mRNA de STEAP-1.

Otra realización de la invención es epítopos de anticuerpo, que comprenden una región de péptido, o un oligonucleótido que codifica la región de péptido, que tiene una, dos, tres, cuatro o cinco de las siguentes características:

i) una región de péptido de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento de número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

ii) una región de péptido de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento de número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o menor de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, o que tiene un valor igual a 0.0, en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

iii) una región de péptido de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento de número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor a 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de Porcentaje de Residuos Accesibles de la Figura 7;

iv) una región de péptido de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento de número entero hasta la

longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8; o

v) una región de péptido de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento de número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de Giro Beta de la Figura 9.

La presente invención también se relaciona con un gen, designado STEAP-1, que se ha encontrado que está sobre-expresado en el(los) cáncer(es) listados en la Tabla I. El análisis de expresión de manchas al Norte de la expresión del gen STEAP-1 en tejidos normales muestra un patrón de expresión restringido en tejidos adultos. Se proveen las secuencias de nucleotido (Figura 2) y amino ácido (Figura 2, y Figura 3) de STEAP-1. El perfil relacionado con tejido de STEAP-1 en tejidos adiltos normales, combinado con la sobre-expresión observada en los tejidos listados en la Tabla I, muestra que el STEAP-1 está aberrantemente sobre-expresado en al menos algunos cánceres, y así sirve como un objetivo útil de diagnóstico, profiláctico, de pronóstico, y/o terapéutico para cánceres de tejido como el listado en la Tabla I.

La invención provee polinucleótidos correspondientes o complementarios a todos o parte de los genes STEAP-1, mRNAs, y/o secuencias de codificación, preferiblemente en forma aislada, incluyendo polinucleótidos que codifican proteínas relacionadas con STEAP-1 y fragmentos de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, oo más de 25 amino ácidos contiguos; al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100 o más de 100 amino ácidos contiguos de una proteína relacionada con STEAP-1, así como los péptidos/proteínas en sí; ADN, RNA, híbridos de ADN/RNA, y moléculas, polinucleótidos u oligonucleótidos relacionados complementarios o que tienen al menos un 90% de homología a los genes STEAP-1 o secuencias de mRNA o partes de las mismas, y polinucleótidos u oligonucleótidos que se hibridan a los genes STEAP-1, mRNAs, o a los polinucleótidos que condifican STEAP-1. También se proveen medos para aislar cADNs y los genes que codifican STEAP-1. También se proveen moléculas de ADN recombinante que contienen polinucleótidos de STEAP-1, células transformadas o trasnducidas con tales moléculas, y sistemas de vector hospedero para la expresión de productos de gen STEAP-1.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. La secuencia STEAP-1 SSH de 436 nucleótidos.

Figura 2. El cADN y secuencia de amino ácido del variante 1 de STEAP-1 (también llamado "v.1 de STEAP-1" o "variante 1 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2A. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 66-1085 incluyendo el codón de detención.

The cADN y secuencia de amino ácido del variante 2 de STEAP-1 (también llamado "v.2 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2B. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 3 de STEAP-1 (también llamado "v.3 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2C. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-944 incliyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 4 de STEAP-1 (también llamado "v.4 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2D. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 5 de STEAP-1 (también llamado "v.5 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2E. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 6 de STEAP-1 (también llamado "v.6 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2F. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 7 de STEAP-1 (también llamado "v.7 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2G. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 8 de STEAP-1 (también llamado "v.8 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2H. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 9 de STEAP-1 (también llamado "v.9 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2I. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 10 de STEAP-1 (también llamado "v.10 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2J. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 11 de STEAP-1 (también llamado "v.11 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2K. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 12 de STEAP-1 (también llamado "v.12 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2L. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 13 de STEAP-1 (también llamado "v.13 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2M. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 14 de STEAP-1 (también llamado "v.14 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2N. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 15 de STEAP-1 (también llamado "v.15 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2O. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 16 de STEAP-1 (también llamado "v.16 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2P. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

El cADN y secuencia de amino ácido del variante 17 de STEAP-1 (también llamado "v.17 de STEAP-1") se muestra en la Figura 2Q. El codón para la metionina de inicio está subrayado. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención. Como se usa aquí, una referencia a STEAP-1 incluye todas las variantes de la misma, incluyendo aquellas mostradas en las Figuras 10, 11 y/o 12 a menos que el contexto indique claramente de otra forma.

Figura 3. La secuencia de amino ácido de v.1 de STEAP-1 se muestra en la Figura 3A; tiene 339 amino ácidos.

La secuencia de amino ácido de v.2 de STEAP-1 se muestra en la Figura 3B; tiene 258 amino ácidos.

La secuencia de amino ácido de v.3 de STEAP-1 se muestra en la Figura 3C; tiene 282 amino ácidos.

La secuencia de amino ácido de v.4 de STEAP-1 se muestra en la Figura 3D; tiene 258 amino ácidos. Como se usa aquí, una referencia STEAP-1 incluye todas las variantes del mismo, incluyendo aquellas mostradas en las Figuras 10, 11 y/o 12 a menos que el contexto indique claramente otra cosa.

Figura 4. Figura 4A. La alineación de secuencia de amino ácido de la v.1 de STEAP-1 con proteína relacionada adiposa inducida por TNFα de ratón (gi|16905133). **Figura 4B.** La alineación de secuencia de amino ácido de v.1 de STEAP-1 con proteína pHyde de rata (gi/21717655/). **Figura 4C.** Muestra la homología de STEAP-1 a antígeno epitelial de transmembrana 6 de ratón de la próstata (gi|20820492|).

Figura 5. Perfil de hidrofilicidad de amino ácido del variante 1 de STEAP-1 (**Figura 5 (a)**). Perfil de hidrofilicidad de amino ácido de la variante 3 de STEAP-1 (**Figura 5 (b)**), determinado mediante análisis de secuencia de algoritmo de computadora usando el método de Hopp y Woods (Hopp T. P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828) accesado en el sitio de red ProtScale localizado en la URL de la red mundial ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 6. (**Figura 6 (a)**). Perfil de hidropaticidad de amino ácido del variante 1 de STEAP-1. (**Figura 6 (b)**). Perfil de hidropaticidad de amino ácido del variante 3 de STEAP-1, determinada mediante análisis de secuencia de algoritmo de computadora usando el método de Kyte y Doolittle (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132) accesado en el sitio de red ProtScale localizado en la URL de la red mundial expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 7. (**Figura 7 (a)**). Porcentaje de perfil de residuos de amino ácido accesibles del variante 1 de STEAP-1. (**Figura 7(b)**). Porcentaje de perfil de residuos de amino ácido accesibles del variante 3 de STEAP-1, determinado mediante análisis de secuencia de algoritmo de computadora usando el método de Janin (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492) accesado en el sitio de red ProtScale localizado en la URL de la red mundial expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 8. (**Figura 8 (a)**). Perfil de flexibilidad de amino ácido del variante 1 de STEAP-1. (**Figura 8 (b)**). Perfil de flexibilidad de amino ácido del variante 3 de STEAP-1, determinado mediante análisis de secuencia de algoritmo de computadora usando el método de Bhaskaran y Ponnuswamy (Bhaskaran R., y Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255) accesado en el sitio de red ProtScale localizado en la URL de la red mundial expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 9. (**Figura 9(a)**). Perfil de giro beta de amino ácido del variante 1 de STEAP-1. (**Figura 9(b)**). Perfil de giro beta de amino ácido del variante 3 de STEAP-1, determinado mediante análisis de secuencia de algoritmo de computadora usando el método de Deleage y Roux (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1: 289-294) accesado en el sitio de red ProtScale

localizado en la URL de la red mundial expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) a través del servidor de biología molecular ExPasy.

Figura 10. Alineación Esquemática de los variantes SNP de STEAP-1. Variantes V.4 a V.17 de STEAP-1 son variantes con diferencias de nucleótido simple comparadas con v.2 de STEAP-1. Aunque estos variantes SNP se muestran por separado, también podrían encontrarse en cualquier combinación y en cualquier variante transcrito que contiene los pares base, e.g., v.1 y v.3 de STEAP-1. Los números corresponden a los de v.2 de STEAP-1. La casilla negra muestra la misma secuencia que v.2 de STEAP-1. Las SNPs se indican encima de la casilla.

Figura 11. Composiciones de exón de variantes transcritos de STEAP-1. Esta Figura muestra la estructura de las variantes transcritas sin una cola poli A. Las variantes v.1, v.2, y v.3 de STEAP-1 son variantes transcritas que comparten los mismos exones 2 y 3. El primer exón de v.1. de STEAP-1 es 30 bases más corto en el extremo 5' que los primeros exones de los otros dos variantes transcritos. El cuarto exón de v.2 de STEAP-1 v. 2 es el mismo que el exón combinado 4, intrón 4 y el exón 5 de v.1. de STEAP-1. Comparado con v.1. de STEAP-1, variante v.3 de STEAP-1 tiene un exón adicional dividido desde el intrón 4 de la v.1 de STEAP-1. Las longitudes de los intrones y exones no son proporcionales.

Figura 12. Alineación esquemática de variantes de proteína de STEAP-1. Los variantes de proteína corresponden a variantes de nucleótido. Los variantes de nucleótido de STEAP-1 v.5 a v.17 de la Figura 10 codifican la misma proteína que v.2. de STEAP-1. Las proteínas trasladadas desde los variantes transcritos v.1 y v.3 de STEAP-1 como se muestran en la Figura 11 pueden contener el amino ácido F (Phe) o L (Leu) en la posición 169. Las diferencias de amino ácido simple se indicaron encima de las casillas. Las casillas negras representan la misma secuencia que v.1 de STEAP-1. Las casillas con patrones diferentes de llenado muestran secuencias diferentes. Los números por debajo de la casilla corresponden a v.1 de STEAP-1.

Figura 13. Figuras 13(a) - (c). Estructura secundaria y predicción de los dominios transmembrana para los variantes de proteína de STEAP-1. La estructura secundaria de los variantes de proteína de STEAP-1 1 (SEQ ID NO: 46), 2 (SEQ ID NO: 47), y 3 (SEQ ID NO: 48); (Figuras13a-13c, respectivamente) fue predicha usando el método de Red Neural Jerárquica -

HNN (Guermeur, 1997, http://bil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa-automat.pl?page=npsa_nn.html), accesado desde el servidos de biología molecular ExPasy localizado en la Red mundial en (.expasy.ch/tools). Este método predice la presencia y ubicación de helices alfa, cadenas extendidas, y hélices aleatorias a partir de la secuencia de proteína primaria. También se lista el porcentaje de la proteína en una estructura secundaria dada. **Figuras 13(d), 13(f), y 13 (h)**: Representaciones esquemáticas de la probabilidad de existencia de regiones de transmembrana y orientación del variante 1-3 de STEAP-1, (Figuras 13(d), 13(f) y 13(h) respectivamente, basado en el algoritmo TMpred de Hofmann y Stoffel que utiliza TMBASE (K. Hofmann, W. Stoffel. TMBASE - A database of membrane spanning protein segments Biol. Chem. Hoppe-Seyler 374: 166, 1993). **Figuras 13 (e), 13(g), 13 (i)**: representaciones de la probabilidad de existencia de regiones de transmembrana y la orientación extracelular e intracelular de los variantes 1-3 de STEAP-1, Figuras 13 (e), 13(g) y 13 (i) respectivamente, basado en el algoritmo TMHMM de Sonnhammer, von Heijne, y Krogh (Erik L. L. Sonnhammer, Gunnar von Heijne, y Anders Krogh: A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Proc. of Sixth Int. Conf. on Intelligent Systems for Molecular Biology, p 175- 182 Ed J. Glasgow, T. Littlejohn, F. Major, R. Lathrop, D. Sankoff, y C. Sensen Menlo Park, CA: AAAI Press, 1998). Los algoritmos TMpred y TMHMM se accesan desde el servidos de biología molecular ExPasy localizado en la Red Mundial en (.expasy.ch/tools/).

Figura 14. Figura 14a. Expresión de STEAP-1 en muestra de paciente con cáncer de estómago. El ARN se extrajo de estómago normal (N) y de 10 muestras de pacientes con cáncer de estómago (T). El manchado al Norte con 10 g de ARN total/línea se probó con la secuencia de STEAP-1. Los resultados muestran expresión fuerte de una STEAP-1 de aproximadamente 1.6 kb en los tejidos de tumor de estómago. El panel inferior representa la tinción con bromuro de etidio de la mancha que muestra la calidad de las muestras de RNA. **Figura 14b.** Expresión de STEAP-1 en tejidos de pacientes con cáncer de recto. ARN se extrajo de recto normal (N), tumores de pacientes con cáncer de recto (T), y metástasis de cáncer de recto (M). Las manchas al Norte con 10 g de ARN total se probaron con la secuencia de STEAP-1. Los resultados muestran expresión fuerte de STEAP-1 en los tejidos de pacientes con cáncer de recto. El panel inferior representa la tinción con bromuro de etidio de la mancha que muestra la calidad de las muestras de RNA. **Figura 14c. Expresión de STEAP-1 en células endoteliales de vena umbilical (HUVEC).**

El cADN de primera cadena se preparó a partir de células HUVEC, xenoinjertos de cáncer de próstata LAPC-4AD y LAPC-9AD, así como a partir de tejidos de cerebro humano. La normalización se realizó mediante PCR usando iniciadores para actina y GAPDH. La PCR semi-cuantitativa, usando iniciadores para STEAP-1, se realizó en los ciclos 27 y 30 de amplificación (A). Como un control, la PCR que usa iniciadores a actina se muestran en (B). Los resultdos muestran expresión fuerte de STEAP-1 en células HUVEC similar a la expresión detectada en los tejidos de xenoinjerto de cáncer de próstata. La expresión de STEAP-1 en células HUVEC indica que el marcado de STEAP-1 también puede marcar células endoteliales de la neovasculatura de los tumores. **Figura 14(d) y Figura 14(e). Expresión de STEAP-1 en Tejidos Normales y con Cáncer.** El cADN de primera cadena se preparó a partir de tejidos normales (vejiga, cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, próstata, bazo, músculo esquelético, testículo, páncreas, colon y estómago), y a partir de conjuntos de muestras de cáncer de pacientes (conjunto de cáncer de próstata, conjunto de cáncer de vejiga, conjunto de cáncer de riñón, conjunto de cáncer de colon, conjunto de cáncer de pulmón, conjunto de cáncer de ovario, conjunto de cáncer de seno, conjunto de metástasis de cáncer, conjunto de cáncer de páncreas, conjunto de xenoinjerto de cáncer de próstata, y metástasis de próstata a conjunto de ganglio linfático. La normalización se realizó mediante PCR usando iniciadores para actina. La PCR semi cuantivativa, usando iniciadores para STEAP-1, se realizó a los ciclos.26 y 30 de amplificación. En (**Figura 14d**) se muestra una imagen del gel de agarosa de RT-PCR. En (**Figura 14e**) los productos de PCR fueron cuantificados usando el software Alphalmager. Los resultados muestran expresión fuerte de STEAP-1 en la próstata normal entre todos los tejidos normales probados. Se detectó la regulación ascendente de la expresión de STEAP-1 en el conjunto de cáncer de próstata, conjunto de cáncer de vejiga, conjunto de cáncer de riñón, conjunto de cáncer de colon, conjunto de cáncer de pulmón, conjunto de cáncer de ovario, conjunto de cáncer de seno, y conjunto de cáncer pancreático. Se detectó expresión fuerte de STEAP-1 en el conjunto de metástasis de cáncer, conjunto de xenoinjerto de cáncer de próstata, y metástasis de próstata a ganglio linfático. **Figura 14(f): Expresión de STEAP-1 en muestras con linfoma.** El cANC de cadena primera se preparó a partir de un panel de muestras de pacientes con linfoma. La normalización se realizó mediante PCR usando iniciadores para actina. LA PCR semi cuantitativa, usando iniciadores a STEAP-1, se realizó en los ciclos 26 y 30 de amplificación. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa gel, y los productos de PCR fueron cuantificados usando el software Alphalmager. La expresión se registró como fuerte o media, si la señal se detecta como ciclos 26

o 30 de amplificación, respectivamente, y ausente si no se detecta señal incluso en el ciclo 30 de amplificación. Los resultados muestran la expresión de STEAP-1 en 8 de 11 (72.7%) muestras de tumor probadas.

Figura 15. Tinción de Superficie Celular Específico de STEAP-1 mediante MAb M2192.30. Páneles izquierdos: análisis de FACS de células 3T3 y Rat1 recombinantes que expresan establemente ya sea STEAP1 (líneas oscuras) o un gen resistente a reomicina de control (líneas claras) teñidas con MAb M2/92.30 anti-STEAP (10 μg/ml) y el Mab enlazado de superficie celular se detectó con un reactivo secundario conjugado IgG-PE anti-ratón de cabra. Las células teñidas fueron entonces sometidas al análisis de FACS. Como lo indicó el cambio de fluorescencia de las células Rat1-STEAP1 y 3T3-STEAP1 comparadas con las células de control respectivas, MAb M2/92.30 se enlaza específicamente al STEAP1 de superficie celular. Panel derecho: Microscopía Fluorescente de células 3T3-STEAP1 teñidas con MAb M2/92.30 muestran fluorescencia de superficie celular brillante.

Figura 16. STEAP1 M2/92.30 MAb Reconoce el STEAP-1 de Superfice Celular en Xenoinjertos de Cáncer de próstata Humano. Células de cáncer de próstata LAPC9 fueron teñidas con 10 ug/ml de MAbM2/92.30 o con un anti-KLH MAb de control. El MAb enlazado de superficie se detectó con Ab secundario conjugado IgG-PE anti-ratón de cabra. Las células teñidas fueron entonces sometidas al análisis de FACS. Estos resultados demuestran que el MAb M2/120.545 anti-STEAP1 se enlaza específicamente a STEAP1 de superficie celular endógena expresado en células de xenoinjerto de cáncer de próstata.

Figura 17. STEAP1 M2/92.30 MAb Reconoce STEAP-1 de Ratón. Células 293T fueron transfectadas transitoriamente con pCADN3.1 que codifica el cADN STEAP1 murino o com un vector vacío. 2 días después, las células fueron recolectadas y teñidas con MAb M2/92.30 anti-STEAP1 (10u g/ml) y el MAb enlazado a superficie celular se detectó con un reactivo secundario conjugado IgG- PE anti-ratón de cabra. Las células fueron entonces sometidas al análisis de FACS. Como lo indica el cambio fluorescente de las células 293T transfectadas con STEAP1 murino comparado con las células transfectadas con el vector vacío, MAb M2/92.30 se enlaza específicamente a la proteína STEAP1 murina.

Figura 18. STEAP1/120.545 MAb reconoce STEAP-1 de Superficie Celular. Panel A y Panel B. Células 3T3-neo (A, histogramas llenos) y 3T3-STEAP1 (A, histogramas huecos) y Rat1-neo (B, histogramas llenos) y células Rat1-STEAP (B, histogramas huecos) fueron teñidas con MAb M2/120.545 (10 ug/ml) y el Mab enlazado a superficie se detectó con Ab secundario conjugado IgG-PE anti-ratón de cabra. Las células fueron entonces sometidas al análisis de FACS. Como lo indica el cambio de fluorescencia de las células 3T3-STEAP1 y Rat1-STEAP1 comparadas con sus respectivos neo controles, el MAb M2/120.545 se enlaza específicamente al STEAP1 de superficie celular. Panel C. Células LNCaP fueron teñidas con MAb M2/120.545 o un anti-KLH MAb de control, y se sometieron al análisis de FACS como se indicó anteriormente. Panel D. Microscopía de Fluorescencia de células LNCaP teñidas con M2/120.545 que muestran fluorescencia de superficie celular brillante. Estos resultados demuestran que M2l120.545 MAb se enlaza específicamente al STEAP1 de superficie celular endógeno en células LNCaP.

Figura 19. Figura 19 (a) El cADN (SEQ ID NO: 49) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:50) del clon #2 de M2/X92.30 VH. **Figura 19(b)** El cADN (SEQ ID NO: 51) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 52) del clon #2 de M2/X92.30 VL. **Figura 19(c)** El cADN (SEQ ID NO: 53) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 54) del clon # 6 de M2/X92.30 VL. **Figura 19 (d)** El cADN (SEQ ID NO: 55) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 56) del clon #8 de M2/X120.545 VL.

Figura 20. Figura 20a. La secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 57) del clon #2 de M2/X92.30 VH.

Figura 20b. La secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 58) del clon #2 de M2/X92.30 VL.

Figura 20c. El cADN (SEQ ID NO: 59) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 60) del clon # 6 de M2/X92.30 VL.

Figura 20d. Alineación de amino ácido del clón #2 de M2/X92.30 VL (SEQ ID NO: 61) y el clon # 6 de M2/M92.30 VL (SEQ ID NO: 62).

Figura 20e. La secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 63) del clon #8 de M2/X120.545 VL.

La secuencia del péptido de señal está subrayada.

Figura 21. STEAP1 M2192.30 MAb Reconoce el STEAP-1 de superficie celular en Xenoinjertos de Cáncer de Próstata y Vejiga humanos. Células UGB1 de cáncer de vejiga (panel izquierdo) y células LAPC9

de cáncer de próstata (panel derecho) fueron teñidas con 10 ug/ml de MAb M2/92.30 o con un anti-KLH MAb de control. El Mab enlazado a superficie fue detectado con Ab secundario conjugado IgG-PE anti-ratón de cabra. Las células teñidas fueron entonces sometidas al análisis de FACS. Estos resultados demuestran que el MAb M2/92.30 anti-STEAP1 se enlaza específicamente a STEAP1 de superficie celular endógeno expresado en células de xenoinjerto de cáncer de vajiga y próstata.

Figura 22. Internalización de STEAP-1 por STEAP1/92.30 MAb. Células 3T3-STEAP1 fueron manchadas a 4C con M2/92.30 MAb (10 ug/ml), lavadas, luego incubadas con Ab secundario conjugado IgG-PE anti-ratón de cabra a 4 °C. La mitad de las células fueron llevadas hasta 37 °C por 30 minutos y la otra mitad restante permaneción a 4 °C. Las células de cada tratamiento fueron entonces sometidas a microscopía fluorescente. Las células que permanecieron a 4 °C mostraron fluorescencia de superficie celular "tipo anillo" brillante. Las células que fueron llevadas hasta 37 °C mostraron pérdida de la fluorescencia "tipo anillo" y la apariencia de punteado y fluorescencia agregada indicativa de tapado e internalización.

Figura 23. Internalización de STEAP-1 por STEAP1 M2/120.545 MAb. Células PC3-STEAP1 fueron teñidas a 4°C con M2/120.545 MAb (10 ug/ml), lavadas, luego incubadas con Ab secundario conjugado IgG-PE anti-ratón de cabra. La mitad de las células fueron llevadas hasta 37 °C por 30 minutos y la otra mitad restante permaneción a 4 °C. Las células de cada tratamiento fueron entonces sometidas a microscopía fluorescente. Las células que permanecieron a 4 °C mostraron fluorescencia de superficie celular "tipo anillo" brillante. Las células que fueron llevadas hasta 37 °C mostraron pérdida de la fluorescencia "tipo anillo" y la apariencia de punteado y fluorescencia agregada indicativa de tapado e internalización.

Figura 24. Internalización de STEAP-1. Conjugados de IgG-saporina anti-ratón (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) se usaron para demostrar que el Steap-1 M2/120.545 murino entra en las células objetivo por medio de la expresión de Steap-1 en la superficie de las células LNCaP. Se usaron los siguientes protocolos. Las células LNCaP fueron colocadas en placas a 5000 células/90 µl/agujero en placa de 96agujeros y se incubaron durante la noche. Los conjugados de inmunotoxina secundaria (IgG-saporina anti-ratón y IgG-saporina anti-cabra) o IgG anti-ratón se prepararon en medio de cultivo celulas para dar una concentración final de 100 ng/ml. El anticuerpo

primario se agregó a concentraciones que varían de 1-1000 ng/ml. Las placas fueron incubadas por 72 horas y la viabilidad se determnó mediante el ensayo MTT. Los resultados muestran que las células LNCaP fueron eliminadas en la presencia de M2/120.545 y IgG-saporina anti-ratón. No se detectaron efectos con el anticuerpo secundario solo (IgG anti-ratón) o los conjugados de anticuerpo secundario no específicos (IgG saponina anti-cabra). No se observó toxicidad con el anticuerpo primario (M2/120.545) solo probado hasta 1 μg/ml.

Figura 25. Inmunoprecipitación de STEAP1 por MAbs M2/92.30 y M2/120.545 anti-STEAP-1. Células 3T3-STEAP1 y 3T3-neo fueron lisadas en amortiguador RIPA (Tris-Cl 25mM pH7.4; NaCl 150 mM, EDTA 0.5mM, 1% de TritonX-100, 0.5% de ácido deoxicólico, 0.1% de SDS, y coctel inhibidor de proteasa). Los lisados de célula fueron preaclarados con perlas de sefarosa de proteína G y luego se incubaron con 5 ug de MAb M2/92.30 o M2/120.545 por 2 horas a temperatura ambiente. Las perlas de Proteína G se agregaron y la mezcla se incubó adicionalmente por 1 hora. Los complejos inmunes fueron lavados y solubilizados en amortiguador de muestra SDS-PAGE. Las muestras solubilizadas fueron entonces sometidas a SDS-PAGE y análisis de manchado Occidental usando un pAb anti-STEAP de conejo. Los lisados de célula entera de células 293T transfectadas con STEAP1 también se corrieron como un control positivo. Una banda inmunoreactiva de ~37 kD se vio solamente en muestras derivadas de células 3T3-STEAP1 indicativas de inmunoprecipitación específica de STEAP1 por MAbs M2/92.30 y M2/120.545.

Figura 26. Efecto de MAbs de STEAP-1 en el crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de próstata humano LAPC9 en Ratones.
STEAP-1 M2/92.30 y M2/120.545 fueron probadas a dos diferentes dosis de 100 μg y 500 μg. Se usó PBS y anti-KLH MAb como controles. El estudio consistió de 6 grupos con 10 ratones en cada grupo. Los MAbs fueron dosificados IP dos veces por semana para un total de 12 dosis, partiendo el mismo día de la injección de célula de tumor. El tamaño del tumor fue monitoreado a través de medidas de calibrador dos veces por semana. La dimension más larga (L) y la dimensión perpendicular a esta (W) fueron tomadas para calcular el volumen del tumor usando la formula: $W^2 \times L/2$. La concentración de PSA en suero en el día 40 de tratamiento para cada animal se midió usando el kit de ELISA comercial. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney se usaron para evaluar las diferencias del crecimiento de tumor y el nivel de PSA entre grupos. Todas las pruebas fueron de dos lados con α=0.05. Los datos muestran que STEAP-1 M2/92.30 y M2/120.545

retardaron significativamente el crecimiento de xenoinjerto de próstata humano en un tumor dependiente de la dosis.

Figura 27. Efecto de MAbs de STEAP-1 en el crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de próstata humano LAPC9 en Ratones.
STEAP-1 M2/92.30 y M2/120.545 fueron probadas a dos diferentes dosis de 100 μg y 500 μg. Se usó PBS y anti-KLH MAb como controles. El estudio consistió de 6 grupos con 10 ratones en cada grupo. Los MAbs fueron dosificados IP dos veces por semana para un total de 12 dosis, partiendo el mismo día de la injección de célula de tumor. El tamaño del tumor fue monitoreado a través de medidas de calibrador dos veces por semana. La dimension más larga (L) y la dimensión perpendicular a esta (W) fueron tomadas para calcular el volumen del tumor usando la formula: W^2 x L/2. La concentración de PSA en suero en el día 40 de tratamiento para cada animal se midió usando el kit de ELISA comercial. La prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney se usaron para evaluar las diferencias del crecimiento de tumor y el nivel de PSA entre grupos. Todas las pruebas fueron de dos lados con α=0.05. Los datos muestran que STEAP-1 M2/92.30 y M2/120.545 retardaron significativamente el crecimiento de xenoinjerto de próstata humano en un tumor dependiente de la dosis.

Figura 28. STEAP-1 indujo la fosforilación de ERK-1 y ERK-2. Paneles izquierdos: células PC3 fueron transfectadas con el gen resistente a neomicina solo o con STEAP-1 en el vector pSRα. Las células fueron cultivadas durante la noche en 0.5% de FBS, luego estimuladas con 10% de FBS por 5 minutos con o sin 10 μg/ml de inhibidor MEK PD98058. Los lisados de célula fueron resueltos por 12.5% de SDS-PAGE y manchado Occidental con anti-fosfo-ERK (Señalización de célula) y anti-ERK (Zymed). **Paneles derechos:** Células NIH-3T3 fueron transfectadas con gen resistente a la neomicina solo o con STEAP-1 en el vector pSRα. Las células fueron tratadas como antes pero sin el inhibidor MEK. Adicionalmente, las células NIH-3T3-Neo fueron tratadas con 10mg/ml de salicilato de Na. La expresión de STEAP-1 induce la fosforilación de ERK-1 y ERK-2 en suero y fue inhibida por el inhibidor de cinasa MEK ascendente PD98058.

Figura 29. STEAP-1 Media la Comunicación Célula-Célula. Células PC3 fueron transfectadas con gen resistente a la neomicina solo o con STEAP-1 o un gen de control en el vector pSRα. Las células recipiente fueron marcadas con 1 mg/ml de dextrano-Rojo Texas y las células donadoras fueron

marcadas con 2.5 μg/ml de calceína AM. Las células donadoras (verde) y recipientes (rojo) fueron co-cultivadas a 37 °C por 18-24 horas y analizadas mediante microscopía para la co-localización de los colorantes fluorescentes. Panel izquierdo: Las células PC3-Neo se usaron como donadoras y recipientes. Panel central: Las células PC3-STEAP-1 se usaron como donadoras y recipientes. Panel Derecho: Las células PC3-control se usadon como donadoras y recipientes. STEAP-1 indujo la transferencia de calceína a células que contienen dextrano- Rojo Texas, indicando que STEAP-1 facilita la comunicación célula-célula.

Figura 30. La comunicación celular requiere la expresión de STEAP-1 en Células Donadoras y Recipientes. Células PC3 fueron transfectadas con gen resistente a la neomicina solo o con STEAP-1 en el vector pSRα. Las células recipiente fueron marcadas con 1 mg/ml dextrano-Rojo Texas y las células donadoras fueron marcadas con 2.5 μg/ml de calceína AM. Las células donadoras (verde) y recipiente (rojo) fueron co-cultivadas a 37 °C por 18-24 horas y analizadas mediante microscopía para la co-localización de los colorantes fluorescentes. Paneles superiores: microscopía ligera; paneles inferiores: Fluorescencia de UV. Paneles izquierdos: células PC3-Neo eran donadoras y recipientes. Paneles centrales: las PC3-Neo eran células donadoras y las PC3-STEAP-1 eran recipiente. Paneles derechos: las células PC3-STEAP-1 eran donadoras y recipientes. Solamente cuando STEAP-1 se expresó en donadoras y recipientes se detectó comunicación célula-célula.

Figura 31. Efecto de STEAP-11120.545 MAb en la Unión de brecha. Células PC3 fueron transfectadas con gen resistente a la neomicina solo o con STEAP-1 en el vector pSRα. Las células recipiente fueron marcadas con 1 mg/ml de dextrano-Rojo Texas y las células donadoras fueron marcadas con 2.5 μg/ml de calceína. Las células donadoras (verde) y recipiente (rojo) fueron co-cultivadas a 37 °C por 18-24 horas y analizadas mediante microscopía para la co-localización de los colorantes fluorescentes. En todos los experimentos se usaron las mismas células como donadoras y aceptoras.- Las células fueron incubadas con las cantidades indicadas de STEAP-1/120.545 MAb por 10 minutos antes de la colocación en placa, y el MAb se mantuvo en el cultivo por 24 horas antes del análisis. STEAP1/120.545 reduce la unión de brecha mediada por STEAP-1 de una manera dependiente de dosis.

Figura 32. Inhibición de la fosforilación de ERK-1 y ERK-2 por STEAP-1 MAb y RNAi. Células PC3 fueron transfectadas con gen resistente a

la neomicina solo o con STEAP-1 y MAb en el vector pSRα. Para la eliminación de RNAi precipitado, las células PC3- STEAP-1 fueron establemente transfectadas con un vector pPUR-U6-27-STEAP-1 que contiene siRNA a STEAP-1. Las células fueron ayunadas en 0.1% de FBS por 18 horas a 37 °C, colocadas en hielo por 10 minutos sin o con 10 μg/ml de M2/92.30 MAb, traídas a RT por 3 minutos, luego estimuladas con 10% de FBS por 5 minutos. Las células fueron lisadas en amortiguador de RIPA, los lisatos de célula entera fueron resueltos mediante 12.5% de SDS-PAGE y las proteínas detectadas mediante manchado Occidental. Fosfo-ERK se detectó con antisuero de conejo (Señalización de célula) y el ERK se detectó con anti-ERK de conejo (Zymed). El STEAP-1 fue detectado con anti-STEAP-1 de oveja y la actina se detectó con MAb anti-actina (Santa Cruz). La fosforilación ERK-1 y ERK-2 fueron ambas inducidas mediante 10% de suero, y fueron inhibidas por M2/92.30 MAb y siRNA a STEAP-1.

Figura 33. Efecto de RNAi de STEAP-1 en la Comunicación Célula-Célula. Células PC3 fueron transfectadas con gen resistente a la neomicina solo o con STEAP-1 en el vector pSRα. Para la eliminación de RNAi eliminado, las células PC3-STEAP-1 fueron establemente transfectadas con un vector pPUR-U6-27-STEAP-1 que contiene siRNA a STEAP-1 o un vector vacío. Las células recipiente fueron marcadas con 1 mg/ml de dextrano-Rojo Texas y las células donadoras fueron marcadas con 2.5 μg/ml de calceína AM. Las células donadoras (verde) y recipiente (rojo) fueron co-cultivadas a 37 °C por 18-24 horas y analizadas mediante microscopía para la co-localización de los colorantes fluorescentes. En todos los experimentos se usaron las mismas células como donadoras y aceptoras. El RNAi de STEAP-1 específico expresado establemente en células PC3-STEAP-1 reduce la comunicación célula-célula inducida por STEAP-1.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Esquema de Secciones

I.) Definiciones
II.) Polinucleótidos de STEAP-1
II.A.) Usos de los polinucleótidos de STEAP-1
II.A.1.)Monitoreo de anormalidades genéticas
II.A.2.)Realizaciones en antisentido

II.A.3.)Iniciadores y pares de iniciadores

II.A.4.)Aislamiento de Moléculas de ácido nucleico que codifican STEAP-1

II.A.5.)Moléculas de ácido nucleico recombinante y Sistemas Hospedero-Vector

III.) Proteínas relacionadas con STEAP-1

III.A.) Realizaciones de proteína que porta motivos

III.B.) Expresión de proteínas relacionadas con STEAP-1

III.C.) Modificaciones de proteínas relacionadas con STEAP-1

III.D.) Usos de las proteínas relacionadas con STEAP-1

IV.) Anticuerpos de STEAP-1

V.) Respuestas inmunes celulares de STEAP-1

VI.) Animales transgénicos con STEAP-1

VII.) Métodos para la detección de STEAP-1

VIII.) Métodos para monitorar el Estado de los Genes relacionados con STEAP-1 y sus productos

IX.) Identificación de Moléculas que interactúan con STEAP-1

X.) Métodos Terapéuticos y Composiciones

X.A.) Vacunas Anti-Cáncer

X.B.) STEAP-1 como un Objetivo para la Terapia basada en Anticuerpo

X.C.) STEAP-1 como un Objetivo par alas Respuestas Inmunes Celulares

- X.C.1. Vacunas de Minigen
- X.C.2. Combinaciones de péptidos CTL con Péptidos Auxiliares
- X.C.3. Combinaciones de péptidos CTL con Agentes Cebadores de célula T
- X.C.4. Composiciones de vacuna que comprenden DC pulsadas con péptidos CTL y/o HTL

X.D.) Inmunoterapia Adoptiva

X.E.) Administración de Vacunas para propósitos terapéuticos o profilácticos

XI.) Realizaciones de Diagnóstico y Pronóstico de STEAP-1.

XII.) Inhibición de la Función de Proteína de STEAP-1

XII.A.) Inhibición de STEAP-1 con Anticuerpos Intracelulares

XII.B.) Inhibición de STEAP-1 con Proteínas Recombinantes

XII.C.) Inhibición de Transcripción o Traducción de STEAP-1

XII.D.) Consideraciones Generales para Estrategias Terapéuticas

XIII.) Identificación, Caracterización y Uso de Moduladores de STEAP-1

XIV.) ARNi y uso terapéutico de ARN pequeño de interferencia (siARNs)
XV.) Kits/Artículos de Manufactura

I.) Definiciones:

A menos que se defina de otra forma, todos los términos de la técnica, notaciones y otrso términos científicos o terminología usada aquí pretende tener los significados entendidos comunmente por los expertos en la técnica a los cuales esta invención se refiere. En algunos casos, los términos con significados comunmente entendidos se definen aquí para claridad y/o fácil referencia, y la inclusión de tales definiciones aquí no debe ser necesariamente interpretada como que representa una diferencia sustancial sobre lo que es generalmente entendido en la técnica. Muchas de las técnicas y procedimientos descritos o referenciados aquí son bien entendidos y comunmente empleados usando metodología convencional por los expertos en la técnica, como, por ejemplo, las metodologías de clonación molecular utilizadas ampliamente descritas en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2ª edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. Según sea apropiado, los procedimientos que involucran el uso de kits y reactivos disponibles comercialmente se realizan generalmente de acuerdo con los protocolos y/o parámetros definidos por el fabricante a menos que se note de otra forma.

Los términos "cáncer de prostate avanzado", "cáncer de prostate avanzado localmente", "enfermedad avanzada" y "enfermedad avanzada localmente" significa cánceres de próstata que se han extendido a través de la cápsula de la próstata, y pretender incluir la enfermedad en Estado C bajo el sistema de la Asociación Urológica Americana (AUA), Enfermedad en estado C1 - C2 bajo el sistema Whitmore-Jewett, y enfermedad en estado T3 - T4 y N+ bajo el sistema TNM (tumor, nodo, metástasis). En general, la cirujía no es recomendada en pacientes con enfermedad avanzada localmente, y estos pacientes tienen resultados sustancialmente menos favorables comparados con pacientes que tienen cáncer de próstada clínicamente localizado (confinados al órgano). La enfermedad localmente avanzada se identifica clínicamente mediante evidencia palpable de induración más allá del borde lateral de la próstata, o asimetría o induración por encima de la base de la próstata. El cáncer de próstata avanzado localmente es diagnosticado actualmente patológicamente siguiendo la prostatectomía radical si el tumor invade o

penetra la cápsula prostática, se extiende en el márgen quirúrgico, o invade las vesículas seminales.

"Alterar el patron de glicosilación nativo" significa para los propósitos de aquí eliminar una o más mitades de carbohidrato encontradas en la secuencia nativa de STEAP-1 (ya sea removiendo el sitio de glicosilación subyacente o eliminando la glicosilación por medios químicos y/o enzimáticos), y/o agregar uno o más sitios de glicosilación que no están presentes en la secuencia nativa de STEAP-1. Adicionalmente, la frase incluye cambios cualitativos en la glicosilación de las proteínas nativas, involucrando un cambio en la naturaleza y proporciones de las diferentes mitades de carbohidrato presentes.

El término "análogo" se refiere a una molécula que es estructuralmente similar o comparte atributos similares o correspondientes con otra molécula (e.g., una proteína relacionada a STEAP-1). Por ejemplo, un análogo de una proteína de STEAP-1 puede estar enlazada específicamente por un anticuerpo o célula T que se enlaza específicamente a STEAP-1.

El término "anticuerpo" se usa en el sentido más amplio a menos que se indique claramente lo contrario. Por lo tanto, un "anticuerpo" puede ser uno que se encuentra naturalmente o hecho por el hombre tales como anticuerpos monoclonales producidos por tecnología de hibridoma convencional. Los anticuerpos anti-STEAP-1 comprenden anticuerpos monoclonales y policlonales así como fragmentos que contienen el dominio de enlace a antígeno y/o una o más regiones determinantes de complementariedad de estos anticuerpos. Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a cualquier forma de anticuerpo o fragmento del mismo que se enlaza específicamente a STEAP-1 y/o exhibe la actividad biológica deseada y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud total), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (e.g., anticuerpos biespecíficos), y fragmentos de anticuerpo siempre y cuando se enlacen específicamente a STEAP-1 y/o exhiban la actividad biológica deseada. Se puede usar cualquier anticuerpo específico en los métodos y composiciones proporcionadas aquí. Así, en una realización, el término "anticuerpo" abarca una molécula que comprende al menos una región variable de una molécula de inmunoglobulina de cadena ligera y al menos una región variable de una cadena pesada que en combinación forma un sitio de enlace específico para el antígeno objetivo. En una realización, el anticuerpo es un anticuerpo IgG. Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. Los

anticuerpos útiles en los presentes métodos y composiciones pueden ser generados en cultivo celular, en fago, o en diferentes animales, incluyendo, pero sin limitarse a vacas, conejos, cabras, ratones, ratas, hámsters, conejillos de Indias, ovejas, perros, gatos, monos, chimpancés, simios. Por lo tanto, en una realización, un anticuerpo de la presente invention es un anticuerpo mamífero. Las técnicas de fago se pueden usar para aislar un anticuerpo inicial o para generar variantes con especificidad alterada o características de avidez. Tales técnicas son rutina y bien conocidas en la técnica. En una realización, el anticuerpo es producido por medios recombinantes conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo recombinante puede producirse transfectando una célula hospedera con un vector que comprende la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo. Se puede usar uno o más vectores para transfectar la secuencia de ADN que expresa al menos una región VL y una VH en la célula hospedera. Descripciones ejemplares de medios recombinants de generación y producción de anticuerpo incluyen Delves, ANTIBODY PRODUCTION: ESSENTIAL TECHNIQUES (Wiley, 1997); Shephard, *et al.*, MONOCLONAL ANTIBODIES (Oxford University Press, 2000); Goding, MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND PRACTICE (Academic Press, 1993); CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (John Wiley & Sons, edición más reciente). Un anticuerpo de la presente invención puede ser modificado por medios recombinantes para aumentar más la eficacia del anticuerpo para mediar la función deseada. Así, está dentro del alcance de la invención que los anticuerpos puedan ser modificados mediante sustituciones usando medios recombinantes. Típicamente, las sustituciones serán sustituciones conservadoras. Por ejemplo, al menos un amino ácido en la región constante del anticuerpo puede ser reemplazado con un residuo diferente. Ver, e.g., Patente U.S. No. 5,624,821, Patente U.S. No. 6,194,551, Solicitud No. WO 9958572; y Angal, et al., *Mol. Immunol.* 30: 105-08 (1993). La modificación de amino ácidos incluye eliminaciones, adiciones, sustituciones de amino ácidos. En algunos casos, tales cambios se hacen para reducir actividades indeseadas, e.g., citotoxicidad depediente de complemento. Frecuentemente, los anticuerpos son marcados por unión, ya sea covalentemente o no covalentemente, de una sustancia que provee una señal detectable. Una amplia variedad de marcadores y técnicas de conjugación son conocidas y se reportan ampliamente en la literatura científica y de patentes. Estos anticuerpos pueden ser seleccionados para enlace a STEAP-1 normal o defectuoso. Ver e.g., ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press, 1996). Anticuerpos adecuados con las actividades biológicas deseadas se pueden identificar con los siguientes ensayos *in vitro* incluyendo, pero sin

limitarse a: proliferación, migración, adhesión, crecimiento en agar blando, angiogénesis, comunicación célula-célula, apóptosis, transporte, transducción de señal, y los siguientes ensayos *in vivo* tales como la inhibición de crecimiento de tumor. Los anticuerpos proporcionados aquí también pueden ser útiles en aplicaciones de diagnóstico. Como anticuerpos de captura o no neutralizantes, pueden ser seleccionados por la habilidad para enlazarde al antígeno específico sin inhibir el enlace del receptor o la actividad biológica del antígeno. Como anticuerpos neutralizantes, los anticuerpos pueden ser útiles en ensayos de enlace competitivos. También se pueden usar para cuantificar el STEAP-1 o su receptor.

Un "fragmento de anticuerpo" se define como al menos una porción de la región variable de la molécula de inmunoglobulina que se enlaza a su objetivo, i.e., la región de enlace a antígeno. En una realización, específicamente cubre los anticuerpos anti-STEAP-1 simples y clones de los mismos (incluyendo agonistas, antagonistas y neutralizantes) y composiciones de anticuerpo anti-STEAP-1 con especificidad poliepitópica. El anticuerpo de los presentes métodos y composiciones puede ser monoclonal o policlonal. Un anticuerpo puede estar en la forma de un fragmento de anticuerpo que se enlaza a antígeno incluyendo un fragmento Fab, fragmento $F(ab')_2$, una región variable de cadena sencilla, y similares. Los fragmentos de moléculas intactas pueden ser generados usando métodos bien conocidos en la técnica e incluyen digestión enzimática y medios recombinantes.

Como se usa aquí, cualquier forma del "antígeno" se puede usar para generar un anticuerpo que es específico para STEAP-1. Así, al atígeno de elicitación puede ser un epítopo simple, epítopos múltiples, o la proteína entera sola o en combinación con uno o más agentes mejoradores de inmunogenecidad conocidos en la técnica. El antígeno de elicitación puede ser una proteína de longitud total aislada, una proteína de superficie celular (e.g., inmunizar con células transfectadas con al menos una porción del antígeno), o una proteína soluble (e.g., inmunizando con solamente la porción del dominio extracelular de la proteína). El antígeno puede producirse en una célula modificada genéticamente. El ADN que codifica el antígeno puede ser genómico o no genómico (e.g., cADN) y codifica al menos una porción del dominio extracelular. Como se usa aquí, el término "porción" se refiere al número mínimo de amino ácidos o ácidos nucleicos, según sea apropiado, para constituir un epítopo inmunogénico del antígeno de interés. Se puede emplear cualquier vector genético adecuado para transformación de las células de

interés, incluyendo, pero sin limitarse a vectores adenovirales, plásmidos, y vectores no virales, tales como lípidos catiónicos. En una realización, el anticuerpo de los métodos y composiciones presentes se enlaza específicamente a al menos una porción del dominio extracelular del STEAP-1 de interés.

Los anticuerpos o fragmentos que se enlazan a antígeno de los mismos proporcionados aquí pueden estar conjugados a un "agente bioactivo". Como se usa aquí, el término "agente bioactivo" se refiere a cualquier compuesto sintético o que se encuentra naturalmente que se enlaza al antígeno y/o mejora o media un efecto biológico deseado para mejorar las texinas eliminadoras de célula.

En una realización, los fragmentos de enlace útiles en la presente invención son fragmentos biológicamente activos. Como se usa aquí, el término "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de enlazarse al epítopo entigénico deseado y ejercer directa o indirectamente un efecto biológico. Efectos directos incluyen, pero no se limitan a la modulación, estimulación, y/ o inhibición de una señal de crecimiento, la modulación, estimulación, y/o inhibición de una señal anti- apoptótica, la modulación, estimulación, y/o inhibición de una señal apoptótica o necrótica, modulación, estimulación, y/o inhibción de la cascada ADCC, y modulación, estimulación, y/o inhibición de la cascada CDC.

Anticuerpos "biespecíficos" son también útiles en los presentes métodos y composiciones. Como se usa aquí, el término "anticuerpo biespecífico" se refiere a un anticuerpo, típicamente un anticuerpo monoclonal, que tiene especificidades de enlace para al menos dos epítopos antigénicos diferentes. En una realización, los epítopos son del mismo antígeno. En otra realización, los epítopos son de dos antígenos diferentes. Los métodos para preparar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos biespecíficos pueden ser producidos recombinantemente usando la co-expresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina. Ver, e.g., Milstein *et al.*, *Nature* 305: 537-39 (1983). Alternativamente, los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse usando enlace químico.Ver, e. g., Brennan, *et al.*, *Science* 229: 81 (1985). Los anticuerpos biespecíficos incluyen fragmentos de anticuerpo biespecífico. Ver, e.g., Hollinger, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* U.S.A. 90: 6444-48 (1993), Gruber, *et al.*, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994).

Los anticuerpos monoclonales presentes incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los cuales una porción de la cadena pesada y/o ligera es identical u homóloga con secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que perteneces a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otras especies o que perteneces a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando se enlacen específicamente al antígeno objetivo y/o exhiban la actividad biológica deseada (Pat U.S. No. 4,816,567; y Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 81: 6851-6855 (1984)).

El término "secuencias optimizadas de codón" se refiere a secuencias de nucleótido que han sido optimizadas para una especie hospedera particular reemplazando cualquier codón que tiene una frecuencia de uso de menos de aproximadamente 20%. Las secuencias de nucleótido que han sido optimizadas para expresión en una especie hospedera dada por eliminación de secuencias de poliadenilación espuriosa, eliminación de señales de empalme exón/intrón, eliminación de repeticiones del tipo transposón y/u optimización del contenido de GC además de la optimización de codón están referidas aquí como una "secuencia mejorada de expresión."

Una "biblioteca combinacional" es una colección de diversos compuestos químicos generados por síntesis química o síntesis biológica combinando un número de "bloques de contrucción" químicos, tales como reactivos. Por ejemplo, una biblioteca combinacional lineal, tal como una biblioteca de polipéptido (e.g., muteína), se forma combinando un conjunto de bloques de contrucción química llamados amino ácidos de cada forma posible para una longitud de compuesto dada (i.e., el número de amino ácidos en un compuesto polipéptido). Numerosos compuestos químicos son sintetizados a través de tal mezclado combinacional de bloques de contrucción química (Gallop et al., J. Med. Chem. 37(9):1233-1251 (1994)).

La preparación y selección de bibliotecas combinacionales es bien conocida por los expertos en la técnica. Tal biblioteca química combinacional incluye, pero no se limita a, bibliotecas de péptido (ver, e.g., Patente U.S. No. 5,010,175, Furka, Pept. Prot. Res. 37: 487-493 (1991), Houghton et al., Nature, 354: 84-88 (1991)), peptoides (Publicación PCT No WO91/19735), péptidos codificados (Publicación PCT WO 93/20242), bio-oligómeros aleatorios

(Publicación PCT WO92/00091), benzodiazepinas (Patente U.S. No. 5,288,514), diversómeros tales como hidantoínas, benzodiazepinas y dipéptidos (Hobbs et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 90: 6909-6913 (1993)), polipéptidos vinílogos (Hagihara et al., J. Amer. Chem.Soc. 114:6568 (1992)), peptidomiméticos no peptídicos con una estructura Beta-D-Glucosa (Hirschmann et al., J. Amer. Chem. Soc. 114:9217-9218 (1992)), síntesis orgánica de análogos de bibliotecas de compuesto pequeño (Chen et al., J. Amer. Chem. Soc. 116:2661 (1994)), oligocarbamatos (Cho, et al., Science 261:1303 (1993)), y/o fosfonatos de peptidilo (Campbell et al., J. Org. Chem. 59: 658 (1994)). Ver, generalmente, Gordon et al., J. Med. Chem. 37: 1385 (1994), bibliotecas de ácido nucléico (ver, e.g., Stratagene, Corp.), bibliotecas de ácido nucleico de péptido (ver, e.g., Patente U.S. 5,539,083), bibliotecas de anticuerpo (ver, e.g., Vaughn et al., Nature Biotechnology 14 (3): (1996), y PCT/US96/10287), bibliotecas de carbohidrato (ver, e.g., Liang et al., Science 274: 1520-1522 (1996), y Patente U.S. No. 5,593,853), y bibliotecas de molécula orgánica (ver, e.g., benzodiazepinas, Baum, C&EN, Enero 18, página 33 (1993); isoprenoides, Patente U.S. No. 5,569,588; tiazolidinonas y metatiazanonas, Patente U.S. No. 5,549,974; pirrolidinas, Patente U.S. Nos. 5,525,735 y 5,519,134; compuestos de morfolino, Patente U.S. No. 5,506,337; benzodiazepinas, Patente U.S. No. 5,288,514; y similares).

Los dipositivos para la preparación de bibliotecas combinacionales están disponibles comercialmente (ver, e.g., 357 NIPS, 390 NIPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY; Symphony, Rainin, Woburn, MA; 433A, Applied Biosystems, Foster City, CA; 9050, Plus, Millipore, Bedford, NIA). Un número de sistemas robóticas bien conocidos también se han desarrollado para las químicas de fase de solución. Estos sistemas incluyen estaciones de trabajo automatizadas tales como los aparatos de síntesis automáticos desarrollados por Takeda Chemical Industries, LTD. (Osaka, Japón) y muchos sistemas robóticos que utilizan brazos robóticos (Zymate H, Zymark Corporation, Hopkinton, Mass.; Orca, Hewlett-Packard, Palo Alto, Calif.), que imitan las operaciones sintéticas manuales realizadas por un químico. Cualquiera de los dispositivos anteriores es adecuado para uso con la presente invención. La naturaleza e implementación de modificaciones a estos dispositivos (si la hay) de forma que puedan operar como se discute aquí, sera obvia para los expertos en la técnica relevante. Adicionalmente, numerosas bibliotecas combinacionales están en sí disponibles comercialmente (ver, e.g., ComGenex, Princeton, NJ; Asinex, Moscow, RU; Tripos, Inc., St. Louis, MO; ChemStar, Ltd, Moscow, RU; 3D Pharmaceuticals, Exton, PA; Martek Biosciences, Columbia,.MD; etc.).

Como se usa aquí, el término "sustitución conservadora" se refiere a sustituciones de amino ácidos conocidas por los expertos en esta técnica y pueden hacerse generalmente sin alterar la actividad biológica de la molécula resultante. Los expertos en esta técnica reconocen que, en general, las sustituciones de amino ácido simples en regiones no esenciales de un polipéptido no alteran sustancialmente la actividad biológica (*ver, e.g.*, Watson, et al., MOLECULAR BIOLOGY OF THE GENE, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4ª Edición 1987)). Tales sustituciones ejemplares se hacen preferiblemente de acuerdo con las establecidas en la(s) Tabla(s) III(a-b). Por ejemplo, tales cambios incluyen sustituir cualquier isoleucina (I), valina (V), y leucina (L) por cualquier otro de estos amino ácidos hidrófóbicos; ácido aspártico (D) por ácido glutámico (E) y vice versa; glutamina (Q) por asparagina (N) y vice versa; y serina (S) por treonina (T) y vice versa. Otras sustituciones también pueden considerarse conservadoras, dependiendo del ambiente del amino ácido particular y su papel en la estructura tridimensional de la proteína. Por ejemplo, glicina (G) y alanina (A) pueden frecuentemente ser intercambiables, como también alanina (A) y valina (V). La metionina (M), que es relativamente hidrofóbica, puede frecuentemente ser intercambiana con leucina e isoleucina, y algunas veces con valina. La lisina (K) y arginina (R) son frecuentemente intercambiables en ubicaciones en las cuales la característica significativa del residuo de amino ácido es su carga y los pK's diferentes de estos dos residuos de amino ácido no son significativos. Aún otros cambios se pueden considerer "conservadores" en ambientes particulares (ver, e.g. Tabla III(a) aquí; páginas 13-15 "Biochemistry" 2ª ED. Lubert Stryer ed (Stanford University); Henikoff *et al.*, PNAS 1992 Vol 8910915-10919; Lei *et al.*, J Biol Chem 1995 May 19; 270 (20):11882-6). Otras sustituciones también son permisibles y pueden ser determinadas empíricamente o de acuerdo con las sustituciones conservadoras conocidas.

El término "agente citotóxico" se refiere a una sustancia que inhibe o evita la actividad de expresión de células, función de células y/o produce la destrucción de células. El término pretende incluir isotopos radioactivos, agents quimioterapéuticos, y toxinas tales como toxinas de molécula pequeña o toxinas activas enzimáticamente de origen bacteriano, fungoso, de planta o animal, incluyendo fragmentos y/o variantes de los mismos. Ejemplos de agents citotóxicos inxluyen, pero no se limitan a auristatinas, auristatina e, auromicinas, maltansinoides, itrio, bismuto, ricina, cadena A de ricina, combrestatina, duocarmicinas, dolostatinas, doxorubicina, daunorubicina, taxol, cisplatino,

cc1065, bromuro de etidio, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, dihidroxi antracin diona, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, y glucocorticoide y otros agentes quimioterapéuticos, así como radioisótopos tales como At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, $Bi^{212 \text{ o } 213}$, P^{32} e isótopos radiactivos de Lu incluyendo Lu^{177}. Los anticuerpos también pueden estar conjugados a una anzima activadora de profármaco anti-cancer capaz de convertir el profármaco a su forma activa.

Como se usa aquí, el término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños son dos sitios de enlace a antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena de polipéptido (VH-VL). Usando un enlazante que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios son forzados a emparejarse con los dominios de complementariedad de otra cadena y crear dos sitios de enlace de antígeno. Los Diacuerpos se describen más totalmente en, e.g., EP 404,097; WO 93/11161; y Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 90:6444-48 (1993).

El "producto de gen" se usa aquí para indicar un péptido/proteína o mRNA. Por ejemplo, un "producto de gen de la invención" es algunas veces referido aquí como una "secuencia de amino ácido de cáncer", "proteína de cáncer", "proteína de un cáncer listado en la Tabla I", un "mRNA de cáncer", "mRNA de un cáncer listado en la Tabla I", etc. En una realización, la proteína de cáncer es codificada por un ácido nucleico de la Figura 2. La proteína de cáncer puede ser un fragmento, o alternativamente, ser la proteína de longitud total codificada por los ácidos nucleicos de la Figura 2. En una realización, una secuencia de amino ácido de cáncer se usa para determinar la identidad de secuencia o similitud. En otra realización, las secuencias son variantes alélicos que se encuentran naturalmente de una proteína codificada por un ácido nucleico de la Figura 2. En otra realización, las secuencias son variantes de secuencia como se describe mejor aquí.

Los anticuerpos "heteroconjugados" son útiles en los presentes métodos y composiciones. Como se usa aquí, el término "anticuerpo heteroconjugado" se refiere a dos anticuerpos unidos covalentemente. Tales anticuerpos se

pueden preparar usando métodos conocidos en química de proteína sintética, incluyendo el uso de agentes de reticulación. Ver, e.g., Patente U.S. No. 4,676,980.

Los ensayos de "selección de alto desempeño" para la presencia, ausencia, cuantificación, u otras propiedades de ácido nucleicos particulares o productos de proteína son bien conocidos por los expertos en la técnica. Igualmente, los ensayos de enlace y ensayos de gen reportero son también bien conocidos. Así, e.g., la Patente U.S. No. 5,559,410 revela métodos de selección de alto desempeño para proteínas; la Patente U.S. No. 5,585,639 revela métodos de selección de alto desempeño para el enlace de ácido nucleico (i.e., en arreglos); mientras que las Patentes U.S. Nos. 5,576,220 y 5,541,061 revelan métodos de alto desempeño para el enlace de ligando/anticuerpo.

Adicionalmente, los sistemas de selección de alto desempeño están disponibles comercialmente (ver, e.g., Amersham Biosciences, Piscataway, NJ; Zymark Corp., Hopkinton, MA; Air Technical Industries, Mentor, OH; Beckman Instruments, Inc. Fullerton, CA; Precision Systems, Inc., Natick, MA; etc.). Estos sistemas típicamente automatizan procedimientos enteros, incluyendo todo el pipeteado de muestras y reactivos, administración de líquidos, incubaciones cronometradas, y lecturas finales de la microplaca en el(los) detector(es) para el ensayo. Estos sistemas configurables proveen alto desempeño e inicio rápido así como un alto grado de flexibilidad y adaptabilidad. Los fabricantes de tales sistemas proveen protocolos detallados para varios sistemas de alto desempeño. Así, e.g., Zymark Corp. provee boletines técnicos que describen los sistemas de seleccion para detector la modulación de la transcrupción de gen, en elnace de ligando, y similares.

El término "homólogo" se refiere a una molécula que exhibe homología a otra molécula, por ejemplo, teniendo secuencias de residuos químicos que son iguales o similares en las posiciones correspondientes.

En una realización, el anticuerpo proporcionado es un "anticuerpo humano". Como se usa aquí, el téermino "anticuerpo humano" se refiere a un anticuerpo en el cual esencialmente las secuencias enteras de las secuencias de cadena ligera y cadena pesada, incluyendo las regiones determinantes de complementariedad (CDRs), son de genes humanos. En una realización, los anticuerpos monoclonales humanos se preparan mediante la técnica de trioma,

la técnica de célula B humana (ver, e.g., Kozbor, *et al., Immunol. Today* 4: 72 (1983), la técnica de transformación EBV (*ver, e.g., Cole et al.* MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY 77-96 (1985)), o usando despliegue del fago (*ver, e. g., Marks et al., J. Mol. Biol.* 222:581(1991)). En una realización específica, el anticuerpo humano es generado en un ratón transgénico. Las técnicas para hacer tales anticuerpos parcialmente a totalmente humanos son conocidas en la técnica y se puede usar cualquiera de estas técnicas. De acuerdo con una realización particularmente preferida, las secuencias de anticuerpo totalmente humano se hacen en un ratón transgénico diseñado para expresar los genes de anticuerpo de cadena pesada y ligera humana. Una descripción ejemplar para preparar ratones trasngénicos que producen anticuerpos humanos se encuentra en la Solicitud No. WO 02/43478 y la Patente de los Estados Unidos 6,657,103 (Abgenix) y su progenia. Las células B de ratones transgénicos que producen el anticuerpo deseado se pueden fusionar para hacer líneas celulares de hibridoma para producción continua del anticuerpo. Ver, e.g., Patentes U.S. Nos. 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016; y 5,545,806; y Jakobovits, *Adv. Drug Del. Rev.* 31:33-42 (1998); Green, *et al., J. Exp. Med.* 188:483-95 (1998).

El "Antígeno de leucocito humano" o "HLA" es una Proteína de Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) de clase I o clase II humana (ver, e.g., Stites, et al., IMMUNOLOGY, 8ª ED., Lange Publishing, Los Altos, CA (1994).

Como se usa aquí, el término "anticuerpo humanizado" se refiere a formas de anticuerpos que contienen secuencias de anticuerpos no humanos (e.g., murino) así como anticuerpos humanos. Tales anticuerpos son anticuerpos quiméricos que contienen secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todo o de al menos uno, y típicamente dos dominios variables, en los cuales todos o sustancialmente todas las asas hipervariables corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son aquellas de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), típicamente la de una inmunoglobulina humana. Ver e.g., Cabilly Patente U.S. No. 4,816,567; Queen et al. (1989) *Proc. Nat'l Acad. Sci.* USA 86:10029-10033; y ANTIBODY ENGINEERING: A PRACTICAL APPROACH (Oxford University Press 1996).

Los términos "hibrida", "que hibrida", "se hibrida" y similares, usados en el contexto de polinucleótidos, se refieren a condiciones de hibridación convencionales, preferiblemente tales como hidridación en 50% de formamida/6XSSC/0.1 % de SDS/100 µg/ml de ssDNA, en las cuales las temperaturas para hibridación están por encima de los 37 grados C y las temperaturas para lavado en 0.1 X SSC/0.1 % de SDS están por encima de los 55 grados C.

Las frases "aislado" o "biológicamente puro" se refieren a material que está sustancialmente o esencialmente libre de componentes que normalmente acompañan el material como se encuentra en su estado nativo. Así, los péptidos aislados de acuerdo con la invención preferiblemente no contienen materiales normalmente asociados con los péptidos en su ambiente *in situ*. Por ejemplo, se dice que un polinucleótido está "aislado" cuando es sustancialmente separado de polinucleótidos contaminantes que corresponden o son complementarios a genes diferentes a los genes STEAP-1 o que codifican polipéptidos diferentes al producto del gen de STEAP-1 o fragmentos de los mismos. Un experto puede emplear fácilmente procedimientos de aislamiento de ácido nucleico para obtener un polinucleótido de STEAP-1 aislado. Se dice que una proteína está "aislada", por ejemplo, cuando se emplean métodos físicos, mecánicos o químicos para remover las proteínas de STEAP-1 de constituyentes celulares que están normalmente asociados con la. Un experto puede fácilmente emplear métodos de purificación estándar para obtener una proteína de STEAP-1 aislada. Alternativamente, una proteína aislada se puede preparar por medios químicos.

"Etiquetas" adecuadas incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, mitades fluorescentes, mitades quimioluminescentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de tales etiquetas incluyen las Patentes U.S. Nos. 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; y 4,366,241. Adiconalmente, los anticuerpos proporcionados aquí pueden ser útiles como el componente de enlace a antígeno de fluorocuerpos. Ver e.g., Zeytun et al., *Nat. Biotechnol.* 21:1473-79 (2003).

El término "mamífero" se refiere a cualquier organismo clasificado como un mamífero, incluyendo ratones, ratas, conejos, perros, gatos, vacas, caballos y humanos. En una realización de la invención, el mamífero es un ratón. En otra realización de la invención, el mamífero es un humano.

Los términos "cáncer de prostate metastásico" y "enfermedad metastásica" significan cáncer de próstatas que seha diseminado a los nodos linfátivcos regiónales o a sitios distantes, y pretende incluir enfermedad en estado D bajo el sistema AUA y TxNxM+ bajo el sistema TNM. Como es el caso del cáncer de prostate avanzado localmente, la cirujía generalmente no es indicada para pacientes con enfermedad metastásica, y la terapia hormonal (ablación andrógena) es una modalidad de tratamiento prferida. Los pacientes con cáncer de próstata metastásico eventualmente desarrollan un estado que no responde a andrógeno dentro de los 12 a 18 meses del inicio del tratamiento. Aproximadamente la mitad de estos pacientes que no responden a andrógenos mueren dentro de los 6 meses después del desarrollo de ese estatus. El sitio más común para la metástasis del cáncer de próstata es el hueso. Las metastasis de hueso por cáncer de próstata son usualmente osteoblásticas en lugar de osteolíticas (i.e., produciendo la formación de hueso en red). Las metástasis de hueso se encuentran más frecuentemente en la espina, seguida por el fémur, pelvis, caja toráxica, cráneo y húmero. Otros sitios comunes para metástasis incluyen los nodos linfátivos, pulmón, hígado y cerebro. El cáncer de próstata metastásico típicamente se diagnostica por linfadenectomía pélvica abierta o laparoscópica, barridos de radionúclido de cuerpo entero, radiografía esquelética, y/o biopsia de lesión de hueso.

El término "modulador" o "compuesto de prueba" o "fármaco candidato" o equivalentes gramaticales, como se usan aquí describen cualquier molécula, e.g., proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, etc., a ser probada para la capacidad de alterar directa o indirectamente el fenotipo del cáncer o la expresión de una secuencia de cáncer, e.g., una secuencia de ácido nucleico o proteína, o efectos de las secuencias de cáncer (e.g., señalización, expresión del gen, interacción de proteína, etc). En un aspecto, un modulador neutralizará el efecto de una proteína de cáncer de la invención. Por "neutralizar" se entiende que una actividad de una proteína es inhibida o bloqueada, junto con el efecto consecuente en la célula. En otro aspecto, un modulador neutralizará el efecto de un gen, y su proteina correspondiente de la invención normalizando los niveles de dicha proteína. En realizaciones preferidas, los moduladores alteran los perfiles de expresión, o la expresión de expresión de ácidos nucleicos o proteínas proporconada aquí, o las rutas efectoras descendentes. En una realización, el modulador suprime un fenotipo de cáncer, e.g. a una huella de tejido normal. En otra realización, un modulador indujo un fenotipo de cáncer.

Generalmente se corre una pluralidad de mezclas de ensayos en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diferentes concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, i.e., a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los moduladores, fármacos candidatos o compuestos de prueba abarcan numerosas clases químicas, aunque son típicamente moléculas orgánicas, preferiblemente compuestos orgánicos pequeños que tienen peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2,500 Daltons. Las moléculas pequeñas preferidas son de menos de 2000, o menos de 1500 o menos de 1000 o menos de 500 D. Los agentes candidatos comprenden grupos funcionales necesarios para la interacción estructural con proteínas, particularmente enlace de hidrógeno, e incluyen típicamente al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo o carboxilo, preferiblemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los agentes candidatos usualmente comprenden estructuras de carbono cíclico o heterocíclico y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los moduladores comprenden también biomoléculas tales como péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos. Los péptidos son particularmente preferidos. Una clase de moduladores son los péptidos, por ejemplo de aproximadamente cinco a aproximadamente 35 amino ácidos, siendo preferidos de aproximadamente cinco a aproximadamente 20 amino ácidos, y diendo particularmente preferidos de aproximadamente 7 a aproximadamente 15. Preferiblemente, la proteína moduladora de cáncer es soluble, incluye una región de no transmembrana, y/o, tiene un Cis en el N-terminal para ayudar a la solubilidad. En una realización, el C-terminal de fragmento se mantiene como un ácido libre y el N-terminal es una amina libre para ayudar al acoplamiento, i.e., a cisteína. En una realización, una proteína de cáncer de la invención está conjugada a un agente imunogénico como se discute aquí. En una realización, la proteína de cáncer está conjugada a BSA. Los péptidos de la invención, e.g., de longitudes preferidas, pueden estar enlazados entre sí o a otros amino ácidos para crear un péptido/proteína mas grande.

Los péptidos moduladores pueden ser digestiones de proteínas que se encuentran naturalmente como se indicó anteriormente, péptidos aleatorios, o péptidos aleatorios "preferidos". En una realización preferida, los moduladores

basados en péptido/proteína son anticuerpos, y fragmentos de los mismos, como de define aquí.

Los moduladores de cáncer también pueden ser ácidos nucleicos. Los agentes moduladores de ácido nucleico pueden ser ácidos nucleicos que se encuentran naturalmente, ácidos nucleicos aleatorios, o ácidos nucleicos aleatorios "preferidos". Por ejemplo, se pueden usar digestiones de genomas procarióticos o eucarióticos en un criterio análogo al indicado antes para proteínas.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, i.e., los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por mitaciones posibles que se encuentran naturalmente, que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un epítopo antigénico simple. En contraste, las preparaciones de anticuerpo convencionales (policlonales) incluyen típicamente una multitud de anticuerpos dirigidos contra (o específicos para) diferentes epítopos. En una realización, el anticuerpo policlonal contiene una pluralidad de anticuerpos monoclonales con diferentes especificidades, afinidades o avideces de epítopo, dentro de un solo antígeno que contiene múltiples epítopos antigénicos. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a ser usados de acuerdo con la presente invención pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito primero por Kohler et al., *Nature* 256: 495 (1975), o puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante (ver, e.g., Patente U.S. No. 4,816,567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden ser aislados de bibliotecas de anticuerpo de fago usando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991), por ejemplo. Estos anticuerpos monoclonales se enlazarán usualmente con al menos un K_d de aproximadamente 1 mM, más usualmente al menos aproximadamente 300 nM, típicamente al menos aproximadamente 30 nM, preferiblemente al menos aproximadamente 10 nM, más preferiblemente al menos aproximadamente 3 nM o mejor, usualmente determinado por ELISA.

Un "motivo', como un motivo biológico de una porteína relacionada de STEAP-1, se refiere a cualquier patron de amino ácidos que forman parte de la secuencia primaria de una proteína, que está asociada con una función particular (e.g. interacción proteína-proteína, interacción proteína-ADN, etc) o modificación (e.g. que está fosforilada, glicosilada o amidada), o localización (e.g. secuencia secretora, secuencia de localización nuclear, etc.) o una secuencia que está correlacionada con ser inmunogénicas, ya sea humoralmente o celularmente. Un motivo puede ser contiguo o capaz de ser alineado a ciertas posiciones que están generalmente correlacionadas con una cierta función o propiedad. En el contexto de los motivos de HLA, "motivo' se refiere al patron de residuos en un péptido de longitud definida, usualmente un péptido de aproximadamente 8 a aproximadamente 13 amino ácidos para un motivo de HLA clase I y de aproximadamente 6 a aproximadamente 25 amino ácidos para un motivo de HLA clase II, que es reconocido por una molécula de HLA particular. Los motivos de péptido para el enlace a HLA son típicamente diferentes para cada proteína codificada por cada alelo de HLA humano y difieren en el patrón de los residuos de anclaje primario y secundario.

Un "excipiente farmacéutico" comprende un material tal como un adyuvante, un vehículo, agentes ajustadores de pH y amortiguadores, agentes ajustadores de tonicidad, agentes humectantes, preservativos, y similares.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que es no tóxica, inerte, y/o que es fisiológicamente compatible con humanos u otros mamíferos.

El término "polinucleótido" significa una forma polimérica de nucleótidos de al menos 10 bases o pares bases de longitud, ya sea ribonucleótidos o deoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido, y pretende incluir formas de cadena simpe y dobre de ADN y/o RNA. En la técnica, este término usualmente se utiliza intercambiablemente con "oligonucleótido". Un polinucleótido puede comprende una secuencia de nucleótido revelada aquí, en donde la timidina (T), como se muestra, por ejemplo, en la Figura 2, también puede ser uracilo (U); esta definición está relacionada con las diferencias entre las estructuras químicas del ADN y RNA, en particular la observación que unoa de las cuatro bases importantes en el ARN es uracilo (U) en lugar de timidina (T).

El término "polipéptido" significa un polímero de al menos aproximadamente 4, 5, 6, 7, u 8 amino ácidos. A través de la descripción se usan las designaciones estándar de tres letras o letra simple para amino ácidos. En la técnica, este término se utiiliza usualmente intercambiablemente con "péptido" o "proteína".

Un "residuo de anclaje primario" de HLA es un amino ácido en una posición específica junto con una secuencia de péptido que se entiende que provee un punto de contacto entre el péptido inmunogénico y la molécula de HLA. Uno a tres, usualmente dos, residuos de anclaje primario dentro de un péptido de longitud definida define generalmente un "motivo' para un péptido inmunogénico. Se entiende que estos residuos se ajustan cercanamente con el surco de enlace de péptido de una molécula de HLA, con sus cadenas laterales enterradas en bolsillos específicos del surco de enlace. En una realización, por ejemplo, los residuos de anclaje primario para una molécula de HLA clase I están localizados en la posición 2 (desde la posición terminal de amino) y en la posición terminal de carboxilo de un epítopo de péptido de 8, 9, 10, 11, o 12 residuos de acuerdo con la invención. Alternativamente, en otra realización, los residuos de anclaje primarios de un péptido que se enlazan a una molécula de HLA clase II están espaciados entre sí, en lugar de a los terminales de un péptido, en donde el péptido es generalmente de al menos 9 amino ácidos de longitud. Las posicones de anclaje primarias para daca motivo y supermotivo se indicant en la Tabla IV(a). Por ejemplo, los péptidos análogos pueden ser creados alterando la presencia o ausencia de residuos particulares en las posiciones de anclaje primaria y/o secundaria mostradas en la Tabla IV. Tales análogos se usan para modular la afinidad de enlace y/o cubrimiento de población de un péptido que comprende un motivo o supermotivo de HLA particular.

"Radioisótopos" incluyen, pero no se limitan los siguientes usos ejemplares (no limitantes indicados en la Tabla IV(I)).

Por "aleatorio" o equivalentes gramaticales de aquí, aplicados a ácidos nucleicos y proteínas se refiere que cada ácido nucleico y péptido consiste de nucleótidos y amino ácidos esencialmente aleatorios, respectivamente. Estos péptidos aleatorios (o ácido nucleicos, discutidos aquí) pueden incorporar cualquier nucleótido o amino ácido en cualquier posición. El proceso sintético puede ser diseñado para generar proteínas o ácidos nucleicos aleatorios, para permitir la formación de todas o la mayoría de las combinaciones posibles sobre

la longitud de la secuencia, formando así una biblioteca de agentes proteináceos bioacrtivos candidatos aleatorios.

En una realización, una biblioteca es "totalmente aleatoria" sin preferencias de secuencias o constantes en ninguna posición. En otra realización, la biblioteca es una biblioteca "aleatoria preferida". Esto es, algunas posiciones dentro de la secuencia son están ya sea constantes, o son seleccionadas de un número limitado de posibilidades. Por ejemplo, los nucleótidos o residuos de amino ácido son aleatorios dentro de una clase definida, e.g., de amino ácidos hidrofóbicos, residuos hidrofílicos, residuos estéricamente preferidos (ya sea pequeños o grandes), hacia la creación de dominios de enlace de ácido nucleico, la creación de cisteínas, para reticulación, prolinas para dominios SH-3, serinas, treoninas, tirosinas o histidinas para sitios de fosforilación, etc., o para purinas, etc.

Una "molécula de ADN o ARN" es una molécula de ADN o ARN que ha sido sometida a manipulación molecular *in vitro*.

Como se usa aquí, el término anticuerpo "Fv de cadena sencilla" o "scFv" o de "cadena sencilla" se refiere a fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en donde estos dominios están presentes en una cadena de polipéptido simple. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un enlazante de polipéptido entre los dominios VH y VL que permite al sFv formar la estructura deseada para el enlace de antígeno. Para una revisión de sFv, *ver* Pluckthun, THE PHARMACOLOGY OF MONOCLONAL ANTIBODIES, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994).

Ejemplos no limitantes de "moléculas pequeñas" incluyen compuestos que se enlazan o interactúan con STEAP-1, ligandos incluyendo hormonas, neuropéptidos, quimioquinas, odorantes, fosfolípidos, y equivalentes funcionales de los mismos que se enlazan y preferiblemente inhiben la función de proteína STEAP-1. Tales moléculas pequeñas no limitantes tienen preferiblemente un peso molecular de menos de aproximadamente 10 kDa, más preferiblemente por debajo de aproximadamente 9, aproximadamente 8, aproximadamente 7, aproximadamente 6, aproximadamente 5 o aproximadamente 4 kDa. En ciertas realizaciones, las moléculas pequeñas se asocian físicamente con, o se enlazan a la proteína de STEAP-1; no se

encuentran en rutas metabólicas que ocurren naturalmente; y/o son más solubles en soluciones acuosas que en no acuosas.

Como se usa aquí, el término "específico" se refiere al enlace selectivo del anticuerpo al epítopo de antígeno objetivo. Los anticuerpos pueden ser probados para expecificidad de enlace comparando el enlace al antígeno apropiado al enlace a antígeno irrelevante o mexcla de antígeno bajo un conjunto de condiciones dado. Si el anticuerpo se enlaza al antígeno apropiado a al menos 2, 5, 7, y preferiblemente 10 veces más que al antígeno irrelevante o mezcla de antígeno, entonces se considera que es específico. En una realización, un anticuerpo específico es uno que se enlaza solamente al antígeno de STEAP-1, pero no se enlaza al antígeno irrelevante. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se enlaza al antígeno STEAP-1 humano pero no se enlaza al antígeno STEAP-1 no humano con homología de amino ácido 70%, 75%, 80%, 85%, 90%,91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o mayor con el antígeno STEAP-1. En otra realización, un anticuerpo específico es uno que se enlaza al antígeno STEAP-1 humano y se enlaza al antígeno STEAP-1 murino, pero con un mayor grado de enlace al antígeno humano. En otra realización, un anticuerpo específco es uno que se enlaza al antígeno STEAP-1 humano y se enlaza al antígeno STEAP-1 de primate, pero con un mayor grado de enlace al antígeno humano. En otra realización, el anticuerpo específico se enlaza al antígeno STEAP-1 humano y a cualquier antígeno STEAP-1 no humano, pero con un meyor grado de enlace al antígeno humano o cualquier combinación del mismo.

La "severidad" de las reacciones de hibridación es fácilemente determinada por el experto en la técnica, y generalmentees un cálculo empírico dependiente de la longitud de la sonda, la temperatura de lavado, ty la concentración de sal. En general, sondas más grandes requieren de mayores temperaturas para el recocido apropiado, mientras que sondas más cortas necesitan temperaturas más bajas. La hibridación depende generalmente de la habilidad de las secuencias de ácido nucleico desnaturalizadas para recocerse cuando cadenas complementarias están presentes en un ambiente por debajo de su temperatura de fusión. A mayor grado de homología deseada entre la sonda y la secuencia hibridable, mayor la temperatura relative que se puede usar. Como resultado, sigue que las temperatures relativamente meyores tenderían a hacer a las condiciones de reacción más severas, mientras que temperaturas menores, a menos severas. Para detalles adicionales y

explicación de la severidad de hibridación, ver Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Condiciones severas" o "condiciones de alta severidad", como se definen aquí, son identificadas por, pero sin limitarse a, aquellas que: (1) emplean baja fuerza iónica y alta temperatura de lavado, por ejemplo cloruro de sodio 0.015 M /citrato de sodio 0.0015 M / 0.1 % de dodecil sulfato de sodio a 50 °C; (2) emplean durante la hibridación un agente de desnaturalización, tal como formamida, por ejemplo, 50% (v/v) de formamida con 0.1% de albúmina de suero bovino/ 0.1 % de Ficoll/ 0.1% de polivinilpirrolidona/ amortiguador de fosfato de sodio 50 mM a pH 6.5 con cloruro de sodio 750 mM, citrato de sodio 75 mM a 42 °C; o (3) emplean 50% de formamida, 5 x SSC (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075 M), fosfato de sodio 50 mM (pH 6.8), 0.1% de pirofosfato de sodio, 5 x solución de Denhardt, ADN de esperma de salmón sonicado (50 µg/ml), 0.1% de SDS, y 10% de sulfato de dextrano a 42 °C, con lavados a 42 °C en 0.2 x SSC (cloruro de sodio /citrato de sodio) y 50% de formamida a 55 °C, seguida por un lavado de alta severidad que consiste de 0.1 x SSC que contiene EDTA a 55 °C. Las "condiciones moderadamente severas" se describen en, pro sin limitarse a aquellas de Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, e incluyen el uso de solución de lavado y condiciones de hibridación (e.g., temperatura, fuerza iónica y % de SDS) menos severos que los descritos anteriormente. Un ejemplo de condicones moderadamente severas es incubación durante la noche a 65 °C en una solución que comprende: 1% de albúmina de suero bovino, fosfato de sodio 0.5M pH7.5, EDTA 1.25mM, y 7% de SDS 5 x SSC (NaCl 150 mM, citrato trisódico 15 mM), seguido por lavado de los filtros en 2 xSSC/ 1% de SDS a 50 °C y 0.2 X SSC/0.1% de SDS a 50 °C. El experto reconocerá cómo ajustar la temperatura, fuerza iónica, etc., según sea necesario para acomodar factores tales como longitud de sonda y similares.

Un "supermotivo" de HLA es una especificidad de enlace de péptido compartida por moléculas de HLA codificadas por dos o más alelos de HLA. Las frecuencias fenotípicas globales de supertipos de HLA en diferentes poblaciones étnicas se indican en la Tabla IV (f). Los constituyentes no limitantes de varios supertipos son los siguientes:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

El cubrimiento de población calculado producido por diferentes combinaciones de supertipo de HLA se indican en la Tabla IV(g).

Como se usa aquí "tratar" o "terapéutico" y términos gramaticalmente relacionados, se refieren a cualquier mejoramiento de cualquier consecuencia de la enfermedad, tal como supervivencia prolongada, menor morbilidad, y/o una disminución de los efectos secundarios que con los subproductos de una modalidad terapéutica alternativa; como se aprecia fácilmente en la técnica, la erradicación total de la enfermedad es aunque preferido, no un requerimiento para un acto de tratamiento.

Un "animal transgénico" (e.g., un ratón o rata) es un animal que tiene células que contienen un transgen, cuyo transgen fue introducido en el animal o un ancestro del animal en un estado prenatal, e.g., un estado embriónico. Un "transgen" es un DNA que está integrado en el genoma de una célula desde la cual un animal transgénico se desarrolla.

Como se usa aquí, un HLA o "vacuna" de respuesta inmune celular es una composición que contiene o codifica uno o más péptidos de la invención. Hay numerosas realizaciones de tales vacunas, tales como un coctel de uno o más péptidos individuales; uno o más péptidos de la invención comprendidos por un péptido polipépitótico; o ácidos nucleicos que codifican tales polipéptidos individuales o polipéptidos, e.g., cun minigen que codifica un péptido poliepitópico. El "uno o más péptidos" puede incluir cualquier número entero de 1-150 o más, e.g., al menos 2, 3, 4, 5, 6,7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95,100,105, 110,115,120,125,130,135,140, 145, o 150 o más péptidos de la invención. Los péptidos o polipéptidos pueden opcionalmente ser modificados,

tal como mediante lipidación, adición de objetivos u otras secuencias. Los péptidos HLA clase I de la invención pueden ser mezclados, o estar enlazados a péptidos HLA clase II, para facilitar la activación de los linfocitos T citotóxicos y linfocitos T auxiliares. Las vacunas de HLA también pueden comprender células que presentan antígeno pulsado por péptido, e.g., células dendríticas.

El término "variante" se refiere a una molécula que exhibe una forma de variación de un tipo o norma descrita, tal como una proteína que tiene uno o más residuos de amino ácido diferentes en la(s) posición(es) correspondientes de una proteína descrita específicamente (e.g. la proteína de STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3. Un análogo es un ejemplo de una proteína variante. Las isoformas de empalme y polimorfismos de nucleótidos simples (SNPs) son ejemplos adicionales de variantes.

Las "proteínas relacionadas con STEAP-1" de la invención incluye aquellas específicamente identificadas aquí, así como variantes alélicos, variantes de sustitución conservadora, análogos y homólogos que pueden ser aislados/generados y caracterizados sin experimentación indebida seguida de los métodos indicados aquí, o fácilmente disponibles en la técnica. También están incluidas proteínas de fusión que combinan partes de diferentes proteínas de STEAP-1 o fragmentos de las mismas, así como proteínas de fusión de una proteína STEAP-1 y un polipéptido heterólogo. Tales proteínas de STEAP-1 son colectivamente referidas como las proteínas relacionadas con STEAP-1, las proteínas de la invención, o STEAP-1. El término "proteína relacionada de STEAP-1" se refieren a un fragmento de polipéptido o una secuencia de proteína de STEAP-1 de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o más de 25 amino ácidos; o al menos 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 o más amino ácidos.

II.) Polinucleótidos de STEAP-1

Un aspecto de la invención provee polinucleótidos correspondientes o complementarios a todas o parte de un gen STEAP-1, mARN, y/o secuencia de codificación, preferiblemente en forma aislada, incluyendo polinucleótidos que codifican una proteína relacionada de STEAP-1 y fragmentos de las mismas, ADN, ARN, híbrido de ADN/ARN, y moléculas relacionadas, polinucleótidos o oligonucleótidos complementarios a un gen STEAP-1 o una secuencia de

mARN o una parte de los mismos, y polinucleótidos o oligonucleótidos que hibridan un gen STEAP-1, mARN, o a un polinucleótido que codifica STEAP-1 (colectivamente, "polinucleótidos STEAP-1"). En todas las instancias cuando se refieren a estos en esta sección, T puede ser también U en la Figura 2.

Las realizaciones de un polinucleótido de STEAP-1 incluyen: un polinucleótido de STEAP-1 que tiene la secuencia mostrada en la Figura 2, la secuencia de nucleótido de STEAP-1 como se muestra en la Figura 2, en donde T es U; al menos 10 nucleótidos contiguous de un polinucleótido que tiene la secuencia como se muestra en la Figura 2; o, al menos 10 nucleótidos contiguous de un polinucleótido que tiene la secuencia somo se muestra en la Figura 2, en donde T es U. Por ejemplo, las realizaciones de nucleotides de STEAP-1 comprenden, sin limitación:

(I) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una secuencia como se muestra en la Figura 2, en donde T puede ser también U;

(II) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2A, desde el residuo de nucleótido número 66 al residuo de nucleótido número 1085, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(III) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2B, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(IV) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2C, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 944, incluyendo un codón de detención, en donde T también puede ser U;

(V) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2D, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número

872, incluyendo el codón de detención, en donde T puede ser también U;

(VI) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2E, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(VII) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2F, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(VIII) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2G, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(IX) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2H, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(X) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en Figura 21, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser;

(XI) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2J, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XII) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2K, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XIII) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2L, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XIV) unpolinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2M, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XV) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2N, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XVI) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 20, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XVII) un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2P, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XVIII)un polinucleótido que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de la secuencia como se muestra en la Figura 2Q, desde el residuo de nucleótido número 96 al residuo de nucleótido número 872, incluyendo el codón de detención, en donde T también puede ser U;

(XIX) un polinucleótido que codifica una proteína relacionada de STEAP-1 que esl al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% homóloga a una secuencia de amino ácido entera mostrada en la Figura 2A-Q;

(XX) un polinucleótido que codifica una proteína relacionada de STEAP-1 que es ls al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identical a una secuencia de amino ácido entera mostrada en la Figura 2A-Q;

(XXI) un polinucleótido que codifica al menos un péptido indicado en las Tablas V-XVIII y XXII-LI como se indicant en la solicitud de Patente de Los

Estados Unidos 10/236,878 presentada el 06-Septiembre-2002, cuyos contenidos están totalmente incorporados para referencia aquí;

(XXII) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de las Figuras 3A en aumento de cualquier número entero hasta 339, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

(XXIII)un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor de menos de 0.5 en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

(XXIV)un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5,6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el porcentaje de residuos accesibles de la Figura 7;

(XXV) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 399 que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Flexibilidad promedio de la Figura 8;

(XXVI) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de giro Beta de la Figura 9;

(XXVII) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3B y 3D en cualquier incremento en número entero hasta 258, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

(XXVIII) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3B y 3D en cualquier incremento en número entero hasta 258, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor de menos de 0.5 en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

(XXIX)un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5,6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3B y 3D en cualquier incremento de número entero hasta 258, que incluyen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de en el perfil de Porcentaje de Residuos Accesibles de la Figura 7;

(XXX) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3B y 3D en cualquier incremento en número entero hasta 258, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8;

(XXXI)un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3B y 3D

en cualquier incremento en número entero hasta 258, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posicion(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de giro Beta de la Figura 9;

(XXXII) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3C en cualquier incremento en número entero hasta 282, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

(XXXIII) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3C en cualquier incremento en número entero hasta 282, que incluye 1, 2, 3, 4, 5,6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor de menos de 0.5 en el Perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

(XXXIV) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3C en cualquier incremento en número entero hasta 282, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Porcentaje de Residuos Accesibles de la Figura 7;

(XXXV) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3C en cualquier incremento en número entero hasta 282, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8;

(XXXVI) un polinucleótido que codifica una región de péptido de al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25,

26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de un péptido de la Figura 3C en cualquier incremento en número entero hasta 282, que incluye 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de giro Beta de la Figura 9;

(XXXVII) un polinucleótido que es totalmente complementario a un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVI);

(XXXVIII) un polinucleótido que es totalmente complementario a un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVII);

(XXXIX) un péptido que está codificado por cualquiera de (I) a (XXXVIII); y;

(XL) una composición que comprende un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) junto con un excipiente farmacéutico y/o en una forma de dosis de unidad humana;

(XLI) un método para usar un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) o una composición de (XL) en un método para modular una célula que expresa STEAP-1;

(XLII) un método para usar un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) o una composición de (XL) en un método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar a un individuo qhe porta una célula que expresa STEAP-1;

(XLIII) un método para usar un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) o una composición de (XL) en un método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un individuo que porta una célula que expresa STEAP-1, dicha célula de un cáncer de un tejido listado en la Tabla I; (XLIV) un método para usar un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) o una composición de (XL) en un método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un cáncer;

(XLV) un método para usar un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) o una composición de (XL) en un método para

diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un cáncer de un tejido listado en la Tabla I; y;

(XLVI)un método para usar un polinucleótido de cualquiera de (I)-(XXXVIII) o péptido de (XXXIX) o una composición de (XL) en un métodopara identificar o caracterizar un modulador de una célula que expresa STEAP-1.

Como se usa aquí, se entiende que un rango revela específicamente todas las posiciones de unidas enteras del mismo.

Realizaciones típicas de la invención reveladas aquí incluyen polinucleótidos de STEAP-1 que codifican porciones específicas de secuencias de mARN de STEAP-1 (y aquellas que son complementarias a tales secuencias) tales como las que codifican las proteínas y/o fragmentos de las mismas, for ejemplo:

(a) 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 o más amino ácidos contiguos del variante 1 de STEAP-1; las longitudes máximas relevantes para otros variantes relevantes son: variante 2, 258 amino ácidos; variante 3, 282 amino ácidos, y variante 4, 258 amino ácidos.

Por ejemplo, realizaciones representativas de la invención reveladas aquí incluyen: polinucleótidos y sus mismos péptidos codificados que codifican aproximadamente el amino ácido 1 a aproximadamente el amino ácido 10 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 10 a aproximadamente el amino ácido 20 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 20 a aproximadamente amino ácido 30 de la proteína STEAP-1 proteína mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 30 a aproximadamente el amino ácido 40 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 40 a aproximadamente el amino ácido 50 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 50 a aproximadamente el amino ácido 60 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3,

polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 60 a aproximadamente el amino ácido 70 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 70 a aproximadamente el amino ácido 80 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 80 a aproximadamente el amino ácido 90 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polinucleótidos que codifican aproximadamente el amino ácido 90 a aproximadamente el amino ácido 100 de la proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, en incrementos de aproximadamente 10 amino ácidos, terminando en el amino ácido terminal carboxilo indicado en la Figura 2 o Figura 3. En consecuencia, los polinucleótidos que codifican porciones de la secuencia de amino ácido (de aproximadamente 10 amino ácidos), de amino ácidos, 100 a través del amino ácido terminal de carboxilo de la proteína STEAP-1 son realizaciones de la invención. En donde se entiende que cada posición de amino ácido particular revela esa posición más o menos cinco residuos de amino.

Los polinucleótidos que codifican porciones relativamente largas de una proteína STEAP-1 también están dentro del alcance de la invención. Por ejemplo, los polinucleótidos que codifican de aproximadamente el amino ácido 1 (o 20 o 30 o 40, etc.) a aproximadamente el amino ácido 20, (o 30, o 40 o 50, etc.) de la proteína STEAP-1 "o variante" mostrada en la Figura 2 o Figura 3 pueden ser generados mediante una variedad de técnicas bien conocidas en la técnica. Estos fragmentos de polinucleótido pueden incluir cualquier porción de la secuencia de STEAP-1 como se muestra en Figura 2.

Realizaciones ilustrativas adicionales de la invención reveladas aquí incluyen fragmentos de polinucleótido de STEAP-1 que codifican uno o más de los motivos biológicos contenidos en una secuencia de proteína STEAP-1 "o variante", incluyendo una o más de las secuencias que portan motivo de una proteína STEAP-1 "o variante" indicadas en las Tablas V-XVIII y XXII-LI. En otra realización, los fragmentos de polinucleótido típicos de la invención codifican una o más de las regiones de la proteína STEAP-1 o variante que exhibe homología a una molécula conocida. En otra realización de la invención, fragmentos de polinucleótido típicos pueden codificar uno o más de los sition de N-glicosilación de la proteína STEAP-1 o variante, sitios de fosforilación de proteína cinasa dependiente de cAMP y cGMP, sitios de fosforilación de caseína cinasa II o sitio de N-miristoilación y sitios de amidación.

Note que para determinar la posición de inicio de cualquier péptido indicado en las Tablas V-XVIII y Tablas XXII a LI (colectivamente Tablas de Péptido de HLA) con respecto a su proteína base, e.g., variante 1, variante 2, etc., se hace referencia a tres factores: el variante particular, la longitud del péptido en una Tabla de Péptido de HLA, y los Péptidos Buscados listados en la Tabla LII. Generalmente, se usa un Péptido de Búsqueda única para obtener péptidos de HLA para un variante particular. La posición de cada Péptido de Búsqueda con relación a su molécula base respectiva se lista en la Tabla LII. En consecuencia, si un Péptido de Búsqueda empieza en la posición "X", se debe agregar el valor "X menos 1" a cad aposición en las Tablas V-XVIII y Tablas XXII-LI para obtener la posición real de los péptidos de HLA en su molécula base. Por ejemplo, si un Péptido de Búsqueda particular empieza en la posición 150 de su molécula base, se debe agregar 150 -1, i.e., 149 a cada posición de amino ácido de péptido de HLA para calcular la posición de ese amino ácido en la molécula base.

II.A.) Usos de los polinucleóticos de STEAP-1

II.A.1.) Monitoreo de Anormalidades Genéticas

Los polinucleótidos de los párrafos anteriores tienen un número de diferentes usos específicos. El gen STEAP-1 humano mapea la ubicación cromosómica indicada en el Ejemplo titulado "Mapeo cromosómico de STEAP-1." Por ejemplo, como el gen STEAP-1 mapea a este cromosoma, los that que codifican diferentes regiones de las proteínas de STEAP-1 se usan para caracterizar las anormalidades citogenéticas de este escenario cromosómico, se identifica que tales anormalidades están asociadas con varios cánceres. En ciertos genes, una variedad de anormalidades cromosómicas incluyendo redistribuciones, han sido identificadas como anormalidades citogenéticas frecuentes en un número de diferentes cánceres (ver e.g., Krajinovic *et al.*, Mutat. Res. 382 (3-4): (1998); Johansson *et al.*, Blood 86 (10): (1995) y Finger *et al.*, P.N.A.S. 85 (23): 9158-9162 (1988)). Así, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de las proteínas de STEAP-1 proveen herramientas nuevas que se pueden usar para delinear, con mayor precisión que lo posible anteriormente, anormalidades citogenéticas en la región cromosómica que codifica STEAP-1, que puede contribuir al fenotipo maligno. En este contexto, estos polinucleótidos satisfacen una necesidad en la técnica de expander la sensibilidad de la selección cromosómica con el fin de identificar

anormalidades cromosómicas más delicadas y menos comunes (ver, e.g. Evans *et al.*, Am. J. Obstet. Gynecol 171 (4):1055-1057 (1994)).

Adiconalmente, como STEAP-1 mostró estar altamente expresada en próstata y otros cánceres, los polinucleótidos de STEAP-1 se usan en métodos para evaluar el estatus de los productos del gen STEAP-1 en tejidos normales versus cancerosos. Típicamente, los polinucleótidos que codifican regiones específicas de las proteínas de STEAP-1 se usan para evaluar la presencia de perturbaciones (tales como eliminaciones, inserciones, mutaciones puntuales, o alteraciones que producen una pérdida de un antígeno, etc.) en regiones específicas del gen STEAP-1, tales como regiones que contienen uno o más motivos. Ensayos ejemplares incluyen ensayos de RT-PCR así como análisis de polimorfismo de conformación de cadena sencilla (SSCP) (ver, e.g., Marrogi et al., J. Cutan. Pathol. 26 (8): 369-378 (1999), los cuales ambos utilizan polinucleótidos que codifican regiones específicas de una proteína para examinar estas regiones dentro de la proteína.

II.A.2.) Realizaciones Antisentido

Otras realizaciones de la invención relacionadas con ácido nucleico específicamente contemplado reveladas aquí son ADN, cADNs, ribozimas, y moléculas antisentido, así como moléculas de ácido nucleico basadas en un esqueleto alternativo, o incluyendo bases alternativas, ya sea derivadas de fuentes naturales o sintetizadas, e incluyen moléculas capaces de inhibir el ARN o la expresión de proteína de STEAP-1. Por ejemplo, las moléculas antisentido pueden ser ARNs u otras moléculas, incluyendo moléculas de ácidos nucleicos de péptido (PNAs) o moléculas diferentes a ácido nucleico, tales como derivados de fosforotioato que se enlazan específicamente a ADN o ARN de una manera dependiente del par base. Un experto puede obtener fácilmente estas clases de moléculas de ácido nucleico usando los polinucleótidos de STEAP- 1 y las secuencias de polinucleótido reveladas aquí.

La tecnología antisentido involucra la administración de oligonucleótidos exogenous que se enlazan a un polinucleótido objetivo localizado dentro de las células. El término "antisetido" se refiere al hecho que tales oligonucleótidos son complementarios a sus objetivos intracelulares, e.g., STEAP-1. Ver por ejemplo, Jack Cohen, Oligodeoxynucleótidos, Antisense Inhibitors of Gene Expression, CRC Press, 1989; y Synthesis 1: 1-5 (1988). Los oligonucleótidos antisentido de STEAP-1 de la presente invención incluyen derivados tales como S-

oligonucleótidos (derivados de fosforotioato o S-oligos, ver, Jack Cohen, *supra*), que exhiben acción inhibidora de crecimiento celular de cáncer mejorada. Los S-oligos (fosforotioatos de nucleósido) son análogos isoelectrónicos de un oligonucleótido (O-oligo) en los cuales un átomo de oxígeno de no puente del grupo fosfato es reemplazado por un átomo de azufre. Los S-oligos de la presente invención se pueden preparar mediante tratamiento de los O-oligos correspondientes con 3H-1,2-benzoditiol-3-ona-1,1-dióxido, que es un reactivo de transferencia de sulfóxido. Ver, e.g., Iyer, R. P. *et al.*, J. Org. Chem. 55:4693-4698 (1990); y Iyer, R. P. *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 112: 1253-1254 (1990). Oligonucleótidos antisentido de STEAP-1 adiconales de la presente invención incluyen oligonucleótidos antisentido de morfolino conocidos en la técnica (ver, e. g., Partridge *et al.*, 1996, Antisense & Nucleic Acid Drug Development 6:169-175).

Los oligonucleótidos antisentido de STEAP-1 de la presente invención pueden típicamente ser ARN o ADN que es complementario a y se hibrida establemente con los primeros 100 codones 5' o los últimos 100 codones 3' de una secuencia genómica de STEAP-1 o el mARN correspondiente. No se requiere complementariedad absoluta, aunque se prefieren altos grados de complementariedad. El uso de un oligonucleótido complementario a esta región permite la hibridación selective a mARN de STEAP-1 y no a mARN que especifica otras subunidades reguladoras de proteína quinasa. En una realización, los oligonucleótidos antisentido de STEAP-1 de la presente invención son fragmentos 15 a 30 meros de la molécula de ADN antisentido que tienen una secuencia que hibrida al mARN de STEAP-1. Opcionalmente, el oligonucleótido antisentido de STEAP-1 es un oligonucleótido de 30 meros que es complementario a una región en los primeros 100 codones 5' o los últimos 10 docones 3' de STEAP-1. Alternativamente, las moléculas antisentido son modificadas para emplear ribozimas en la inhibición de la expresión de STEAP-1, ver, e.g., L.A. Couture & D. T. Stinchcomb; *Trends Genet* 12: 510-515 (1996).

II.A.3.) Iniciadores y pares iniciadores

Realizaciones adicionales específicas de estos nucleótidos de la invención incluyen iniciadores y pares iniciadores, que permiten la amplificación específica de polinucleótidos de la invención o de cualquier parte específica de los mismos, y sondas que hibridan selectivamente o específicamente a moléculas de ácido nucleico de la invención o a cualquier parte de las mismas. Las sondas pueden estar marcadas con un marcador detectable, tal como, por

ejemplo, un radioisótopo, compuesto fluorescente, compuesto bioluminescente, un compuesto quimioluninescente, quelante de metal o enzima. Tales sondas e iniciadores se usan para detector la presencia de un polinucleótido de STEAP-1 en una muestra y como un medio para detectar una célula que expresa una proteína STEAP-1.

Ejemplos de tales sondas incluyen polipéptidos que comprende toda o parte de la secuencia de cADN de STEAP-1 humano mostrada en la Figura 2. Ejemplos de pares iniciadores capaces de amplificar específicamente mARNs de STEAP-1 también se describen en los Ejemplos. Como lo entenderá el experto, muchos iniciadores y sondas diferentes se pueden preparar con base en las secuencias proporcionadas aquí y usadas efectivamente para amplificar y/o detectar un mARN de STEAP-1.

Los polinucleótidos STEAP-1 de la invención son útiles para una variedad de propósitos, incluyendo, pero sin limitarse a su uso como sondas e iniciadores para la amplificación y/o detección del (los) gen(es) de STEAP-1, o fragmentos de los mismos; como reactivos para el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de próstata y otros cánceres; como secuencias de codificación capaces de dirigir la expresión de polipéptidos de STEAP-1; como herramientas para modular o inhibir la expresión de los gen(es) de STEAP-1 y/o traducción del (los) transcripto(s) de STEAP-1; como angentes terapéuticos.

La presente invención incluye el uso de cualquier sonda como se describe aquí para identificar y aislar un STEAP-1 o secuancia de ácido nucleico relacionada de STEAP-1 de una fuente que se encuentra naturalmente, tales como humanos u otros mamíferos, así como la secuencia de ácido nucleico aislada *per se*, que comprenderían todas o la mayoría de las secuencias encontradas en la sonda usada.

II.A.4.) Aislamiento de Moléculas de Ácido Nucleico que codifica STEAP-1

Las secuencias de cADN de STEAP-1 descritas aquí permiten el aislamiento de otros polinucleótidos que codifican el protucto(s) de gen STEAP-1, así como el aislamiento de polinucleótidos que codifican homólogos de producto(s) de gen STEAP-1, alternativamente isoformas empalmadas, variantes alélicas, y formas mutantes de un producto de gen STEAP-1 así como polinucleótidos que codifican análogos de proteínas relacionadas con STEAP-1.

Varios métodos de clonación molecular que se pueden emplear para aislar cADNs de longitud total que codifican un gen STEAP-1 son bien conocidos (ver, por ejemplo, Sambrook, J. *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, New York, 1989; Current Protocols in Molecular Biology. Ausubel et al., Eds., Wiley and Sons, 1995). Por ejemplo, las metodologóas de cloanción de fago lambda se pueden emplear convenientemente, usando sistemas de clonación disponibles comercialmente (e.g., Lambda ZAP Express, Stratagene). Los clones de fago que contienen cADNs de gen STEAP-1 se pueden identificar sondeando con un cADN de STEAP-1 marcado o un fragmento del mismo. Por ejemplo, en una realización, un cADN de STEAP-1 (e.g., Figura 2) o una porción del mismo se puede sinterizar y usar como una sonda para recuperar los cADNs de superposición y longitud total correspondientes a un gen STEAP-1. Un gen STEAP-1 en sí puede ser aislado mediante selección de bibliotecas de ADN genómico, bibliotecas de cromosoma artificial bacteriano (BACs), bibliotecas de cromosoma artificial de levadura (YACs), y similares, con sondas o iniciadores de ADN de STEAP-1.

II.A.5.) Moléculas de Ácido nucleico Recombinantes y Sistemas de Hospedero-Vector

La invención también provee moléculas de ADN o ARN recombinante que contienen un polinucleótido de STEAP-1, un fragmento, análogo u homólogo del mismo, incluyendo pero sin limitarse a fagos, plásmidos, fagémidos, cósmidos, YACs, BACs, así como varios vectores virales y no virales bien conocidos en la técnica, y las células transformadas o transfectadas con tales moléculas de ADN o ARN recombinante. Los métodos para generar tales moléculas son bien conocidas (ver, por ejemplo, Sambrook et al.,1989, *supra*).

La invención provee además un sistema de hospedero-vector que comprende una molécula de ADN recombinante que contiene un polinucleótido de STEAP-1, fragmento, análogo u homólogo del mismo dentro de una célula hospedera procariótica o eucariótica adecuada. Ejemplos de células hospedera eucarióticas adecuadas incluyen una célula de levadura, una célula de planta, o una célula animal, tal como una célula de mamífero o una célula de insecto (e.g., una célula infectable de baculovirus infectable tal como una célula Sf9 o HighFive). Ejemplos de células de mamífero adecuadas incluyen varias líneas celulares de cáncer de próstata tales como DU145 y TsuPr1, otras líneas

celulares de cáncer de próstata transfectables o transducibles, células primarias (PrEC), así como un número de células mamíferas rutinariamente usadas para la expresión de proteínas recombinantes (e.g., células COS, CHO, 293, 293T). Más particularmente, se puede usar un polinucleótido que comprende la secuencia de codificación de STEAP-1 o un fragmento, análogo u homóloga del mismo para generar las proteínas de STEAP-1 o fragmentos de las mismas usando cualquier número de sistemas hospedero-vector usados rutinariamente y ampliamente conocidos en la técnica.

Una amplia gama de sistemas hospedero-vector adecuados para la expresión de proteínas de STEAP-1 o fragmentos de las mismas están disponibles, ver por ejemplo, Sambrook *et al.*, 1989, *supra*; Current Protocols in Molecular Biology, 1995, *supra*). Los vectores preferidos para la expresión mamífera incluyen pero no se limitan a pcADN 3.1 myc-His-tag (Invitrogen) y el rector retroviral pSRatkneo (Muller et al., 1991, MCB11:1785). Usando estos vectores de expresión, STEAP-1 puede expresarse en varias líneas celulares de cáncer de próstata y de no próstata, incluyendo por ejemplo 293, 293T, rat-1, NIH 3T3 y TsuPr1. Los sistemas hospedero-vector de la invención so útiles para la porducción de una proteína STEAP-1 o fragmento de la misma. Tales sistemas de hospedero-vector se pueden emplear para estudiar las propiedades funcionales de STEAP-1 y mutaciones o análogos de STEAP-1.

La proteína STEAP-1 humana recombinante o un fragmento análogo u homólogo de la misma se puede producir por células mamíferas transfectadas con un constructo que codifica un nucleótido relacionado de STEAP-1. Por ejemplo, las células 293T pueden ser transfectadas con un plásmido de expresión que codfica STEAP-1 o fragmento, análogo u homólogo del mismo, una proteína relacionada de STEAP-1 es expresada en las células 293T, y la proteína STEAP-1 recombinante es aislada usando métodos de purificación estándar (e.g., purificación por afinidad usando anticuerpos anti-STEAP-1). En otra realización, una secuencia que codifica STEAP-1 es subclonada en el vector retroviral pSRαMSVtkneo y usada para infectar varias líneas celulares mamíferas, tales como NIH 3T3, TsuPr1, 293 y rat-1 con el fin de establecer líneas celulares que expresan STEAP-1. También se pueden emplear varios sistemas de expresión bien conocidos en la técnica. Los constructos de expresión que codifican un péptido líder unido en el marco a una secuencia que codifica STEAP-1 se pueden usar para la generación de una forma secretada de proteína STEAP-1 recombinante.

Como se discute aquí, la redundancia en el código genético permite la variación de las secuencias de gen STEAP-1. En particular, es conocido en la técnica que especies hospederas específicas usualmente tienen preferencias de codón específicas, y así, se puede adaptar la secuencia revelada como preferida para un hospedero deseado. Por ejemplo, las secuencias de codón análogo preferido tienen típicamente codones raros (i.e., codones que tienen una frecuencia de uso de menos de aproximadamente 20% en secuencias conocidas del hospedero deseado) reemplazados con codones de mayor frecuencia. Las preferencias de codón para una especie específica son calculadas, por ejemplo, utrilizando tablas de uso de codón disponibles en la INTERNET tal com en la URL dna.affrc.go.jp/-nakamura/codon.html.

Modificaciones de secuencia adicionales son conocidas por mejorar la expresión de proteína en un hospedero celular. Estas incluyen eliminación de secuencias que codifican señales de poliadenilación espuriosa, señales de sitio de empalme exón/intrón, repeticiones del tipo transposón, y/u otras secuencias bien caracterizadas que son nocivas a la expresión del gen. El contenido de GC de la secuencia es ajustado a niveles promedio para un hospedero celular dado, calculados con referencia a genes conocidos expresados en la célula hospedera. Cuando es posible, la secuencia es modificada para evitar estructuras de mARN secundario de horquillas secundarias. Otras modificaciones útiles incluyen la asición de una secuencia de concenso de inicio trasnacional en el inicio del marco de lectura abierto, como se describe en Kozak, Mol.Cell Biol., 9: 5073-5080 (1989). Los expertos entienden que la regla general que los irbosomas eucarióticos inician la traducción exclusivamente en en el codón AUG próximo 5' es abolida solamente bajo condiciones raras (ver, e. g., Kozak PNAS 92 (7): 2662-2666, (1995) y Kozak NAR 15 (20): (1987)).

III.) Proteínas relacionadas con STEAP-1

Otro aspecto de la presente invención provee proteínas relacionadas con STEAP-1. Realizaciones específicas de proteínas de STEAP-1 comprenden un polipéptido que tiene toda o parte de la secuencia de amino ácido de STEAP-1 humano como se muestra en la Figura 2 o Figura 3, preferiblemente la Figura 2A. Alternativamente, las realizaciones de proteínas de STEAP-1 comprenden polipéptidos variantes, homólogos o análogos que tienen alteraciones en la secuencia de amino ácido de STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3.

Las realizaciones de un polipéptido de STEAP-1 incluyen: un polipéptido de STEAP-1 que tiene una secuencia mostrada en la Figura 2, una secuencia de péptido de un STEAP-1 como se muestra en la Figura 2 en donde T es U; al menos 10 nucleótidos contiguos de un polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en la Figura 2; o al menos 10 péptidos contiguos de un polipéptido que tiene la secuencia como se muestra en Figura 2, en donde T es U. Por ejemplo, realizaciones de péptidos de STEAP-1 comprenden, sin limitación:

(I) una proteína que comprende, consiste esencialmente de, o consiste de una secuancia de amino ácido como se muestra en la Figura 2A-Q o Figura 3A-D;

(II) una proteína relacionada de STEAP-1 que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% homóloga a una secuencia de amino ácido entera mostrada en la Figura 2A-Q o 3A-D;

(III) una proteína relacionada de STEAP-1 que es al menos 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 o 100% identical a una secuencia de amino ácido entera mostrada en la Figura 2A-Q o 3A-D;

(IV) una proteína que comprende al menos una péptido indicado en las Tablas V a LI como se indica en la Solicitud de Patente de Los Estados Unidos 10/236,878 presentada el 06-Septiembre-2002 cuyos contendios específicos están totalmente incorporados aquí para referencia, opcionalmente con una condición que no es una proteína entera de la Figura 2;

(V) una proteína que comprende al menos un péptido indicado en las Tablas V-XVIII, colectivamente, cuyo péptido también está indicado en las Tablas XXII a LI, colectivamente, opcionalmente con la condición que no es una proteína entera de la Figura 2;

(VI) una proteína que comprende al menos dos péptidos seleccionados de los péptidos indicados en las Tablas V-LI, opcionalmente con una condición que no es una proteína entera de la Figura 2;

(VII) una proteína que comprende al menos dos péptidos seleccionados de los péptidos indicados en las Tablas V a LI colectivamente, con una condición que la proteína no es una secuencia contigua de una secuencia de amino ácido de la Figura 2;

(VIII) una proteína que comprende al menos un péptido seleccionado de los péptidos indicados en las Tablas V-XVIII; y al menos un péptido seleccionado de los péptidos indicados en las Tablas XXII a LI, con una condición que la proteína no es una secuencia contigua de una secuencia de amino ácido de la Figura 2;

(IX) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

(X) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339, respectivamente que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

(XI) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tiene un valor mayor de 0.5 en el perfil de Porcentaje de Residuos Accesibles de la Figura 7;

(XII) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tiene un valor mayor de 0.5 en el Perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8;

(XIII) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, amino ácidos de una proteína de la Figura 3A en cualquier incremento en número entero hasta 339 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de giro Beta de la Figura 9;

(XIV) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7,8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3B o 3D, en cualquier incremento en número entero hasta 258 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

(XV) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3B o 3D, en cualquier incremento en número entero hasta 258 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

(XVI) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3B o 3D, en cualquier incremento en número entero hasta 258 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Porcentaje de Residuos Accessibles de la Figura 7;

(XVII) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3B o 3D, en cualquier incremento en número entero hasta 258 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,

25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el Perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8;

(XVIII)un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, amino ácidos de una proteína de la Figura 3B o 3D en cualquier incremento en número entero hasta 258 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el Perfil de giro Beta de la Figura 9;

(XIX) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3C, en cualquier incremento en número entero hasta 282 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

(XX) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3C, en cualquier incremento en número entero hasta 282 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

(XXI) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3C, en cualquier incremento en número entero hasta 282 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el Perfil de Porcentaje de Residuos Accesibles de la Figura 7;

(XXII) un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 amino ácidos de una proteína de la Figura 3C, en cualquier incremento en número entero hasta 282 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6,

7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido que tienen un valor mayor de 0.5 en el the Perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8;

(XXIII)un polipéptido que comprende al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, amino ácidos de una proteína de la Figura 3C en cualquier incremento en número entero hasta 282 respectivamente, que incluye al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 posición(es) de amino ácido a que tienen un valor mayor de 0.5 en el pefil de giro Beta de la Figura 9;

(XXIV)un péptido que se encuentra al menos dos veces en las Tablas V-XVIII y XXII a LI, colectivamente;

(XXV) un péptido que se encuentra al menos tres veces en las Tablas VI-XVIII y XXII a LI, colectivamente;

(XXVI)un péptido que se encuentra al menos cuatro veces en las Tablas V-XXVIII y XXII a LI, colectivamente;

(XXVII) un péptido que se encuentra al menos cinco veces en las Tablas V-XVIII y XXII a LI, colectivamente;

(XXVIII) un péptido que se encuentra al menos una vez en las Tablas V-XVIII, y al menos una vez en las tablas XXII a LI;

(XXIX)un péptido que se encuentra al menos una vez en las Tablas V-XVIII, y al menos dos veces en las tablas XXII a LI;

(XXX) un péptido que se encuentra al menos dos veces en las Tablas V-XVIII, y al menos una vez en las tablas XXII a LI;

(XXXI)un péptido que se encuentra al menos dos veces en las Tablas V-XVIII, y al menos dos veces en las tablas XXII a LI;

(XXXII) un péptido que comprende una, dos, tres, cuatro o cinco de las siguientes características, o un oligonucleótido que codifica tal péptido:

i) una región de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento en número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene n valor igual o mayor a 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5;

ii) una región de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento en número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o menor de 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, o que tiene un valor igual a 0.0, en el perfil de Hidropaticidad de la Figura 6;

iii) una región de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento en número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de Porcentaje de Residuos Accesibles de la Figura 7;

iv) una región de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento en número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el Perfil de Flexibilidad Promedio de la Figura 8; o,

v) una región de al menos 5 amino ácidos de un péptido particular de la Figura 3, en cualquier incremento en número entero hasta la longitud total de esa proteína de la Figura 3, que incluye una posición de amino ácido que tiene un valor igual o mayor de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, o que tiene un valor igual a 1.0, en el perfil de giro Beta de la Figura 9;

(XXXIII) una composición que comprende un péptido de (I)-(XXXII) o un anticuerpo o región de enlace del mismo junto con un excipiente farmacéutico y/o en una forma de dosis de unidad humana.

(XXXIV) un método para usar un péptido de (I)-(XXXII), o un anticuerpo o región de enlace del mismo o una composición de (XXXIII) en un método para modular una célula que expresa STEAP-1;

(XXXV) un método para usar un péptido de (I)-(XXXII) o un anticuerpo oo región de enlace del mismo o una composición de (XXXIII) en un

método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un individuo que porta una célula que expresa STEAP-1;

(XXXVI) un método para usar un péptido de (I)-(XXXII) o un anticuerpo o región de enlace del mismo, o una composición (XXXIII) en un método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un individuo que porta una célula que expresa STEAP-1, dicha célula de un cáncer de un tejido listado en la Tabla I;

(XXXVII) un método para usar un péptido de (I)-(XXXII) o un anticuerpo o región de enlace del mismo o una composición de (XXXIII) en un método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un cáncer;

(XXXVIII) un método para usar un péptido de (I)-(XXXII) o un anticuerpo o región de enlace del mismo, o una composición de (XXXIII) en un método para diagnosticar, practicar profilaxis, pronosticar, o tratar un cáncer de un tejido listado en la Tabla I; y;

(XXXIX) un método para usar un péptido de (I)-(XXXII) o un anticuerpo o región de enlace del mismo, o una composición (XXXIII) en un método para identificar o caracterizar un modulador de una célula que expresa STEAP-1;

Como se usa aquí, se entiende que un rango revela específicamente todas las posiciones de unidad enteras del mismo.

Realizaciones típicas de la invención reveladas aquí incluyen polinucleótidos de STEAP-1 que codifican porciones específicas de secuencias de mARN de STEAP-1 (y aquellas que son complementarias a tales secuencias) tales como aquellas que codifican las proteínas y/o fragmentos de las mismas, por ejemplo:

(a) 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 330, 335, 339 o mas amino ácidos contiguos del variante 1 de STEAP-1; las longitudes máximas relevantes para los otros variantes son: variante 2, 258 amino ácidos; variante 3, 282 amino ácidos, variante 4, 258 amino ácidos.

En general, los variantes alélicos que se encuentran naturalmente de STEAP-1 humano comparten un alto grado de identidad y homología estructural (e.g., 90% o más homología). Típicamente, los variantes alélicos de una proteína STEAP-1 contienen sustituciones de amino ácido conservadoras dentro de las secuencia de STEAP-1 descritas aquí o contienen una sustitución de un amino ácido de una posición correspodiente en un homólogo de STEAP-1. Una clase de variante alélico de STEAP-1 con las proteínas que comparten un alto grado de homología con al menos una región pequeña de una secuencia de aminoácido de STEAP-1 particular, pero además contienen una desviación radical de la secuencia, tal como una sustitución no conservadora, truncación, inserción o cambio de marco. En comparaciones de secuencias de proteína, los términos, similitude, identidad, y homología cada uno tiene un significado distinto, como se aprecia en el campo de la genética. Más aún, la ortología y la paralogía pueden ser conceptos importantes que describen las relaciones de miembros de una familia de proteínas dada en un organismo a los miembros de la misma familia en otros organismos.

Las abreviaturas de amino ácido se proveen en la Tabla II. Las sustituciones de amino ácido conservadoras se pueden hacer frecuentemente en una proteína sin alterar la conformación o la función de la proteína. Las proteínas de la invención pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 sustituciones conservadoras.

Las realizaciones de la invención reveladas aquí incluyen una amplia variedad de variantes o análogos de las proteínas de STEAP-1 aceptadas en la técnica, tales como polipéptidos que tienen inserciones, eliminaciones y sustituciones de amino ácido. Los variantes de STEAP-1 se pueden preparar usando métodos conocidos en la técnica tales como mutagénesis dirigida al sitio, barrido de alanina, y mutagénesis de PCR. La mutagénesis dirigida al sitio (Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller et al., Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)), mutagenesis de casete (Wells *et al.*, Gene, 34: 315 (1985)), mutagenesis de selección de restricción (Wells et al., *Philos. Trans. R. Soc. London SerA*, 317: 415 (1986)) u otras técnicas se pueden realizar en el ADN clonado para producir el ADN variante de STEAP- 1.

El análisis amino ácidos de barrido también se puede emplear para identificar uno o más amino ácidos a lo largo de una secuencia contigua que está involucrada en una actividad biológica específica, tal como una interacción

proteína-proteína. Entre los amino ácidos de barrido preferidos están amino ácidos neutros, relativamente pequeños. Tales amino ácidos inluyen alanina, glicina, serina, y cisteína. La alanina es típicamente un amino ácido de barrido preferido entre este grupo porque elimina la cadena lateral más allá del carbono beta I es menos probable que altere la conformación de la cadena principal del variante. La alanina también es típicamente preferida porque es el amino ácido más común. Además, se encuentra frecuentemente en posiciones tanto enterradas como expuestas (Creighton, *The Proteins*, (W. H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 (1976)). Si la sustitución de alanina no produce cantidades de variante adecuadas, se puede usar un amino ácido isoestérico.

Como se define aquí, los variantes, análogos u homólogos de STEAP-1, tienen los atributos diferenciables de tener al menos un epítopo que "reacciona cruzadamente" con una proteína STEAP-1 que tiene una secuencia de amino ácido de la Figura 3. Como se usa en esta oración, "reacciona curzadamente" significa que un anticuerpo o célula T que se enlaza específicamente a un variante de STEAP-1 también se enlaza específicamente a una proteína STEAP-1 que tiene una secuencia de amino ácido indicada en la Figura 3. Un polipéptido deja de ser variante de una proteína mostrada en la Figura 3, cuando ya no contiene ningún epítopo capaz de ser reconocido por un anticuerpo o célula T que se enlaza específicamente a la proteína STEAP-1 de partida. Los expertos en la técnica entiendesn que los anticuerpos que reconocen proteínas se enlazan a epítopos de diferentes tamaños, y un grupo del orden de aproximadamente cuatro o cinco amino ácidos, contiguos o no, se considera como un número típico de amino ácidos en un epítopo mínimo. Ver, e.g., Nair et al., J. Immunol 2000 165 (12): 6949-6955; Hebbes *et al.*, Mol Immunol (1989) 26(9):865-73; Schwartz *et al.*, J Immunol (1985) 135(4):2598-608.

Otras clases de variantes de proteínas relacionadas con STEAP-1 comparten el 70%, 75%, 80%, 85% o 90% o más de similitude con una secuencia de amino ácido de la Figura 3, o un fragmento de la misma. Otrs clase específica de variantes de proteína STEAP-1 o análogos comprende uno o más de los motivos biológicos de STEAP-1 descritos aquí o actualmente conocidos en la técnica. Así, abarcados por la presente invención están los análogos de fragmentos de STEAP-1 (nucleico o amino ácido) que tienen propiedades funcionales alteradas (e.g. inmunogénicas) con relación al fragmento de partida. También se apreciará que los motivos actuales o que

harán parte de la técnica se aplicarán a las secuencias ácido nucleíco o amino ácido de las Figuras 2 o Figura 3.

Como se discute aquí, las realizaciones de la invención reivindicada incluyen polipéptidos que contienen menos de la secuencia de amino ácido total de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3. Por ejemplo, realizaciones representativas de la invención comprenden péptidos/proteínas que tienen cualquiera de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más amino ácidos contiguos de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3.

Más aún, realizaciones representativas de la invención reveladas aquí incluyen polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 1 a aproximadamente el amino ácido 10 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 10 a aproximadamente el amino ácido 20 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 20 a aproximadamente el amino ácido 30 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 30 a aproximadamente el amino ácido 40 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 40 a aproximadamente el amino ácido 50 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 50 a aproximadamente el amino ácido 60 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 60 a aproximadamente el amino ácido 70 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 70 a aproximadamente el amino ácido 80 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 80 a aproximadamente el amino ácido 90 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 90 a aproximadamente el amino ácido 100 de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, etc., a través de la totalidad de una secuencia de amino ácido de STEAP-1. Más aún, los polipéptidos que consisten de aproximadamente el amino ácido 1 (o 20 o 30 o 40, etc.) a aproximadamente el amino ácido 20, (o 130, o 140 o 150, etc.) de una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3 son realizaciones de la invención. También se apreciará que las posiciones de inicio y detención en este párrafo

se refieren a las posiciones especificadas así como esa posición más o menos 5 residuos.

Las proteínas relacionadas con STEAP-1 se generan usando tecnología de síntesis de péptido estándar o usando método de clivado químico bien conocidos en la técnica. Alternativamente, se pueden usar métodos recombinantes para generar moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína relacionada de STEAP-1. En una realización, las moléculas de ácido nucleico proveen un medio para generar fragmentos definidos de una proteína STEAP-1 (o variantes, homólogos o análogos de la misma).

III. A) Realizaciones de Proteína que porta motivo

Realizaciones ilustrativas adicionales de la invención reveladas aquñi incluyen polipéptidos de STEAP-1 que comprenden los residuos de amino ácido de uno o más de los motivos biológicos contenidos dentro de una secuencia de péptido de STEAP-1 indicados en la Figura 2 o Figura 3. Varios motivos son conocidos en la técnica, y una proteína puede ser evaluada para la presencia de tales motivos por un número de sitios de Internet disponibles públicamente (ver, e.g., direcciones URL: pfam.wustl.edu/; searchlauncher.bcm.tmc.edu/seq-search/struc-predict.html;psort.ims.u-tokyo.ac.jp/; cbs.dtu.dk/;ebi.ac.uk/interpro/scan.html; expasy.ch/tools/scnpsit1.html; Epimatrix™ y Epimer™, Brown University, brown.edu/Research/TB-HIV~Lablepimatrixlepimatrix.html; y BIMAS, bimas.dcrt.nih.gov/.).

Las subsecuencias que portan motivo de todas las porteínas de variante de STEAP-1 se indican e identifican en las Tablas V-XVIII y XXII- LI.

La tabla IV(h) indica varios motivos que se encuentran frecuentemente en las búsquedas pfam (ver direcciones URL pfam.wustl.edu/). Las columnas de la Tabla IV(h) listan (1) abreviatura del nombre del motivo, (2) porcentaje de identidad encontrado entre diferentes los diferentes miembros de la familia de motivos, (3) nombre del motivo o descripción, y (4) función más común; la información de ubicación se incluye si el motivo es relevante por ubicación.

Los polipéptidos que comprenden uno o más de los motivos de STEAP-1 discutidos anteriormente son útiles para dilucidar las características específicas de un fenotipo maligno en vista de la observación que los motivos de STEAP-1 discutidos anteriormente están asociados con la desregulación del crecimiento y

porque STEAP-1 está sobreexpresado en ciertos cánceres (Ver, e.g., Tabla I). La caseína cinasa II, cAMP y proteína cinasa dependiente de camp, y la Proteína Cinasa C, por ejemplo, con enzimas conocidas por estar asociadas con el desarrollo del fenotipo maligno (ver, e.g. Chen *et al.*, Lab Invest., 78(2): 165-174 (1998); Gaiddon *et al.*, Endocrinology 136 (10): (1995); Hall *et al.*,Nuclei Acids Research 24(6): 1119-1126 (1996); Peterziel *et al.*, Oncogene 18 (46): (1999) y O'Brian, Oncol. Rep. 5 (2): (1998)). Más aún, tanto la glicosilación como la miristoilación son modificaciones de proteína asociadas también con el cáncer y la progresión del cáncer (ver e.g., Dennis *et al.*, Biochem. Biophys. Acta 1473(1):21-34 (1999); Raju *et al.*, Exp. Cell Res. 235(1): 145-154 (1997)). La amidación es otra modificación de proteína asociada también con el cáncer y la prograsión del cáncer (ver, e.g. Treston *et al.*, J. Natl. Cancer Inst. Monogr. (13): 169-175 (1992)).

En otra realización, las proteínas de la invención comprenden uno o más de los epítopos inmunorreactivos de acuerdo con los métodos aceptados en la técnica, tales como los péptidos indicados en las Tablas V-XVIII y XXII-LI. Los epítopos CTL pueden ser determinados usando algoritmos específicos para identificar péptidos dentro de una proteína STEAP-1 que son capaces de enlazarse óptimamente a los elelos de HLA especificados (e.g., Tabla IV; Epimatrix™ y Epimer™, Brown University, URL brown.edu/Research/TB-HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html; y BIMAS, URL bimas.dcrt.nih.gov/). Más aún, los procesos para identificar péptidos que tienen suficiente afinidad de enlace para moléculas HLA y que están correlacionadas por ser epítopos inmunogénicos, son bien conocidos en la técnica, y se realizan sin experimentación indebida. Adicionalmente, los procesos para identificar péptidos que son epítopos inmunogénicos, son bien conocidos en la técnica, y se realizan sin experimentación indebida *in vitro* o in vivo.

También son conocidos en la técnica los principios para crear análogos de tales epítopos con el fin de modular la inmunogenicidad. Por ejemplo, empieza con un epítopo que porta un motivo CTL o HTL (ver, e.g., los motivos/supermotivos de HLA Clase I y HLA Clase II de la Tabla IV). El epítopo es analogado sustituyendo un amino ácido en una de las posicones especificadas, y reemplazandolo con otro amino ácido especificado en esa posición. Por ejemplo, con base en los residuos definidos en la Tabla IV, se puede sustituir un residuo nocivo a favor de cualquier residuo, tal como un residuo preferido; sustituir un residuo menos preferido con un residuo preferido; o sustituir un residuo preferido que se encuentra naturalmente con otro residuo

preferido. Las sustituciones pueden ocurrir en las posiciones de anclaje primario o en otras posiciones en un péptido; ver, e.g., Tabla IV.

Una variedad de referencias reflejan la técnica con respecto a la identificación y generación de epítopos en una proteína de interés así como análogos de los mismos. Ver, por ejemplo, WO 97/33602 a Chesnut *et al.*; Sette, Immunogenetics 1999 50(3-4): 201- 212; Sette *et al.*, J. Immunol. 2001 166(2): 1389-1397; Sidney *et al.*, Hum. Immunol. 1997 58(1):12-20; Kondo *et al.*, Immunogenetics 1997 45(4): 249-258; Sidney *et al.*, J. Immunol.1996 157(8): 3480-90; y Falk et al., Nature 351: 290-6 (1991); Hunt *et al.*, Science 255:1261-3 (1992); Parker et al., J. Immunol. 149:3580-7 (1992); Parker *et al.*, J. Immunol. 152: 163-75 (1994)); Kast *et al.*, 1994 152(8): 3904-12; Borras-Cuesta *et al.*, Hum. Immunol. 2000 61(3): 266-278; Alexander *et al.*, J. Immunol. 2000 164(3); 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, PMID: 7895164, UI: 95202582; O'Sullivan *et al.*, J. Immunol. 1991 147(8): 2663-2669; Alexander *et al.*, Immunity 19941 (9): 751-761 y Alexander *et al.*, Immunol. Res. 1998 18 (2): 79-92.

Realizaciones relacionadas de la invención incluyen polipéptidos que comprenden combinaciones de los diferentes motivos indicados en Tabla (s) IV(a), IV(b), IV(c), IV(d), y IV(h), y/o, uno o más de los epítopos CTL predichos de las Tablas V-XVI y XXII-LI, y/o, uno o más de los epítopos HTL predichos de las Tablas XLVIII-LI, y/o, uno o más de los motivos de enlace a célula T conocidos en la técnica. Realizaciones preferidas no contienen inserciones, eliminaciones o sustituciones ya sea dentro de los motivos o dentro de las secuencias que intervienen de los polipéptidos. Adicionalmente, las realizaciones que incluyen un número de residuos de amino ácido de N-terminal o C-terminal en cualquier lado de estos motivos puede ser deseable (para, por ejemplo, incluir una porción mayor de la arquitectura del polipéptido en la cual el motivo está localizado). Típicamente, el número de residuos de amino ácido del N-terminal y/o el C-terminal en cualquier lado de un motivo está entre aproximadamente 1 a aproximadamente 100 residuos de amino ácido, preferiblemente 5 a aproximadamente 50 residuos de amino ácido.

Las proteínas relacionadas con STEAP-1 están incorporadas en muchas formas, preferiblemente en forma aislada. Una molécula de proteína STEAP-1 purificada estará sustancialmente libre de otras proteínas o moléculas que afectan el enlace de STEAP-1 a anticuerpo, célula T u otro ligando. La naturaleza y grado de aislamiento y purificación dependerá del uso destinado.

Las realizaciones de proteínas relacionadas con STEAP-1 incluyen proteínas relacionadas con STEAP-1 purificadas y proteínas relacionadas con STEAP-1 funcionales, solubles. En una realización, una proteína STEAP-1 soluble, functional o fragmento de la misma retiene la habilidad para ser enlazada por un anticuerpo, célula T u otro ligando.

La invención también provee proteínas de STEAP-1 que comprenden fragmentos biológicamente activos de una secuencia de amino ácido de STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3. Tales proteínas exhiben propiedades de la proteína STEAP-1 de partida, tal como la habilidad para elicitor la generación de anticuerpos que se enlazan específicamente a un epítopo asociado con la proteína STEAP-1 de partida; a ser enlazado por tales anticuerpos; a elicitar la activación de HTL o CTL; y/o, a ser reconocidas por HTL o CTL que también se enlazan específicamente a la proteína de partida.

Los polipéptidos relacionados de STEAP-1 que contienen estructuras particularmente interesantes, pueden ser predichas y/o identificadas usando varias técnicas analíticas bien conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o análisis de Jameson-Wolf, o basados en inmunogenicidad. Los fragmentos que contienen tales estructuras son particularmente útiles en la generación de anticuerpos anti-STEAP-1 específicas de unidad o células T o para identificar los factores celulares que se enlazan a STEAP-1. Por ejemplo, se pueden generar perfiles de hidrofilicidad, e identificar fragmentos de péptido inmunogénicos, usando el método de Hopp, T. P. y Woods, K. R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A. 78: 3824-3828. Se pueden generar perfiles de hidropaticidad, e identificar fragmentos de péptido inmunogénicos, usando el método de Kyte, J. y Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157: 105-132. Se pueden generar perfiles de Porcentaje (%) de Residuos Accesibles, e identificar fragmentos de péptido inmunogénicos, usando el método de Janin J., 1979, Nature 277: 491-492. Se pueden general perfiles de Flexibilidad Promedio, e identificar fragmenos de péptido inmunogénicos, using el método de Bhaskaran R., Ponnuswamy P. K., 1988, Int. J. Pept. Proteína Res. 32: 242-255. Se pueden generar pertiles de giro Beta, e identificar fragmentos de péptido inmunogénicos, usando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294.

Los epítopos CTL pueden determinarse usando algoritmos específicos para identificar péptidos dentro de una proteína STEAP-1 que son capaces de

enlazarse óptimamente a los alelos de HLA especificados (e.g., usando el sitio SYFPEITHI en la dirección URL de la Red Mundial syfpeithi.bmi-heidelberg.com/; las listas en la Tabla IV(A)-(E); Epimatrix™ y Epimer™, Brown University, URL (brown.edu/Research/TB- HIV_Lab/epimatrix/epimatrix.html); y BIMAS, URL bimas.dcrt.nih.gov/). Ilustrando esto, se predijeron los epítopos de péptido de STEAP-1 que se presentan en el contexto de moléculas MHC Clase I humano, e.g., HLA-A1, A2, A3, A11, A24, B7 y B35 (ver, e.g., Tablas V-XVIII,XXII-LI). Específicamente, la secuencia de amino ácido completa de la proteína STEAP-1 y las porciones relevantes de otros variantes, I.e., para predicciones de HLA Clase I de 9 residuos que fanquean en cada lado de un punto de mutación o unión de exón, y para predicciones de HLA Clase II de 14 residuos que flanquean cada lado de un punto de mutación o unión de exón correspondientes a cada variante, fueron entrados en al algoritmo de Búsqueda de Motivo de Péptido HLA encontrado en el sitio de Internet Bioinformatics and Molecular Analysis Section (BIMAS) listado anteriormente; además del sitio SYFPEITHI, en la URL syfpeithi.bmi- heidelberg.com/.

¡El algoritmo de búsqueda de motivo de péptido HLA fue desarrollado por Dr. Ken Parker con base en el enlace de secuencias de péptido específicas en el surco de las moléculas HLA Clase I, en particular HLA-A2 (ver, e. g., Falk et al., Nature 351: 290-6 (1991); Hunted, Science 255: 1261-3 (1992); Parker *et al.*, J. Immunol. 149: 3580-7 (1992); Parker *et al.*, J.. Immunol. 152:163-75 (1994)). Este algoritmo permite la localización y clasificación de péptidos de 8 meros, 9 meros, y 10 meros de una secuencia de proteína completa para el enlace predicho a HLA-A2 así como numerosas otras moléculas HLA Clase I. Muchos péptidos de enlace HLA Clase I son 8, 9, 10 o 11 meros. Por ejemplo, para HLA-A2 Clase I, los epítopos contienen preferiblemente una leucina (L) o metionina (M) en la posición 2 y una valina (V) o leucina (L) en el C-terminal (ver, e.g., Parker *et al.*, J. Immunol. 149:3580-7 (1992)). Los resultados seleccionados de los péptidos de enlace de STEAP-1 predichos se muestran en las Tablas V-XVIII y XXII-LI aquí. En las Tablas V-XVIII y XXII-XLVIII, los candidates seleccionados, de 9 meros y 10 meros, para cada miembro de familia se muestran junto con su ubicación, la secuencia de amino ácido de cada péptido específico, y un puntaje de enlace estimado. En las Tablas XLVIII-LI, los candidates seleccionados, de 15 meros, para cada miembro de la familia se muestran junto con su ubicación, la secuencia de amino ácido de cada péptido específico, y un puntaje de enlace estimado. El puntaje de enlace corresponde al tiempo medio estimado de disociación de los complejos que contienen el péptido a 37 °C a pH 6.5. Se predice que los péptidos con el

puntaje de enlace más alto son los enlazados más estrechamente al HLA Clase I en la superficie celular para el período de tiempo más largo y así representan los mejores objetivos inmunogénicos para el reconocimiento de célula T.

El enlace real de los péptidos a un alelo de HLA se puede evaluar mediante estabilización de la expresión de HLA en la línea celular T2 defectuosa de procesamiento de antígeno (ver, e.g., Xue et al., Prostate 30: 73-8 (1997) y Peshwa et al., Prostate 36:129-38 (1998)). La inmunogenicidad de péptidos específicos se puede evaluar *in vitro* mediante estimulación de linfoticos T citotóxicos CD8+ (CTL) en la presecia de células que presentan antígeno tales como células dendríticas.

Se apreciará que cada epítopo predicho por el sito BIMAS, los sitios Epimer™ y Epimatrix™, o especificados por los motivos de HLA Clase I o Clase II disponibles en la técnica o que serán parte de la técnica, tal como los indicados en la Tabla IV (o determinados usando el sitio URL de la Red Mundial syfpeithi.bmi-heidelberg.com/, o BIMAS, bimas.dcrt.nih.gov/ se "aplicarán" a una proteína STEAP-1 de acuerdo con la invención. Como se usa quí en este contexto "aplicarán" significa que una proteína STEAP-1 es evaluada, e.g., visualmente o por métodos para buscar patrones basados en computadora, como lo apreciarán los expertos en la técnica relevante. Cada subsecuencia de una proteína STEAP-1 de 8, 9, 10, u 11 residuos de amino ácido que portan un motivo Clase I de HLA, o una subsecuencia de 9 o más residuos de amino ácido que portan un motivo HLA Clase II están dentro del alcance de la invención.

III.B.) Expresión de proteínas relacionadas con STEAP-1

En una realización descrita en los ejemplos siguientes, STEAP-1 puede ser expresado convenientemente en las células (tales como células 293T) transfectadas con un vector de expresión disponible comercialmente tal como un vector de expresión digrigido a CMV que codifica STEAP-1 con una etiqueta 6XHis y MYC del C-terminal (pcADN3.1/mycHIS, Invitrogenor Tags, GenHunter Corporation, Nashville TN). El vector Tag5 provee una señal de secreción IgGK que se puede usar para facilitar la producción de una proteínas de STEAP-1 secretada en células transfectadas. Las STEAP-1 His-marcada secretada en el medio de cultivo puede ser purificada, e.g., usando una columna de níquel empleando técnicas estándar.

III.C.) Modificaciones de Proteínas relacionadas con STEAP-1

Las modificaciones de proteínas relacionadas con STEAP-1, tales como modificaciones covalentes, están incluidas en el alcance de esta invención. Un tipo de modificación covalente incluye la reacción marcada de residuos de amino ácido de un polipéptido de STEAP-1 con un agente derivador orgánico que es capaz de reaccionar con cadenas secundarias seleccionadas o los residuos del C- o N-terminal de una proteína STEAP-1. Otro tipo de modificación covalente de un polipéptido de STEAP-1 incluidas dentro del alcance de esta invención comprende alterar el patrón de glicosilación nativo de una proteína de la invención. Otro tipo de modificación covalente de STEAP-1 comprende el enlace de un polipéptido de STEAP-1 a uno de una variedad de polímeros no proteináceos, e.g., polietilen glicol (PEG), polipropilen glicol, o polioxialquilenos, de la forma indicada en las Patentes U.S. Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 o 4,179,337.

Las Proteínas relacionadas con STEAP-1 de la presente invención también pueden ser modificadas para formar una molécula quimérica que comprende STEAP-1 fusiónada a otro polipéptido heterólogo o secuencia de amino ácido. Tal molécula quimérica puede ser sintetizada químicamente o recombinantemente. Una molécula quimérica puede tener una proteína de la invención fusiónada a otro antígeno asociado a tumor o fragmento del mismo. Alternativamente, una proteína de acuerdo con la invención puede comprender una fusión de fragmentos de una secuencia de STEAP-1 (amino o ácido nucleico) de forma que se crea una molécula que no es, a través de su longitud, directamente homólogas a las secuencias de amino ácido o ácido nucleico mostradas en la Figura 2 o Figura 3. Tal molécula quimérica puede comprender multiples de la misma subsecuencia de STEAP-1. Una molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína relacionada con STEAP-1 con una etiqueta de epítopo de histidina, que provee un epítopo al cual níquel inmobilizado se puede enlazar selectivamente, con citosinas o con factores de crecimiento. La etiqueta de epítopo es generalmente colocada en el terminal amino- o carboxilo- de una proteína STEAP-1. En una realización alternativa, la molécula quimérica puede comprender una fusión de una proteína relacionada con STEAP-1 con una inmunoglobulina o una región particular de una inmunoglobulina. Para una forma bivalente de la molécula quimérica (también referida como una "inmunoadhesina"), tal fusión podría ser la región Fc de una molécula IgG. Las fusiones Ig incluyen preferiblemente la sustitución de una forma soluble (dominio de transmembrana eliminado o inactivado) de un

polipéptido de STEAP-1 en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula Ig. En una realización preferida, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina ver, e.g., la Patente U.S. No. 5,428,130 emitida el 27 de Junio de 1995.

III.D.) Usos de Proteínas relacionadas con STEAP-1

Las proteínas de la invención tienen un número de usos específicos diferentes. Como STEAP-1 está altamente expresado en la próstata otros cánceres, las proteínas relacionadas con STEAP-1 se usan en los métodos que evaluan el estatus de los productos de gen STEAP-1 en tejidos normales versus cancerosos, dilucidando así el fenotipo maligno. Típicamente, los polipéptidos de regiones específicas de una proteína STEAP-1 se usan para evaluar la presencia de perturbaciones (tales como eliminaciones, inserciones, mutaciones puntuales, etc.) en aquellas regiones (tales como regiones que contienen uno o más motivos). Ensayos ejemplares utilizan anticuerpos o células T que marcan proteínas relacionadas con STEAP-1 que comprende los residuos de amino ácido de uno o más de los motivos biológicos contenidos dentro de una secuencia de polipéptido de STEAP-1 con el fin de evaluar las características de esta región en tejidos normales versus cancerosos o para elicitar una respuesta inmune al epítopo. Alternativamente, las proteínas relacionadas con STEAP-1 que contienen los residuos de amino ácido de uno o más de los motivos biológicos en una proteína STEAP-1 se usan para seleccionar factores que interactúan con esa región de STEAP-1.

Los fragmentos/subsecuencias de proteína de STEAP-1 son particularmente útiles en la generación y caracterización de anticuerpos específicos de dominio (e.g., anticuerpos que reconocen un epítopo extracelular o intracelular de una proteína STEAP-1), para identificar agentes o factores celulares que se enlazan a STEAP-1 o un dominio estructural particular del mismo, y en varios contextos terapéuticos y de diagnóstico, incluyendo, pero sin limitarse a ensayos de diagnóstico, vacunas contra e cáncer y métodos para preparar tales vacunas.

Las proteínas codificadas por los genes STEAP-1, o por análogos, homólogos o fragmentos de los mismos, tienen una variedad de usos, incluyendo, pero sin limitarse a generación de anticuerpos y en métodos para identificar ligandos y otros agentes y constituyentes celulares que se enlazan a

un producto del gen STEAP-1. Los anticuerpos elevados contra una proteína STEAP-1 o fragmento de la misma son útiles en ensayos de diagnóstico y pronóstico, y en metodologías de representación gráfica en el manejo de cánceres humanos caracterizados por la expresión de proteína STEAP-1, tal como los listados en la Tabla I. Tales anticuerpos pueden ser expresados intracelularmente y se usan en métodos para tratar pacientes con tales cánceres. Los ácidos nucleicos o proteínas relacionadas con STEAP-1 también se usan para general respuestas HTL o CTL.

Varios ensayos inmunológicos útiles para la detección de proteínas de STEAP-1 se usan, incluyeno pero sin limitarse, a varios tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunosorbentes relacionados con enzima (ELISA), ensayos inmunifluorescentes relacionados con enzima (ELIFA), métodos inmunocitoquímicos, y similares. Los anticuerpos pueden ser mercados y usados como reactivos de imagen inmunológicos capaces de detectar células que expresan STEAP-1 (e.g., en métodos de imagen radiocintigráfica). Las proteínas de STEAP-1 también son particularmente útiles en la generación de vacunas contra el cáncer, como se describe aquí en más detalle.

IV.) Anticuetpos STEAP.1

Otro aspecto de la invención provee anticuerpos que se enlazan a proteínas relacionadas con STEAP-1. Los anticuerpos preferidos se enlazan específicamente a una proteína relacionada con STEAP-1 y no se enlazan (o enlazan débilmente) a péptidos o proteínas que no son proteínas relacionadas con STEAP-1 bajo condiciones fisiológicas. En este contexto, los ejemplos de condiciones fisiológicas incluyen: 1) solución salina amortiguada con fosfato; 2) solución salina amortiguada con Tris que contiene Tris 25mM y NaCl 150 mM; o solución salina normal (0.9% de NaCl); 4) suero animal tal como suero humano; o, 5) una combinación de cualquiera de 1) a 4); estas reacciones tienen lugar preferiblemente a pH 7.5, alternativamente en un rango de pH de 7.0 a 8.0, o alternativamente en un rango de pH de 6.5 a 8.5; también, estas reacciones tienen lugar a una temperatura entre 4 °C a 37 °C. Por ejemplo, los anticuerpos que se enlazan a STEAP-1 pueden enlazar proteínas relacionadas con STEAP-1, tal como los homólogos o análogos de las mismas.

Los anticuerpos STEAP-1 de la invención son particularmente útiles en los ensayos de diagnóstico y pronóstico del cáncer (ver, e.g., Tabla I), y

metodologías de representación gráfica. Igualmente, tales anticuerpos son útiles en el tratamiento, diagnóstico, y/o pronóstico de cáncer de próstata y otros cánceres, en la medida en que STEAP-1 también está expresado o sobre expresado en estos otros cánceres. Más aún, los anticuerpos expresados intracelularmente (e.g., anticuerpos de cadena sencilla) son útiles terapéuticamente en el tratamiento de cánceres en los cuales la expresión de STEAP-1 está involucrada, tal como cánceres de próstata avanzados o metastáticos u otros cánceres avanzados o metastáticos.

La invención también provee varios ensayos inmunológicos útiles para la detección y cuantificación de STEAP-1 y proteínas relacionadas con STEAP-1 mutantes. Tales ensayos pueden comprender uno o más anticuerpos STEAP-1 capaces de reconocer y enlazarse a una proteína relacionada con STEAP-1, según sea apropiado. Estos ensayos se realizan dentro de varios formatos de ensayo inmunológico bien conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a varios tipos de radioinmunoensayos, ensayos inmunosorbentes enlazados a enzima (ELISA), ensayos inmunofluorescentes enlazados a enzima (ELIFA), y similares.

Los ensayos de no-anticuerpo inmunológicos de la invención también comprenden ensayos de inmunogenicidad de célula T (inhibidores o estimuladores) así como ensayos de enlace del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC).

Adicionalmente, también se proveen en la invención métodos de representación gráfica inmunológicos capaces de detectar el cáncer de próstata y otros cánceres que expresan STEAP-1, incluyendo pero sin limitarse a métodos de representación gráfica radiocintigráfica usando anticuerpos STEAP-1 marcados. Tales ensayos son clínicamente útiles en la detección, monitoreo, y pronóstico de cánceres que expresan STEAP-1 tal como el cáncer de próstata.

Los anticuerpos STEAP-1 también se usan en métodos para purificar una proteína relacionada con STEAP-1 y para aislar homólogos de STEAP-1 y moléculas relacionadas. Por ejemplo, un método para purificar una proteína relacionada con STEAP-1 comprende incubar dicho anticuerpo STEAP-1, que ha sido acoplado a una matriz sólida, con un lisado u otra solución que contiene una proteína relacionada con STEAP-1 bajo condiciones que permiten que el anticuerpo STEAP-1 se enlace a la proteína relacionada

con STEAP-1; lavar la matriz sólida para eliminar impurezas; y eluir la proteína relacionada con STEAP-1 del anticuerpo acoplado. Otros usado de los anticuerpos STEAP-1 de acuerdo con la invención incluyen la generación de anticuerpos anti-idiotípicos que imitan una proteína STEAP-1.

Varios métodos para la preparación de anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden preparar inmunizando un hospedero mamífero adecuado usando una proteína relacionada con STEAP-1, péptido, o fragmento, en una forma aislada o inmunoconjugada (Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press, Eds., Harlow, y Lane (1988); Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, NY (1989)). Adicionalmente, las proteínas de fusión de STEAP-1 también pueden usarse, tal como una proteína de fusión GST STEAP-1. En una realización particular, una proteína de fusión GST que comprende toda o la mayoría de la secuencia de amino ácido de la Figura 2 o Figura 3 se produce, luego se usa como un inmunógeno para generar anticuerpos apropiados. En otra realización, una proteína relacionada con STEAP-1 es sintetizada y se usa como un inmunógeno.

Adicionalmente se usan técnicas de inmunización de ADN desnudo conocidas en la técnica (con o sin proteína relacionada con STEAP-1 o células que expresan STEAP-1 pirificadas) para generar una respuesta inmune al inmunógeno codificado (para revisión, ver Donnelly *et al.*,1997, Ann. Rev. Immunol. 15:617-648). La secuencia de amino ácido de una proteína STEAP-1 como se muestra en Figura 2 o Figura 3 puede ser analizada para seleccionar regiones específicas de la proteína STEAP-1 para generar anticuerpos. Por ejemplo, el análisis de hidrofobicidad e hidrofilicidad de una secuencia de amino ácido de STEAP-1 se usan para identificar regiones hidrofílicas en la estructura de STEAP-1. Las regiones de una proteína STEAP-1 que muestran estructura inmunogénica, así como otras regiones y dominios, se pueden identificar fácilmente usando varios métodos diferentes conocidos en la técnica, tales como análisis de Chou-Fasman, Garnier-Robson, Kyte-Doolittle, Eisenberg, Karplus-Schultz o Jameson-Wolf. Se pueden generar los perfiles de Hidrofilicidad usando el método de Hopp, T.P. y Woods, K. R., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824- 3828. Se pueden general los perfiles de Hidropaticidad usando el método de Kyte, J. y Doolittle, R.F., 1982, J. Mol. Biol. 157:105- 132. Los perfiles de Porcentaje (%) de Residuos Accesibles usando el método de Janin J., 1979, Nature 277:491-492. Se pueden generar los perfiles de Flexibilidad Promedio usando el método de Bhaskaran R., PonnuswamyP.K., 1988, Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255. Se pueden generar los perfiles de

giro Beta usando el método de Deleage, G., Roux B., 1987, Protein Engineering 1:289-294. Así, cada región identificada por cualquiera de estos programas o métodos está dentro del alcance de la presente invención. Los métodos preferidos para la generación de anticuerpos STEAP-1 se ilustran mejor a manera de ejemplos proporcionados aquí. Los métodos para preparar una proteína o polipéptido para uso como un inmunógeno son bien conocidos en la técnica. También son bien conocidos en la técnica los métodos para preparar conjugados inmunogénicos de una proteína con un vehículo, ral como BSA, KLH u otra proteína vehículo. En algunas circunstancias se emplean la conjugación directa usando, por ejemplo, reactivos de carbodiimida; en otras instancias los reactivos enlazantes tales como los suministrados por Pierce Chemical Co., Rockford, IL, son efectivos. La administración de un inmunógeno de STEAP-1 usualmente se conduce mediante inyección durante un período de tiempo adecuado y con uso de un adyuvante adecuado, como se entiende en la técnica. Durante el programa de inmunización, se pueden tomar títulos de anticuerpos para determinar la suficiencia de la formación de anticuerpo.

Los anticuerpos monoclonales STEAP-1 se pueden producir por varios medios bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, líneas celulares inmortalizadas que secretan un anticuerpo monoclonal deseado se preparam usando la tecnología de hidridoma estándar de Kohler y Milstein o modificaciones que inmortalizan células B que producen anticuerpo, com es generalmente conocido. Las líneas celulares inmortalizadas que secretan los anticuerpos deseados son seleccionadas mediante inmuniensayo en el cual el antígeno es una proteína relacionada con STEAP-1. Cuando el cultivo de célula inmortalizada apropiado es identificado, las células pueden ser expandidas y los anticuerpos producidos ya sea de cultivos *in vitro* o de ascitis de fluidos.

Los anticuerpos o fragmentos de la invención también se pueden producir por medios recombinantes. Las regiones que se enlazan específicamente a las regiones deseadas de una proteína STEAP-1 tambíén se pueden producir en el conerxto de anticuerpos injertados con región determinante de complementariedad (CDR) o quimérica de origen de múltiples especies. También se pueden producir anticuerpos STEAP-1 humanizados o humanos, y se prefieren para uso en contextos terapéuticos. Los métodos para humanizar anticuerpos de murina y otros no humanos, sustituyendo una o más de las CDRs del anticuerpo no humano por secuencias de anticuerpo humano correspondientes, son bien conocidos (ver por ejemplo, Jones *et al.*, 1986,

Nature 321: 522-525; Riechmannet al., 1988, Nature 332: 323-327; Verhoeyen *et al.*, 1988, Science 239:1534-1536). Ver también, Carter *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285 y Sims *et al.*, 1993, J. Immunol. 151: 2296.

Los métodos para producir anticuerpos monoclonales totalmente humanos incluyen despliegue del fago y métodos transgénicos (para revisión, ver Vaughan et al., 1998, Nature Biotechnology 16: 535-539). Los anticuerpos monoclonales STEAP-1 totalmente humanos pueden ser generados usando técnicas de clonación que emplean grandes bibliotecas combinacionales de gen Ig humano (i.e., despliegue del fago) (Griffiths y Hoogenboom, Building an In vitro immune system: human antibodies from phage display libraries. In: Proteína Engineering of Antibody Molecules for Prophylactic and Therapeutic Applications in Man, Clark, M. (Ed.), Nottingham Academic, pp 45-64 (1993); Burton y Barbas, Human Antibodies from combinatorial libraries. Id., pp 65-82). Los anticuerpos nomoclonales STEAP-1 totalmente humanos también se pueden producir usando ratones transgénicos diseñados para contener puntos de gen de inmunoglobulina humana como se describe en la Solicitud de Patente PCT WO98/24893, Kucherlapati y Jakobovits *et al.*, publicada el 3 de Diciembre de 1997 (ver también, Jakobovits, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs 7 (4): Patente U.S. 6,162,963 emitida el 19 de Diciembre de 2000; 6,150,584 emitida el 12 de Noviembre de 2000; y, 6,114598 emitida el 5 de Septiembre de 2000). Este método evita la manipulación *in vitro* requerida con la tecnología de despliegue del fago y produce eficientemente anticuerpos humanos auténticos de alta afinidad.

La reactividad de los anticuerpos STEAP-1 con una proteína relacionada con STEAP-1 se puede establecer por un número de medios bien conocidos, incluyendo manchado Occidental, inmunoprecipitación, análisis de ELISA, FACS usando, según sea apropiado, proteínas relacionadas con STEAP-1, células que expresan STEAP-1 o extractos de los mismos. Un anticuerpo STEAP-1 o fragmento del mismo puede ser marcado con un marcador detectable o conjugado a una segunda molécula. Marcadores detectables adecuados incluyen, pero no se limitan a, un radioisótopo, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminescente, compuesto quimioluminescente, un quelante de metal o una enzima. Además, los anticuerpos bi-específicos para dos o más epítopos de STEAP-1 son generados usando los métodos generalmente conocidos en la técnica. Los anticuerpos homodiméricos también pueden ser generados mediante técnicas de reticulación conocidas en la técnica (e.g., Wolff et al., Cancer Res. 53: 2560-2565).

En una realización, la invención provee anticuerpos monoclonales identificados como hibridoma de ratón X92.1.30.1.1(1) e hibridoma de ratón X120.545.1.1 depositados en la Colección de Cultivo Tipo Americana (American Type Culture Collection), localizada en 10801 University Blvd. Manassas, VA 20110-2209 el 06-Febrero-2004 y asignado con los número de Acceso ATCC PTA-5802 y PTA-5803, respectivamente.

V.) Respuestas inmunes celulares de STEAP-1

El mecanismo por el cual las células T reconocen antígenos ha sido trazado. Las composiciones de vacuna de epítopo de péptido eficaces de la invención inducen inducen respuestas terapéuticas o profilácticas inmunes en segmentos muy amplios de la población mundial. Para un entendimiento del valor y eficacia de las composiciones de la invención que incluyen respuestas inmunes celulares, se provee una breve revisión de la tecnología relacionada con inmunología.

Un complejo de una molécula de HLA y un antígeno peptídico actúa como el ligando reconocido por las células T restringidas de HLA (Buus, S. *et al.*, Cell 47:1071, 1986; Babbitt, B. P. *et al.*, Nature 317:359, 1985; Townsend, A. y Bodmer, H., *Annu. Rev. Immunol.* 7:601, 1989; Germain, R. *N., Annu. Rev. Immunol.* 11:403, 1993). A través del estudio de análogos de antígeno sustituidos de amino ácido simple y el secuenciamiento de péptidos procesados naturalmente, enlazados endógenamente, los residuos críticos que corresponden a los motivos requeridos para el enlace específico a moléculas de antígeno HLA han sido identificados y se indican en la Tabla IV (ver también, e.g., Southwood, *et al.*, *J. Immunol.* 160:3363, 1998; Rammenver, *et al.*, Immunogenetics 41:178, 1995; Rammensee *et al.*, SYFPEITHI, acceso mediante la Red Mundial en la URL (134.2.96.221/scripts.hiaserver.dii/home.htm); Sette, A. y Sidney, J. *Curr. Opin. Immunol* 10:478, 1998; Engelhard, V.H., *Curr. Opin. Immunol.* 6:13, 1994; Sette, A. y Grey, H.M., *Curr. Opin. Immunol.* 4: 79,1992; Sinigaglia, F. y Hammer, *J. Curr. Biol.* 6:52, 1994; Ruppert *et al.*, *Cell* 74:929-937, 1993; Kondo *et al, J. Immunol* 155:4307-4312,1995; Sidney *et al.*, *J. Immunol.* 157:3480-3490, 1996; Sidney *et al.*, Human Immunol. 45: 79-93, 1996; Sette, A. y Sidney, *J. Immunogenetics* 1999 Nov; 50 (3-4):201-12, Revisión).

Adicionalmente, los análisis cristalográficos de Rayos X de complejos HLA-péptido han revelado bolsillos dentro de la hendidura/surco de enlace del péptido de moléculas HLA que acomodan de un modo específico a alelo, residuos portados por ligandos de péptido; estos residuos a su nez determinan la capacidad de enlace de HLA de los péptidos en los cuales están presentes. (Ver, e.g., Madden, D.R. *Annu. Rev. Immunol.* 13:587, 1995; Smith, *et al., Immunity* 4:203, 1996; Fremont *et al., Immunity* 8:305,1998; Stern *et al., Structure* 2:245, 1994; Jones, E.Y. *Curr. Opin. Immunol.* 9:75,1997; Brown, J. H. *et al, Nature* 364:33,1993; Guo, H. C. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:8053, 1993; Guo, H. C. *et al., Nature* 360:364, 1992; Silver, M. L. *et al, Nature* 360:367, 1992; Matsumura, M. *et al., Science* 257:927,1992; Madden *et al., Cell* 70:1035, 1992; Fremont, D. H. *et al., Science* 257: 919, 1992; Saper, M. A., Bjorkman, P. J. y Wiley, D. C., *J. Mol. Biol.* 219: 277,1991).

En consecuencia, la definición de motivos de enlace a HLA clase I y clase II específicos de alelo, o supermotivos clase I o clase II permite la identificación de regiones dentro de una proteína que están correlacionadas con un(os) antígeno(s) HLA particulares.

Así, mediante un proceso de identificación de motivo HLA se han identificado los candidatos para vacunas basadas en epítopo; tales candidatos pueden ser evaluados adicionalmente mediante ensayos de enlace HLA-péptido para determinar la afinidad de enlace y/o el período de tiempo de asociación del epítopo y su molécula HLA correspondiente. Trabajo confirmador adicional se puede hacer para seleccionar, entre estos candidatos de vacuna, epítopos con características preferidas en términos de cubrimiento de población y/o inmunogenicidad.

Se puede utilizar varias estrategias para evaluar la inmunogenicidad celular, incluyendo:

1) Evaluación de cultivos de célula T primarios de individuos normales (ver, e.g., Wentworth, P. A. *et al., Mol. Immunol.* 32:603, 1995; Celis, E. *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2105, 1994; Tsai, V. *et al., J. Immunol* 158:1796, 1997; Kawashima, I. *et al., Human Immunol.* 59:1,1998). Este procedimiento involucra la estimulación de linfocitos de sangre periférica (PBL) de sujetos normales con un péptido de prueba en la presencia de células que presentan antígeno *in vitro* durante un período de varias semanas. Las células T específicas para el péptido se activan durante este tiempo y son detectadas

usando, e.g., un ensayo de liberación de linfocina o ^{51}Cr que involucra células objetivo sensibilizadas con péptido.

2) Inmunización de ratones transgénicos HLA (ver, e.g., Wentworth, P. A. *et al.*, *J. Immunol.* 26:97, 1996; Wentworth, P. A. *et al.*, *Int. Immunol.* 8:651, 1996; Alexander, J. *et al.*, *J. Immunol* 159:4753, 1997). Por ejemplo, en tales métodos, los péptidos en adyuvante de Freund incompleto son administrados subcutáneamente a ratones transgénicos HLA. Varias semanas después de la inmunización, los esplenocitos son removidos y cultivados *in vitro* en la presencia de un péptido de prueba por aproximadamente una semana. Las células T específicas de péptido son detectadas usando, e.g., un ensayo de liberación de ^{51}Cr que involucra células objetivo sensibilizadas con péptido y células objetivo que expresan el antígeno generado endógenamente.

3) Demostración de las respuestas de memoria de célula T de individuos inmunes que han sido vacunados efectivamente y/o de pacientes c'ronicamente enfermos (ver, e.g., Rehermann, B. *et al.*, *J. Exp. Med.* 181:1047,1995; Doolan, D. L. *et al.*, *Immunity* 7:97, 1997; Bertoni, R. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100:503, 1997; Threlkeld, S. C. *et al.*, *J. Immunol.* 159:1648, 1997; Diepolder, H. M. *et al.*, *J. Virol* 71:6011, 1997). En consecuencia, las respuestas de memoria son detectadas cultivando PBL de sujetos que han sido expuestos al antígeno debido a la enfermedad, y así han generado una respuesta inmune "naturalmente", o de pacientes que fueron vacunados contra el antígeno. PBL de sujetos son cultivados *in vitro* por 1-2 semanas en la presencia de péptido de prueba más células que presentan antígeno (APC) para permitir la activación de células T de "memoria", comparadas con células T "inócuas". Al final del período de cultivo, la actividad de célula T es detectada usando ensayos que incluyen liberación de ^{51}Cr que involucran objetivos sensibilizados con péptido, proliferación de célula T, o liberación de linfocina.

VI.) Animales Transgénicos STEAP-1

Los ácidos nucleicos que codifican una proteína relacionada con STEAP-1 también se pueden usar para generar animales transgénicos o animales "eliminados" que, a su vez, son útiles en el desarrollo y selección de reactivos terapéuticamente útiles. De acuerdo con las técnicas establecidas, el cADN que codifica STEAP-1 se puede usar para clonar ADN genómico que codifica STEAP-1. Las secuencias genómicas clonadas pueden entonces ser usadas para generar animales transgénicos que contienen células que expresan el

ADN que codifica STEAP-1. Los métodos para generar animales transgénicos, particularmente animales tales como ratones o ratas, se han vuelto convencionales en la técnica y se describen, por ejemplo, en las Patentes U.S. Nos. 4,736,866 emitida el 12 de Abril 1988, y 4,870,009 emitida el 26 de Septiembre de 1989. Típicamente, células particulares serían marcadas para la incorporación del transgen STEAP-1 con mejoradores específicos de tejido.

Los animales transgénicos que incluyen una copia de un transgen que codifica STEAP-1 se pueden usar para examinar el efecto de la expresión aumentada de AND que codifica STEAP-1. Tales animales pueden usarse como animales de prueba para reactivos que se piensa que confieren protección de, por ejemplo, condiciones patológicas asociadas con su sobreexpresión. De acuerdo con este aspecto de la invención, un animal es tratado con un reactivo y una incidencia reducida de una condición patológica, comparada con animales no tratados que portan el transgen, indicaría una intervención terapéutica convencional para la condición patológica.

Alternativamente, los homólogos no humanos de STEAP-1 se pueden usar para construir un animal "eliminado" de STEAP-1 que tiene un gen alterado o defectuoso que codifica STEAP-1 como un resultado de la recombinación homóloga entre el gen endógeno que codifica STEAP-1 y el ADN genómico alterado que codifica STEAP-1 introducido en una célula embriónica del animal. Por ejemplo, el cADN que codifica STEAP-1 se puede usar para clonar el ADN genómico que codifica STEAP-1 de acuerdo con técnicas establecidas. Una porción del ADN genómico que codifica STEAP-1 puede ser eliminada o reemplazada con otro gen, tal como un gen que codifica un marcador seleccionable que se puede usar para monitorear la integración. Típicamente, varias kilobases de ADN de flanqueo inalterado (tanto en los extremos 5' y 3') son incubadas en el vector (ver, e.g., Thomas y Capecchi, Cell, 51:503 (1987) para una descripción de vectores de recombinación homólogos). El vector es introducido en una línea celular troncal embriónica (e.g., por electroporación) y las células en las cuales el ADN se ha recombinado homólogamente con el ADN endógeno son seleccionadas (ver, e.g., Li *et al.*, Cell, 69: 915 (1992)). Las células seleccionadas son entonces inyectadas en un blastocisto de un animal (e.g., un ratón o una rata) para formar quimeras de agregación (ver, e.g., Bradley, en Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E. J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987), pp. 113-152). Un embrión quimérico puede entonces ser implantado en un animal adoptivo hembra seudoembarazado adecuado, y el embrión es llevado a término para crear un

animal "eliminado". La progenia que porta ADN homólogamente recombinante en sus células gérmen se puede identificar mediante técnicas estándar y se usan para criar animales en las cuales las células del animal contienen el ADN homólogamente recombinante. Los animales eliminados pueden ser caracterizados, por ejemplo, por su habilidad para defender contra ciertas condiciones patológicas o por su desarrolo de condiciones patológicas debido a la ausencia de un polipéptido de STEAP-1.

VII.) Métodos para la Detección de STEAP-1

Otro aspecto de la presente invención se relaciona con métodos para detectar polinucleótidos de STEAP-1 y proteínas relacionadas con STEAP-1, así como con métodos para identificar una célula que expresa STEAP-1. El perfil de expresión de STEAP-1 lo hace un marcador de diagnóstico para enfermedad que ha hecho metástasis. En consecuencia, el estatus de los productos del gen STEAP-1 proveen unformación útil para predecir una variedad de factores incluyendo susceptibilidad a enfermedad en estado avanzado, velocidad de progresión, y/o agresividad del tumor. Como se discute aquí en detalle, el estatis de los productos del gen STEAP-1 en muestras de paciente pueden ser analizados mediante una variedad de protocolor que son bien conocidos en la técnica incluyendo análisis inmunohistoquímico, la variedad de técnicas de manchado al Norte incluyendo hibridación *in situ*, análisis de RT-PCR (por ejemplo en muestras micro-disecadas mediante captura con láser), análisis de manchas Occidentales y análisis de distribución de tejido.

Más particularmete, la invención provee ensayos para la detección de polinucleótidos de STEAP-1 en una muestra biológica, tal como suero, hueso, próstata, y otros tejidos, orina, semen, preparaciones celulares, y similares. Polinucleótidos de STEAP-1 detectables incluyen, por ejemplo, un gen STEAP-1 o fragmento del mismo, mARN de STEAP-1, mARNs de STEAP-1 de variante de corte y empalme alternativas, y moléculas de ADN o ARN que contienen un polinucleótido de STEAP-1. Un número de métodos para amplificar y/o detectar la presencia de polinucleótidos de STEAP-1 son bien conocidos en la técnica y se pueden emplear en la práctica de este aspecto de la invención.

En una realización, un método para detectar un mARN de STEAP-1 en una muestra biológica comprende producir cADN de la muestra mediante transcripción reversa usando al menos un iniciador; amplificar el cADN producid

de esta forma usando polinucleótidos de STEAP-1 como iniciadores en el sentido y en antisentido para amplificar los cADNs de STEAP-1 presentes; y detectar la presencia del cADN de STEAP-1 amplificado. Opcionalmente, la secuencia del cADN de STEAP-1 amplificado puede ser determinada.

En otra realización, un método para detectar un gen STEAP-1 en una muestra biológica comprende primero aislar el ADN genómico de la muestra; amplificar el ADN genómico aislado usando polinucleótidos de STEAP-1 como iniciadores en el sentido y en antisentido; y detectar la presencia del gen STEAP-1 amplificado. Se puede diseñar un número apropiado de combinaciones de sonda en el sentido y antisentido a partir de una secuencia de nucleótido de STEAP-1 (ver, e.g., Figura 2) y usarse para este propósito.

La invención también provee ensayos para detectar la presencia de una proteína STEAP-1 en un tejido u otra muestra biológica tal como suero, semen, hueso, próstata, orina, preparaciones celulares, y similares. Los métodos para detectar una proteína relacionada con STEAP-1 también son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, inmunoprecipitación, análisis inmunohistoquímico, análisis de manchado Occidental, ensayos de enlace molecular, ELISA, ELIFA y similares. Por ejemplo, un método para detectar la presencia de una proteína relacionada con STEAP-1 en una muestra biológica comprende primero contactar la muestra con un anticuerpo STEAP-1, un fragmento reactivo STEAP-1 del mismo, o una proteína recombinante que contiene una región de enlace a antígeno de un anticuerpo STEAP-1; y luego detectar el enlace de la proteína relacionada con STEAP-1 en la muestra.

Los métodos para identificar una célula que expresa STEAP-1 también están dentro del alcance de la invención. En una realización, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen STEAP-1 comprende detectar la presencia de mARN de STEAP-1 en la célula. Los mátodos para la detección de mARNs particulares en célula son bien conocidos e incluyen, por ejemplo, ensayos de hibridación usando sondas de ADN complementario (tales como hibridación *in situ* usando ribosondas de STEAP-1 marcadas, manchado al Norte y técnicas relacionadas) y varios ensayos de amplificación de ácido nucleico (tal como RT-PCR usando iniciadores complementarios específicos para STEAP-1, y otros métodos de detección del tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares). Alternativamente, un ensayo para identificar una célula que expresa un gen STEAP-1 comprende detectar la presencia de proteína relacionada con STEAP-1 en la célula o

secretada por la célula. Varios métodos para la detección de proteínas son bien conocidos en la técnica y se emplean para la detección de proteínas relacionadas con STEAP-1 y células que expresan proteínas relacionadas con STEAP-1.

El análisis de expresión de STEAP-1 también es útil como una herramienta para identificar y evaluar agentes que modulan la expresión del gen STEAP-1. Por ejemplo, la expresión de STEAP-1 es significativamente regulada ascendentemente en el cáncer de próstata, y está expresada en cánceres de los tejidos listados en la Tabla I. La identificación de una molécula o agente biológico que inhibe la expresión o sobreexpresión de STEAP-1 en células de cáncer es de valor terapéutico. Por ejemplo, tal agente puede ser identificado usando una selección que cuantifica la expresión de STEAP-1 mediante RT-PCR, hibridación de ácido nucleico o enlace de anticuerpo.

VIII.) Métodos para monitorear el Estatus de Genes relacionados con STEAP-1 y Sus productos

La oncogénesis es conocida por ser un proceso multietapas en donde el crecimiento celular se vuelve progresivamente desregulado y las células progresan de un estado fisiológico normal a precanceroso y luego a estados cancerosos (ver, e.g., Alers *et al.*, Lab Invest. 77 (5): (1997) y Isaacs *et al.*, Cancer Surv. 23:19-32 (1995)). En este contexto, examinar una muestra biológica para evidencia de crecimiento celular desregulado (tal como una expresión de STEAP-1 aberrante en cánceres) permite la detección temprana de tal fisiología aberrante, antes que un estado patológico tal como un cáncer haya progresado a un estado en donde las opciones terapéuticas son más limitadas y o el pronóstico es peor. En tales examenes, el estatus de STEAP-1 en una muestra biológica de interés puede ser comparado, por ejemplo, con el estatus de STEAP-1 en una muestra normal correspondiente (e.g. una muestra de ese individuo o alternativamente otro inidividuo que no es afectado por una patología). Una alteración del estatus de STEAP-1 en la muestra biológica (comparada con la muestra normal) provee evidencia de crecimiento celular desregulado. Además de usar una muestra biológica que no está afectada por una patología como una muestra normal, también se puede usar un valor normativo predeterminado tal como un nivel normal predeterminado de la expresión de mARN (ver, e.g., Grever *et al.*, J. Comp. Neurol. 1996 Dic 9; 376 (2): y la Patente U.S. No. 5,837,501) para comparar el estatus de STEAP-1 en una muestra.

El término "estatus" en este contexto se usa de acuerdo con su significado aceptado en la técnica y se refiere a la condición o estado de un gen y sus productos. Típicamente, los expertos usan un número de parámetros para evaluar la condición o estado de un gen y sus productos. Estos incluyen, pero no se limitan a la ubicación de productos de gen expresados (incluyendo la ubicación de células que expresan STEAP-1) así como el nivel, y actividad biológica de productos de gen expresados (tales como mARM, polinucleótidos y polipéptidos de STEAP-1). Típicamente, una alteración en el estatus de STEAP-1 comprende un cambio de la ubicación de STEAP-1 y/o células que expresan STEAP-1 y/o un aumento en el mARN de STEAP-1 y/o expresión de proteína.

El estatus de STEAP-1 es una muestra puede ser analizado por un número de medios bien conocidos en la técnica, incluyendo sin limitación, análisis inmunohistoquímico, hibridación *in situ*, análisis de RT-PCR sobre muestras micro-disecadas mediante captura con láser, Análisis de manchas Occidentales, y análisis de distribucón de tejido. Protocolos típicos para evaluar el estatus de un gen STEAP-1 y productos de gen se encuentran, por ejemplo en Ausubel *et al.* eds., 1995, Current Protocols In Molecular Biology, Units 2 (Northern Blotting), 4 (Southern Blotting), 15 (Immunoblotting) y 18 (PCR Analysis). Así, el estatus de STEAP-1 en una muestra biológica es evaluado por varios métodos utilizados por los expertos, incluyendo pero sin limitarse a análisis genómico al Sur (para examinar, por ejemplo perturbaciones en un gen STEAP-1), análisis al Norte y/o análisis de PCR de mARN de STEAP-1 (para examinar, por ejemplo alteraciones en las secuencias de polinucleótido o niveles de expresión de mARNs de STEAP-1), y, análisis Occidental y/o inmunohistoquímico (para examinar, por ejemplo alteraciones en las secuencias de polipéptido, alteraciones de la localización del polipéptido dentro de una muestra, alteraciones en niveles de expresión de proteínas de STEAP-1 y/o asociaciones de proteínas de STEAP-1 con compañeros de enlace a polipéptido). Polipéptidos de STEAP-1 detectables incluyen, por ejemplo, un gen STEAP-1 o fragmento del mismo, mARN de STEAP-1, variantes de corte y empalme alternativas, mARNs de STEAP-1, y moléculas de ADN o ARN recombinantes que contienen un polinucleótido de STEAP-1.

El perfil de expresión de STEAP-1 lo hace un marcador de diagnóstico àra la enfermedad local y/o que ha hecho metástasis, y provee información sobre el crecimiento o potencial oncogénico de una muestra biológica. En particular, el estatus de STEAP-1 provee información útil para predecir la

susceptibilidad a estados de enfermedad particulares, progresión, y/o agresividad del tumor. La invención provee métodos y ensayos para determinar el estatus de STEAP-1 y diagnosticar cánceres que expresan STEAP-1, tales como cánceres de los tejidos listados en la Tabla I. Por ejemplo, como el mARN de STEAP-1 está tan altamente expresados en cáncer de próstata y otros cánceres con relación con tejidos de próstata normales, se pueden usar ensayos que evaluan los niveles de transcritos o proteínas de mARN de STEAP-1 en una muestra biológica, para diagnosticar una enfermedad asociada con la desregulación de STEAP-1, y pueden proveer información de pronóstico útil para definir las opciones terapéuticas apropiadas.

El estatus de expresión de STEAP-1 provee información que incluye la presencia, estado y ubicación de células displásticas, precancerosas y cancerosas, prediciendo la susceptibilidad a varios estados de enfermedad, y/o para medir la agresividad del tumor. Más aún, el perfil de expresión lo hace útil como un reactivo de representación g´rafica para la enfermedad que ha hecho metástasis. En consecuencia, un aspecto de la invención está dirigido a los diferentes métodos de pronóstivo y diagnóstivo molecular para examinar el estatus de STEAP-1 en muestras biológicas tales como las de individuos que sufren de, o se sospecha que sufren de una patología caracterizada por crecimiento celular desregulado, tal como un cáncer.

Como se describe aquí, el estatus de STEAP-1 en una muestra biológica puede ser examinado por un número de procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, el estatus de STEAP-1 en una muestra biológica tomado de una ubicación específica en el cuerpo puede ser examinado evaluando la muestra para la presencia o ausencia de células que expresan STEAP-1 (e.g. aquellas que expresan mARNs o proteínas de STEAP-1). Este examen puede proveer evidencia de crecimiento celular desregulado, por ejemplo, cuando se encuentran células que expresan STEAP-1 en una muestra biológica que normalmente no contiene tales células (tal como un ganglio linfático), porque tales alteraciones en el estatus de STEAP-1 en una muestra biológica está usualmente asociado con crecimiento celular desregulado. Específicamente, un indicador de crecimiento celular desregulado es la metástasis de células de cáncer de un organo de orígen (tal como la próstata) a un área diferente del cuerpo (tal como ganglio linfático). En este contexto, la evidencia de crecimiento celular desregulado es importante por ejemplo, porque la metástasis de ganglio linfático oculto puede ser detectada en una proporción sustancial de pacientes con cáncer de próstata, y tales metástasis están asociadas con pronosticadores

conocidos de progresión de enfermedad (ver, e.g., Murphy *et al.*, Prostate 42 (4): 315-317 (2000); Su *et al.*, Semin. Surg. Oncol. 18(1): 17-28 (2000) y Freeman *et al.*, J Urol 1995 Aug 154 (2 Pt 1):474-8).

En un aspecto, la invención provee métodos para monitoerar productos del gen STEAP-1 determinando el estatus de los productos del gen STEAP-1 expresados por células de un individuo que se sospecha que tiene una enfermedad con crecimiento celular desregulado (tal como hiperplasia o cáncer) y luego comparando el estatus determinado de esta forma con el estatus de productos del gen STEAP-1 en una muestra normal correspondiente. La presencia de productos del gen STEAP-1 aberrantes en la muestra de prueba con relación a la muestra normal provee una indicación de la presencia de crecimiento celular desregulado dentro de las células del individuo.

En otro aspecto, la invención provee ensayos útiles para determinar la presencia de un cáncer en un individuo, que comprende detectar un aumento significativo en la expresión de mARN o proteína STEAP-1 en una célula de prueba o muestra de tejido con relación a los niveles de expresión en la célula o tejido normal correspondiente. La presencia de mARN de STEAP-1 puede, por ejemplo, ser evaluada en tejidos incluyendo pero sin limitarse a aquellos listados en la Tabla I. La presencia de fia expresión de STEAP-1 significativa en cualquiera de estos tejidos es útil para indicar al aparición, presencia y/o severidad de un cáncer, porque los tejidos normales correspondientes no expresan mARN de STEAP-1 o lo expresan a niveles menores.

En una realización relacionada, el estatus de STEAP-1 es determinado en el nivel de proteína en lugar de en el nivel de ácido nucleico. Por ejemplo, tal método comprende determinar el nivel de proteína STEAP-1 expresada por células en una muestra de tejido de prueba y comparar el nivel determinado de esta forma con el nivel de STEAP-1 expresado en una muestra normal correspondiente. En una realización, la presencia de proteína STEAP-1 es evaluada, por ejemplo, usando métodos inmunohistoquímicos. Los anticuerpos STEAP-1 o compañeros de enlace capaces de detectar la expresión de la proteína STEAP-1 se usan en una variedad de formatos de ensayo bien conocidos en la técnica para este propósito.

En una realización adicional, se puede evaluar el estatus de nucleótido y secuencias de amino ácido de STEAP-1 en una muestra biológica con el fin de identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas. Estas

perturbaciones pueden incluir inserciones, eliminaciones, sustituciones y similares. Tales evaluaciones son útiles porque las perturbaciones en el nucleótido y secuencias de amino ácido se observan en un gran número de proteínas asociadas con un fenotipo de crecimiento desregulado (ver, e.g., Marrogi *et al.*, 1999, J. Cutan. Pathol. 26 (8):369-378). Por ejemplo, una mutación en la secuencia de STEAP-1 puede ser indicativa de la presencia o promoción de un tumor. Tales ensayos tienen, por lo tanto, valor de diagnóstivo y predictivo cuando una mutación en STEAP-1 indica una pérdida potencial de la función o aumento en el crecimiento de tumor.

Una amplia variedad de ensayos para observar perturbaciones en el nucleótido y secuencias de amino ácido es bien conocida en la técnica. Por ejemplo, el tamaño y estructura de las secuencias de ácido nucleico o amino ácido de los productos del gen STEAP-1 son observados por los protocolos al Norte, al Sur, Occidental, de PCR y secuenciamiento de ADN discutidos aquí. Adicionalmente, otros métodos para observación de perturbaciones en las secuencias de nucleótido y amino ácido, tal como análisis de polmorfismo de conformación de cadena simple, son bien conocidos en la técnica (ver, e. g., Patentes U.S. Nos. 5,382,510 emitida el 7 de Septiembre de 1999, y 5,952,170 emitida el 17 de Enero de 1995).

Adicionalmente, se puede examinar el estatus de metilación de un gen STEAP-1 en una muestra biológica. La Desmetilación y/o hipermetilación aberrante de las islas CpG en regiones reguladoras 5' del gen se encuentran frecuentemente en células inmortalizadas o transformadas, y puede producir la expresión alterada de varios genes. Por ejemplo, la hipermetilación de promotor de la glutatión S-transferasa clase pi (una proteína expresada en próstata normal pero no expresada en >90% de los caminomas de próstata) parece silenciar permanentemente la transcripción de este gen y es la alteración genómica detectada más frecuentemente en carcinomas de próstata (De Marzo *et al.*, Am. J. Pathol. 155(6): 1985-1992 (1999)). Adicionalmente, esta alteración está presente en al menos 70% de los casos de neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) (Brooks *et al.*, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 1998, 7: 531-536). En otro ejemplo, la expresión del gen específico de tumor LAGE-I (que no está expresado en la próstata normal pero está expresado en 25-50% de los cánceres de próstata) es indicada por deoxi-azacitidina en células de linfoblastoide, sugiriendo que la expresión tumoral se debe a la desmetilación (Lethe *et al.*, Int. J. Cancer 76 (6): (1998)). Una variedad de ensayos para examinar el estatus de mutilación de un gen son bien

conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden utilizar, en criterios de hibridación al Sur, enzimas de reacción sensibles a la metilación que no pueden clivar secuencias que contienen sitios CpG metilados para evaluar el estatus de metilación de las islas CpG. Adicionalmente, la MSP (PCR específica de metilación) puede rápidamente esbozar el estatus de metilación de todos los sitios CpG presentes en una isla CpG de un gen dado. Este procedimiento involucra la modificación inicial del ADN mediante bisulfito de sodio (que convertirá todas las citosinas no metiladas a uracilo) seguido por amplificación usando iniciadores específicos para ADN metilado versus no metilado. Los protocolos que involucran interferencia de metilación también se pueden encontrar por ejemplo en Current Protocols In Molecular Biology, Unit 12, Frederick M. Ausubel et al, eds., 1995.

La amplificación de gen es un método adicional para evaluar el estatus de STEAP-1. La amplificación de gen se mide en una muestra directamente, por ejemplo, mediante manchado al Sur o manchado al Norte convencional para cuantificar la transcripción de mARN (Thomas, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 5201-5205), manchas punteadas (análisis de ADN), o hibridación *in situ*, usando una sonda marcada apropiadamente, con base en las secuencias proporcionadas aquí. Alternativamente, se emplean anticuerpos que reconocen duplos específicos, incluyendo duplos de ADN, duplos de ARN, y duplos de híbrido ADN-ARN o duplos de ADN-proteína. Los anticuerpos a su vez son marcados y el ensayo se realiza en donde el duplo está enlazado a una superficie, de forma que a la formación del duplo en la superficie, la presencia del anticuerpo enlazado al duplo puede ser detectada.

El tejido de biopsia o sangre periférica pueden ser ensayados convenientemente para la presencia de células de cáncer usando por ejempo, análisis al Norte, manchas punteadas o RT-PCR para detectar la expresión de STEAP-1. La presencia de mARM de STEAP-1 amplificable por RT-PCR provee una indicación de la presencia de cáncer. Los ensayos de RT-PCR son bien conocidos en la técnica. Los ensayos de detección de RT-PCR para células de tumor en sangre periférica están siendo evaluados actualmente para uso en el diagnóstico y manejo de un número de tumores sólidos humanos. En el campo del cáncer de próstata, estos incluyen ensayos de RT-PCR para la detección de células que expresan PSA y 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).

Un aspecto adicional de la invención es una evaluación de la susceptibilidad que un individuo tiene para desarrollar cáncer. En una realización, un método para predecir la susceptibilidad al cáncer, comprende detectar mARN de STEAP-1 o proteína STEAP-1 en una muestra de tejido, su presencia indica la susceptibilidad al cáncer, en donde el grado de expresión de mARN de STEAP-1 se correlaciona con el grado de susceptibilidad. En una realización específica, la presence de STEAP-1 en la próstata u otro tejido es examinada, la presencia de STEAP-1 en la muestra provee una indicación de susceptibilidad de cáncer de próstata (o la aparición o existencia de un tumor de próstata). Igualmente, se puede evaliar la integridad de las secuencias de nucleótido y amino ácido de STEAP-1 en una muestra biológica, con el fin de identificar las perturbaciones en la estructura de estas moléculas, tales como inserciones, eliminaciones, sustituciones y similares. La presencia de una o más perturbaciones en los productos del gen STEAP-1 en la muestra es una indicación de la susceptibilidad de cáncer (o la aparición o existencia de un tumor).

La invención también comprende métodos para medir la agresividad del tumor. En una realización, un método para medir la agresividad de un tumor comprende determinar el nivel de mARN de STEAP-1 o proteína mRNA expresado por células de tumor, comparar el nivel determinado de esta forma con el nivel de mARN de STEAP-1 o proteína STEAP-1 expresado en un tejido normal correspondiente tomado del mismo individuo o una muestra de referencia de tejido normal, en donde el grado de expresión de mARN de STEAP-1 o proteína STEAP-1 en la muestra de tumor relativa a la muestra normal indica el grado de agresividad. En una realización específica, la agresividad de un tumor se evalua determinando la extensión a la cual STEAP-1 está expresado en las células de tumor, los niveles de expresión mayores indican tumores más agresivos. Otra realización es la evaluación de la integridad de secuencias de nucleótido y amino ácido de STEAP-1 en una muestra biológica, con el fin de identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, eliminaciones, sustituciones y similares. La presencia de una o más perturbaciones indica tumores más agresivos.

Otra realización de la invención está dirigida a métodos para observar la progresión de una malignancia en un individuo en el tiempo. En una realización, los métodos para observar la progresión de una malignancia en un individuo en el tiempo comprende determinar el nivel de mARN de STEAP-1 o proteína

STEAP-1 expresado por células en una muestra del tumor, comparar el nivel determinado de esta forma con el nivel de mARN de STEAP-1 o proteína STEAP-1 expresado en una muestra de tejido equivalente tomada del mismo individuo a un tiempo diferente, en donde el grado de expresión de mARN de STEAP-1 o proteína STEAP-1 en la muestra de tumor durante el tiempo, provee información en la progresión del cáncer. En una realización específica, la progresión de un cáncer es evaluado determinando la expresión de STEAP-1 en las células de tumor durante el tiempo, en donde la expresión aumentada en el tiempo indica la progresión del cáncer. Además, se puede evaluar la integridad de las secuencias de nucleótido o amino ácido de STEAP-1 en una muestra biológica con el fin de identificar perturbaciones en la estructura de estas moléculas tales como inserciones, eliminaciones, sustituciones y similares, en donde la presencia de una o más perturbaciones indica una progresión del cáncer.

Los criterios de diagnóstico anteriores pueden ser combinados con cualquiera de la amplia variedad de protocolos de pronóstico y diagnóstico conocidos en la técnica. Por ejemplo, otra realización de la invención está dirigida a métodos para observar una coincidencia entre la expresión del gen STEAP-1 y los productos del gene STEAP-1 (o perturbaciones en un gen STEAP-1 y productos del gen STEAP-1) y un factor que está asociado con malignancia, como un medio para diagnosticar y pronosticar el estatus de una muestra de tejido. Una amplia variedad de factores asociados con malignancia se pueden utilizar, tales como la expresión de genes asociados con malignancia (e.g. expresión de PSA, PSCA y PSM para el cáncer de próstata etc.), así como observaciones citológicas gruesas (ver, e.g., Bocking *et al.*, 1984, Anal. Quant. Cytol. 6(2):74-88; Epstein, 1995, Hum. Pathol. 26 (2):223-9; Thorson *et al.*,1998, Mod. Pathol. 11 (6):543-51; Baisden *et al.*, 1999, Am. J. Surg. Pathol. 23 (8):918-24). Los métodos para observar una coincidencia entre la expresión del gen STEAP-1 y los productos del gen STEAP-1 (o perturbaciones en el gen STEAP-1 y los productos del gen STEAP-1) y otro factor que está asociado con malignancia son útiles, por ejemplo, porque la presencia de un conjunto de factores específicos que coinciden con la enfermedad proveen información crucial para al diagnóstico y pronóstico del estatus de una muestra de tejido.

En una realización, los métodos para observar una coincidence entre la expresión del gen STEAP-1 y los productos del gen STEAP-1 (o perturbaciones en el gen STEAP-1 y productos del gen STEAP-1) y otro factor asociado con malignancia implica detectar la sobreexpresión de mARN o proteína STEAP-1

en una muestra de tejido, detectar la sobreexpresión de mARN o proteína de PSA en una muestra de tejido (o expresión de PSCA o PSM), y observar una coincidencia de sobreexpresión de mARN o proteína de STEAP-1 y de mARN o proteína de PSA (o expresión de PSCA o PSM). En una realización específica, la expresión de mARN de STEAP-1 y mARN de PSA en el tejido de próstata es examinada, en donde la coincidencia de la sobreexpresión de mARN de STEAP-1 y PSA en la muestra indica la exsistencia de cáncer de próstata, susceptibilidad de cáncer de próstata o aparición o estatus de un tumor de próstata.

Los métodos para detectar y cuantificar la expresión de mARN o proteína de STEAP-1 se describen aquí, y las tecnologías estándar de detección y cuantificación de ácido nucleico y proteína son bien conocidas en la técnica. Los métodos estándar para la detección y cuantificación de mARN de STEAP-1 inclyen la hibridación *in situ* usando ribosondas de STEAP-1 marcadas, manchas al Norte y técnicas relacionadas usando sondas de polinucleótido de STEAP-1, análisis de RT-PCR usando iniciadores específicos para STEAP-1, y otros métodos de detección del tipo amplificación, tales como, por ejemplo, ADN ramificado, SISBA, TMA y similares. En una realización específica, se usa RT-PCR semi-cuantitativa para detectar y cuantificar la expresión de mARN de STEAP-1. Se puede usar cualquier número de iniciadores capaces de amplificar STEAP-1 para este propósito, incluyendo, pero sin limitarse a los varios conjuntos de iniciadores específicamente descritos aquí. En una realización específica, se pueden usar anticuerpos policionales o monoclonales específicamente reactivos con la proteína STEAP-1 tipo nativa en un ensayo inmunohistoquímico de tejido de biopsia.

IX.) Identificación de Moléculas que Interactúan con STEAP-1

Las secuencias de proteína y ácido nucleico de STEAP-1 reveladas aquí permiten que un experto identifique proteínas, moléculas pequeñas y otros agentes que interactúan con STEAP-1, así como rutas activadas por STEAP-1 mediante cualquiera de una variedad de protocolos aceptados en la técnica. Por ejemplo, se puede utilizar uno de los llamados sistemas de trampa de interacción (también referidos como el "ensayo doble híbrido"). En tales sistemas, las moléculas interactúan y resonstituyen un factor de transcripción que dirige la expresión de un gen reportero, con lo cual la expresión del gen

reportero es ensayada. Otros sitemas identifican interacciones proteína-proteína *in vivo* a través de la reconstitución de un activador transcripcional eucariótico, ver, e.g., Patentes U.S. Nos. 5,955,280 emitida el 21 de Septiembre de 1999, 5,925,523 emitida el 20 de Julio de 1999, 5,846,722 emitida el 8 de Diciembre de 1998 y 6,004,746 emitida el 21 de Diciembre de 1999. Algoritmos también estan disponibles en la técnica para las predicciones basadas en genoma de función de proteína (ver, e.g., Marcotte, *et al.*, Nature 402: 4 Noviembre 1999, 83-86).

Alternativamente, se pueden seleccionar bibliotecas de péptido para identificar moléculas que interactuan con las secuencias de proteína STEAP-1. En tales métodos, los péptidos que se enlazan a STEAP-1 se identifican seleccionando bibliotecas que codifican una colección de amino ácidos aleatoria o controlada. Los péptidos codificados por las bibliotecas son expresadas como proteínas de fusión de proteínas recubiertas de bacteriófago, las partículas de bacteriófago aon entonces seleccionadas contra la(s) proteínas de STEAP-1.

En consecuencia, los péptidos que tienen una amplia variedad de usos, tales como reactivos terapéuticos, de pronóstico o diangóstico, son así identificados sinninguna información previa sobre la estructura del ligando o molécula receptora esperada. Las bibliotecas de péptido típicas y los métodos de selección que se pueden usar para identificar moléculas que interactúan con secuencias de proteína STEAP-1 se revelan por ejemplo en las Patentes U.S. Nos. 5,723,286 emitida el 3 de Marzo de 1998 y 5,733,731 emitida el 31 de Marzo de 1998.

Alternativamente, líneas celulares que expresan STEAP-1 se usan para identificar interacciones proteína-proteína mediadas por STEAP- 1. Tales interacciones pueden ser examinadas usando técnicas de inmunoprecipitación (ver, e.g., Hamilton B.J., *et al.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 261: 646-51). La proteína STEAP-1 puede ser inmunoprecipitada de líneas celulares que expresan STEAP-1 usando anticuerpos anti-STEAP-1. Alternativamente, los anticuerpos contra etiqueta de His se pueden usar en una línea celular diseñada para expresar fusiones de STEAP-1 y una etiqueta de His (vectores mencionados anteriormente). El complejo inmunoprecipitado puede ser examinado para asociación de proteína mediante procedimientos tales como manchado Occidental, etiquetado con 35S-metionina de proteínas, microsecuenciamiento de proteína, tinción de plata y electroforesis de gel bidimensional.

Las moléculas pequeñas y ligandos que interactúan con STEAP-1 pueden ser identificados a través de realizaciones relacionadas de tales ensayos de selección. Por ejemplo, se pueden identificar moléculas pequeñas que interfieren con la función de proteína, incluyendo moléculas que interfieren con la habilidad del STEAP-1 para mediar la fosforilación y des-fosforilación, interacción con moléculas de ADN o ARN como una indicación de la regulación de ciclos celulares, señalización de segundo mensajero o tumorigénesis. Igualmente, moléculas pequeñas que modulan el canal de ión relacionado don STEAP-1, bomba de proteína, o funciones de comunicación celular son identificadas y usadas para ptratar pacientes que tienen un cáncer que expresses STEAP-1 (ver, e.g., Hille, B., Ionic Channels of Excitabea Membranas 2nd Ed., Sinauer Assoc., Sunderland, MA, 1992). Más aún, los ligandos que regulan la función STEAP-1 se pueden identificar con base en su habilidad para enlazarse a STEAP-1 y activar un constructo reportero. Métodos típicos se discuten por ejemplo en la Patente U.S. No. 5,928,868 emitida el 27 de Julio de 1999, e incluyen métodos para formar ligandos híbridos en los cuales al menos un ligando es una molécula pequeña. En una realización ilustrativa, las células diseñadas para expresar una proteína de fusión de STEAP-1 y una proteína que se enlaza a ADN se usan para co-expresar una proteína de fusión de un ligando híbrido/molécula pequeña y una proteína activadora transcripcional de biblioteca de cADN. Las células contienen además un gen reportero, cuya expresión está condicionada en la proximidad de la primera y segunda proteínas de fusión entre sí, un evento que ocurre solamente si el ligando híbrido se enlaza a los sitios objetivos en ambas proteínas híbridas. Aquellas células que expresan el gen reportero son seleccionadas y la molécula pequeña desconocida o el ligando desconocidos es identificado. Este método provee un medio para identificar moduladores, que activan o inhiben STEAP-1.

Una realización de esta invention comprende un método para seleccionar una molécula que interactúa con una secuencia de amino ácido de STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3, que comprende los pasos de contactar una población de moléculas con una secuencia de amino ácido de STEAP-1, permitiendo que la población de moléculas y la secuencia de amino ácido de STEAP-1 interactúen bajo condiciones que facilitan una interacción, determinando la presencia de una molécula que interactúa con la secuencia de amino ácido de STEAP-1, y luego separando las moléculas que no interactúan con la secuencia de amino ácido de STEAP-1 de las moléculas que sí. En una realización específica, el método comprende además purificar, caracterizar e

identificar una molécula que interactúa con la secuencia de amino ácido de STEAP-1. La molécula identificada se puede usar para modular una función realizada por STEAP-1. En una realización preferida, la secuencia de aminoácido de STEAP-1 es contactada con una biblioteca de péptidos.

X.) Métodos Terapéuticos y Composiciones

La identificación de STEAP-1 como una proteína que está normalmente expresada en un conjunto restringido de tejidos, pero que también está expresada en cánceres tales como los listados en la Tabla I, abre un número de criterios terapéuticos para el tratamiento de tales cánceres.

De notar, las terapias antitumor marcadas han sido útiles incluso cuando la proteína objetivo está expresada en tejidos normales, incluso tejidos de órganos normales vitales. Un órgano vital es uno que es necesario para mantener la vida, tal como el corazón o el colon. Un órgano no vital es uno que puede ser removido con lo cual el individuo es aún capaz de sobrevivir. Ejemplos de órganos no vitales con ovario, seno, y próstata.

Por ejemplo, Herceptin® es un farmacéutico aprovado por la FDA approved que consiste de un anticuerpo que es inmunoreactivo con la proteína variadamente conocida como HER2, HER2/neu, y erb-b-2. Es comercializado por Genentech y ha sido un agente antitumor comercialmente exitoso. Las ventas de Herceptin® alcanzaron casi $400 millones de 2002. Herceptin® es un tratamiento para el cáncer de seno metastático positivo para HER2. Sin embargo, la expresión de HER2 no está limitada a tales tumores. La misma proteína está expresada en un número de tejidos normales. En particular, se conoce que HER2/neu está presente en el riñón y corazón normales, por ende estos tejidos están presentes en todos los recipientes humanos de Herceptina. La presencia de HER2/neu en el riñón normal fue también confirmada por Latif, Z., et al., B.J.U. *International* (2002) 89:5-9. Como se muestra en este artículo (que evaluó si el carcinoma de célula renal debe ser una indicación preferida anticuerpos anti-HER2 tal como Herceptina) la proteína y mARN son producidos en tejidos renales benignos. Notablemente, la proteína HER2/neu estaba fuertemente sobreexpresada en tejido renal benigno. A pesar del hecho que HER2/neu está expresada en tales tejidos vitales como corazón y riñón, la Herceptina en un fármaco muy útil, aprovado por la FDA, y comercialmente exitosa. El efecto de la Herceptina en tejido cardiaco, i.e., "cardiotoxicicidad" ha sido simplemente un efecto secundario al tratamiento. Cuando los pacientes

fueron tratados con Herceptina sola, cardiotocicidad apareció en un porcentaje muy bajo de pacientes. Para minimizar la cardiotoxicidad existe un requerimiento de entrada más severo para el tratamiento con HER2/neu. Factores tales como predisposición a condición cardiaca son evaluados antes que el tratamiento se dé.

De nota particular, aunque está indicado que el tejido de riñón exhibe expresión normal, posiblemente incluso con expresión mayor que el tejido cardíaco, el riñón no tiene efecto secundario por Herceptin apreciable cualquiera que sea. Más aún, de la distribución diversa de tejidos normal en los cuales HER2 está expresada, hay poca ocurrencia de cualquier efecto secundario. Solamente el tejido cardíaco ha manifestado cualquier efecto secundario apreciable en absoluto. Un tejido tal como riñón, cuando la expresión de HER2/neu es especialmente notable, no ha sido la base de ningún efecto secundario.

Adicionalmente, se han encontrado efectos terapéuticos favorables para terapias antitumor que marcan el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR); Erbitux (ImClone). El EGFR también está expresado en numerosos tejidos normales. Ha habido efectos secundarios muy limitados en los tejidos normales siguiendo el uso de terapéuticos anti-EGFR. Un efecto secundario general que se encuentra con el tratamiento EGFR es un salpullido de piel severo observado en el 100% de los pacientes sometidos a tratamiento.

Así, la expresión de una proteína objetivo en tejido normal, incluso tejido normal vital, no frusta la utilidad de un agente de marcado para la proteína como un terapéutico para ciertos tumores en los cuales la proteína también está sobreexpresada. Por ejemplo, la expresión en órganos vitales no es en sí perjudicial. Adicionalmente, órganos considerados como prescindible, tal como la próstata y ovario, pueden ser removidos sin afectar la mortalidad. Finalmente, algunos órganos vitales no son afectados por la expresión de órgano normal debido a un inmunoprovilegio. Los órganos inmunoprovilegiados son órganos que están protegidos de la sangre mediante una barrera hematoorgánica y por ende no son accesibles a la inmunoterapia. Ejemplos de órganos inmunoprovilegiados son el cerebro y los testículos.

En consecuencia, los enfoques terapéuticos que inhiben la actividad de una proteína STEAP-1 son útiles para pacientes que sufren de un cáncer que expresa STEAP-1. Estos enfoques terapéuticos generalmente caen en tres

clases. La primera clase modula la función STEAP-1 porque se relaciona con el crecimiento celular de tumor que conduce a la inhibición o retardo del crecimiento celular de tumor o induce su eliminación. La segunda clase comprende varios métodos para inhibir el enlace o asociación de una proteína STEAP-1 con su compañero de enlace o con otras proteínas. La tercera clase comprende una variedad de métodos para inhibir la transcripción de un gen STEAP-1 o la traducción del mARN de STEAP-1.

X.A.) Vacunas Anti-Cancer

La invención provee vacunas contra el cáncer que comprenden una proteína relacionada con STEAP-1 o ácido nucleico relacionado con STEAP-1. En vista de la expresión de STEAP-1, las vacunas contra cáncer evitan y/o tratan cánceres que expresan STEAP-1 con efectos mínimos en tejidos no objetivos. El uso de un antígeno de tumor en una vacuna que genera respuestas inmunes humorales mediadas por célula como terapia anticáncer es bien conocido en la técnica y ha sido empleado en el cáncer de próstata usando inmunógenos de PSMA humao y PAP de roedor (Hodge *et al.*, 1995, Int. J. Cancer 63: 231-237; Fong *et al.*, 1997, J. Immunol. 159:3113-3117).

Tales métodos pueden ser fácilmente practicados empleando una proteína relacionada con STEAP-1, o una molécula que codifica ácido nucleico de STEAP-1 y vectores recombinantes capaces de expresar y presentar el inmunógeno STEAP-1 (que comprenden típicamente un número de epítopos de célula T o anticuerpo). Los expertos entienden que una amplia variedad de sistemas de vacuna para liberación de epítopos inmunorreactivos son conocidos en la técnica (ver, e.g., Heryln *et al.*, Ann Med 1999 Feb 31(1):66-78; Maruyama *et al.*, Cancer Immunol Immunother 2000 Jun 49(3):123-32). Brevemente, tales métodos para generar una respuesta inmune (e.g. mediada por célula y/o humoral) en un mamífero, comprende los pasos de: exponer el sistema inmune del mamífero a un epítopo inmunorreactivo (e.g. un epítopo presente en una proteína STEAP-1 mostrada en la Figura 3 o análogo u homólog de la misma) de forma que el mamífero genera una respuesta inmune que es específica para ese epítopo (e.g., genera anticuerpos que reconocen específicamente ese epítopo). En un método preferido, un inmunógeno STEAP-1 contiene un motivo biológico, ver e.g., Tablas V-XVIII y XXII-LI, o un

péptido de un rango de tamaño del STEAP-1 indicado en la Figura 5, Figura 6, Figura 7, Figura 8, y Figura 9.

La proteína STEAP-1 entera, regiones inmunogénicas o epítopos de la misma pueden ser combinados y liberados por varios medios. Tales composiciones de vacuna pueden incluir, por ejemplo, lipopéptidos (e.g., Vitiello, A. *et al.*, J. Clin. Invest. 95: 341, 1995), composiciones de péptido encapsuladas en microesferas de poli(DL-lactida-co-glicolida) ("PLG") (ver, e.g., Eldridge, *et al.*, *Molec.Immunol.* 28: 287-294, 1991: Alonso *et al.*, *Vaccine* 12:299-306,1994; Jones *et al.*, *Vaccine* 13:675-681, 1995), composiciones de péptido contenidas en complejoas estimulantes (ISCOMS) (*ver*, e.g., Takahashi *et al.*, Nature 344:873- 875,1990; Hu *et al.*, *Clin Exp Immunol.* 113:235-243,1998), sistemas de antígeno péptido múltiples (MAPs) (*ver*, e.g., Tam, J.P., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:5409-5413, 1988; Tam, J.P., *J. Immunol. Methods* 196: 17-32,1996), péptidos formulados como péptidos multivalentes; péptidos para uso en sistemas de liberación balísticos, típicamente péptidos cristalizados, vectores de liberación viral (Perkus, M. E. *et al.*, En: Concepts in vaccine development, Kaufmann, S.H.E., ed., p. 379,1996; Chakrabarti, S. *et al.*, Nature 320:535, 1986; Hu, S.L. *et al.*, Nature 320:537, 1986; Kieny, M.-P. *et al.*, AIDS Bio/Technology 4:790, 1986; Top, F. H. *et al.*, *J. Infect. Dis.* 124:148, 1971; Chanda, P. K. *et al.*, *Virology* 175:535, 1990), partículas de origen viral o sintético (e.g., Kofler, N. *et al.*, J. *Immunol. Methods*, 192:25,1996; Eldridge, J.H. *et al.*, *Sem. Hematol.* 30:16, 1993; Falo, L.D., Jr. *et al.*, *Nature Med.* 7: 649, 1995), adyuvantes (Warren, H.S., Vogel, F.R., y Chedid, L.A. *Annu. Rev. Immunol.* 4:369, 1986; Gupta, R.K. *et al.*, *Vaccine* 11:293,1993), liposomas (Reddy, R. *et al.*, *J. Immunol.* 148:1585, 1992; Rock, K.L., *Immunol. Today* 17:131, 1996), o, cADN desnudo o absorbido por partícula (Ulmer, J. B. *et al.*, *Science* 259:1745, 1993; Robinson, H.L., Hunt, L.A., y Webster, R.G., *Vaccine* 11:957, 1993; Shiver, J. W. *et al.*, En: Concepts in vaccine development, Kaufmann, S.H.E., ed., p. 423,1996; Cease, K.B., y Berzofsky, J. A., *Annu. Rev. Immunol.* 12:923, 1994 y Eldridge, J. H. *et al.*, Sem. Hematol. 30:16,1993). Tecnologías de liberación marcadas con toxina, también conocidas como marcado mediado por receptor, tal como las de Avant Immunotherapeutics, Inc. (Needham, Massachusetts), también se pueden usar.

En pacientes con cáncer asociado con STEAP-1, las composiciones de vacuna de la invención también se pueden usar en conjunción con otros tratamientos usados para el cáncer, e.g., cirujía, quimioterapia, terapias de

fármaco, terapias de radicación, etc,. incluyendo uso en combinación con adyuvantes inmunes tales como IL-2, IL-12, GM-CSF, y similares.

Vacunas Celulares:

Los epítopos CTL se pueden determinar usando algoritmos específicos para identificar péptidos dentro de la proteína STEAP-1 que se enlaza a alelos HLA correspondientes (ver e.g., Tabla IV; Epimer™ y Epimatrix™, Brown University (URL brown.edu/Research/TB- HIV_Lablepimatrix/epimatrix. html); y, BIMAS, (URL bimas.dcrt.nih.gov/; SYFPEITHI en URL syfpeithi.bmi-heidelberg.com/). En una realización preferida, un inmunógeno STEAP-1 contiene una o más secuencias de amino ácido identificadas usando técnicas bien conocides en la técnica, tales como las secuencias mostradas en las Tablas V-XVIII y XXII-LI o un péptido de 8, 9, 10 u 11 amino ácidos especificados por un motivo/supermotivo de HLA Clase I (e.g., Tabla IV (A), Tabla IV (D), o Tabla IV (E)) y/o un péptido de al menos 9 amino ácidos que comprende un motivo/supermotivo de HLA Clase II (e.g., Tabla IV (B) o Tabla IV (C)). Como se aprecia en la técnica, el surco de enlace de HLA Clase I es esencialmente de extremo cerrado de forma que los péptidos de solamente un rango de tamaño particular pueden caber en el surco y enlazarse, generalmente los epítodos de HLA Clase I son de 8, 9, 10, u 11 amino ácidos de longitud. En contraste, el surco de enlace de HLA Clase II es escencialmente de extremo abierto; por lo tanto, un péptido de aproximadamente 9 o más amino ácidos puede estar enlazado por una molécula de HLA Clase II. Debido a las diferencias de surco de enlace entre los motivos de HLA Clase I y II, los motivos de HLA Clase I son específicos de longitud, i.e., la posición dos de un motivo Clase I es el segundo amino ácido en una dirección amino a carboxilo del péptido. Las posiciones de amino ácido en un motivo Clase II son relativas solamente entre sí, no en el péptido global, i.e., amino ácidos adiciconales pueden estar unidos a los terminales amino y/o carboxilo de una secuencia de porta motivo. Los epítopos de HLA Clase II son usualmente de 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 amino ácidos de longitud, o de más de 25 amino ácidos.

Una amplia variedad de métodos para generar una respuesta inmune en un mamífero son conocidos en la técnica (por ejemplo como el primer paso en la generación de hibridomas). Los métodos para generar una respuesta inmune en un mamífero comprenden exponer el sistema inmune del mamífero a un epítopo inmunogénico de una proteína (e.g. una proteína STEAP-1) de forma

que se genera una respuesta inmune. Una realización típica consiste de un método para generar una respuesta inmune a STEAP-1 en un hospedero, contactando el hospedero con una cantidad suficiente de al menos una célula B de STEAP-1 o epítopo de célula T citotóxico o análogo del mismo; y al menos un intervalo periodico, luego volver a contactar el hospedero con la célula B de STEAP-1 o epítopo de célula T citotóxico del mismo. Una realización específica consiste de un método para generar una respuesta inmune contra una proteína relacionada con STEAP-1 o un péptido multiepitópico hecho por el hombre, que comprende: administrar inmunógeno STEAP-1 (e.g. una proteína STEAP-1 o un fragmento péptido de la misma, una proteína de fusión STEAP-1 o análogo, etc) en una preparación de vacuna a un humano u otro mamífero. Típicamente, tales preparaciones de vacuna contienen además un adyuvante adecuado (ver, e,g., Patente U.S. No. 6,146,635) o un epítopo auxiliar universal tal como un péptido PADRE™ (Epimmune Inc., San Diego, CA; ver, e.g., Alexander *et al.*, J. Immunol. 2000 164(3); 164(3): 1625-1633; Alexander *et al.*, Immunity 1994 1(9): 751-761 y Alexander *et al.*, Immunol. Res. 1998 18(2): 79-92). Un método alternativo comprende generar una respuesta inmune en un individuo contra un inmunógeno STEAP-1 por: la administración *in vivo* al músculo o la piel del cierpo del individuo de una molécula de ADN que comprende una secuencia de ADN que codifica un inmunógeno STEAP-1, la secuencia de ADN está enlazada operativamente a secuencias reguladoras que controlan la expresión de la secuencia de ADN; en donde la molécula de ADN es recuperada por las células, la secuencia de ADN es expresada en las células y la respuesta inmune es generada contra el inmunógeno (ver, e.g., Patente U.S. No. 5,962,428). Opcionalmente, también se administra un facilitador de vacuna genética tal como lípidos aniónicos; saponinas; lectinas; compuestos estrogénicos; alquilos inferiores hidroxilados; sulfóxido de dimetilo; y úrea. Adicionalmente, se puede administrar un anticuerpo anti-idiotípico que imita STEAP-1, con el fin de generar una respuesta al antígeno objetivo.

Vacunas de Ácido nucleico:

Las composiciones de vacuna de la invención incluyen modalidades mediadas por ácido nucleico. Se puede administrar ADN o ARN que codifica la(s) proteína(s) de la invención a un paciente. Se pueden emplear métodos de inmunización genética para generar respuestas inmunes humorales o celulares profilácticas o terapéuticas dirigidas contra células de cáncer que expresan STEAP-1. Los constructos que comprenden ADN que codifica una proteína/inmunógeno relacionado con STEAP-1 y las secuencias reguladoras

apropiadas pueden ser inyectadas directamente en el músculo o piel de un individuo, de forma que las células del músculo o piel recuperan el constructo y expresan la proteína/inmunógeno STEAP-1 codificada. Alternativamente, una vacuna comprende una proteína relacionada con STEAP-1. La expresión del inmunógeno proteína relacionada con STEAP-1 produce la generación de inmunidad humoral y celular profiláctica y terapéutica contra células que portan una proteína STEAP-1. Se pueden usar varias técnicas de inmunización genética profilácticas y terapéuticas conocidas en la técnica (para revisión, ver información y referencias publicadas en la dirección de Internet genweb.com). La liberación basada en ácido nucleico se describe, por ejemplo, en Wolff *et. al.*, *Science* 247: 1465 (1990) así como las Patentes U.S. Nos. 5,580,859; 5,589,466; 5,804,566; 5,739,118; 5,736,524; 5,679,647; WO 98/04720. Ejemplos de tecnologías de liberación basadas en ADN incluyen "ADN desnudo", liberación facilitada (bupivicaína, polímeros, mediados por péptido), complejos de lípido catiónicos, y liberación mediada por partícula ("pistola de gen") o mediada por presión (ver, e.g., Patente U.S. No. 5,922,687).

Para propósitos de inmunización terapéutica o profiláctica, las proteínas de la invención pueden ser expresadas mediante vectores virales o bacterianos. Varios sistemas de liberación de gen virales que se pueden usar en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, vaccinia, viruela de aves de corral, canarypox, adenovirus, influenza, poliovirus, virus adeno-asociado, lentivirus, y sindbis (ver, e.g., Restifo, 1996, Curr. Opin. Immunol. 8: 658-663; Tsang *et al.* J. Natl. Cancer Inst. 87: 982-990 (1995)). Sistemas de liberación no virales también se pueden emplear introduciendo AND desnudo que codifica una proteína relacionada con STEAP-1 en el paciente (e.g., intramuscularmente o intradérmicamente) para inducir una respuesta anti-tumor.

El virus Vaccinia se usa, por ejemplo, como un vector para expresar secuencias de nucleótido que codifican los péptidos de la invención. A la A la introducción en un hospedero, el virus vaccinia recombinante expresa el péptido inmunogénico de proteína, y de esta forma elicita una respuesta inmune del hospedero. Los vectores de Vaccinia and los métodos útiles en los protocolos de inmunización se describen en, e.g., Patente U.S. No. 4,722,848. Otro vector es BCG (Bacille Calmette Guerin). Los vectores de BCG se describen en Stover et al., Nature 351:456-460 (1991). Una amplia variedad de otros vectores útiles para la aministración terapéutica o inmunización de los péptidos de la invención, e.g. vectores de virus adeno y adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores

de *Salmonella typhi*, vectores de toxina de ántrax desintoxicada, y similares, serán obvios para los expertos en la técnica a partir de la presente descripción.

Así, los sistemas de liberación de gen se usan para liberar una molécula de ácido nucleico relacionada con STEAP-1. En una realización, se emplea el cADN de STEAP-1 humano de longitud total. En otra realización, se emplean moléculas de ácido nucleico de STEAP-1 que codifican Linfocito T citotóxico específico (CTL) y/o epítopos de anticuerpo.

Vacunas Ex Vivo

También se pueden emplear varias estrategias *ex vivo* para generar una respuesta inmune. Un criterio involucra el uso de células que presentan antígeno (APCs) tales como células dendríticas (DC) para presentar el antígeno de STEAP-1 al sistema inmune del paciente. Las células dentríticas expresan moléculas MHC clase I y II, co-estimulador B7, y IL-12, y de esta forma, con células que presentan antígeno altamente especializadas. En el cáncer de próstata, células dendríticas antólogas pulsadas con péptidos del antígeno de membrana específico de próstata (PSMA) están siendo usadas en un ensayo clínico de Fase I para estimular los sistemas inmunes de pacientes con cáncer de próstata (Tjoa *et al.*, 1996, Prostate 28:65-69; Murphy *et al.*, 1996, Prostate 29: 371-380). Así, las células dendríticas se pueden usar para presentar péptidos de STEAP-1 a células T en el contexto de moléculas MHC clase I o II. En una realización, las células dendríticas antólogas son pulsadas con péptidos de STEAP-1 capaces de enlazarse a las moléculas MHC clasa I y/o clase II. En otra realización, las células dendríticas son pulsadas con la proteína STEAP-1 completa. Aún otra realización involucra diseñar la sobreexpresión de un gen STEAP-1 en células dendríticas usando varios vectores de implementación conocidos en la técnica, tales como adenovirus (Arthur *et al.*,1997, Cancer Gene Ther. 4: 17-25), retrovirus (Henderson *et al.*, 1996, Cancer Res. 56: 3763-3770), lentivirus, virus adeno-asociado, transfección de ADN (Ribas *et al.*, 1997, Cancer Res. 57: 2865-2869), o transfección de ARM derivada de tumor (Ashley *et al.* , 1997, J. Exp. Med. 186:1177-1182). Las células que expresan STEAP-1 también pueden ser diseñadas para expresar moduladores inmunes, tal como GMCSF, y se usan como agentes inmunizantes.

X.B.) STEAP-1 como un objetivo para la Terapia basada en Anticuerpo

STEAP-1 es un objetivo atractivo para estrategias terapéuticas basadas en anticuerpo. Un número de estrategias de anticuerpo son conocidas en la técnica para marcar moléculas extracelulares e intracelulares (ver, e.g., eliminación de complemento y mediada por ADCC así como el uso de intracuerpos). Como STEAP-1 está expresado por células de cáncer de varios linajes relativos con células normales correspondientes, la administración sistémica de composiciones inmunorreactivas con STEAP-1 están preparadas para exhibir excelente sensibilidad sin que se causen efectos tóxicos, no específicos y/o no marcados por el enlace de la composición inmunorreactiva a órganos y tejidos no marcados. Los anticuerpos específicamente reactivos con dominios de STEAP-1 son útiles para tratar cánceres que expresan STEAP-1 sistémicamente, ya sea como conjugados con una toxina o agente terapéutico, o como anticuerpos desnudos capaces de inhibir la proliferación o función celular.

Los anticuerpos STEAP-1 pueden ser introducidos en un paciente de forma que el anticuerpo se enlaza a STEAP-1 y modula una función, tal como una interacción con un compañero de enlace, y en consecuencia media la destrucción de células de tumor y/o inhibe el crecimiento de las células de tumor. Los mecanismos mediante los cuales tales anticuerpos ejercen un efecto terapéutico pueden incluir citólisis mediada por complemento, citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo, modulación de la función fisiológica de STEAP- 1, inhibición del enlace de ligando o de rutas de transducción de señal, modulación de diferenciación de célula de tumor, alteración de los perfiles del factor de angiogénesis de tumor, y/o apóptosis. Ejemplos incluyen Rituxan® para Linfoma diferente a Hodgkins, Herceptin® para cáncer se seno metastático, y Erbitux® para cáncer colorrectal.

Los expertos en la técnica entienden que los anticuerpos se pueden usar para marcar específicamente y enlazar moléculas inmunogénicas tales como una región inmunogénica de una secuencia de STEAP-1 mostrada en la Figura 2 o Figura 3. Adicionalmente, los expertos entienden que es de rutina conjugar anticuerpos a agentes citotóxicos (ver, e.g., Sievers *et al.*, *Blood* 93: 11 3678-3684 (Junio 1,1999)). Cuando agentes citotóxicos y/o terapéuticos son liberados directamente a las células, tal como conjugandolos a anticuerpos específicos para una molécula expresada por esa célula (e.g. STEAP-1), el agente citotóxico ejercerá su efecto biológico conocido (i.e. citotoxicidad) es esas células.

Una amplia variedad de composiciones y métodos para usar conjugados de anticuerpo-agente citotóxico para eliminar células son conocidos en la técnica. En el contexto de cánceres, los métodos típicos implican administrar a un animal que tiene un tumor, una cantidad biológicamente efectiva de un conjugate que comprende un agente citotóxico y/o terapéutico seleccionado enlazado a un agente de marcado (e.g. un anticuerpo antiSTEAP-1) que se enlaza a un marcador (e.g., STEAP-1) expresado, accesible para enlazarse o localizado en las superficies celulares. Una realización típica es un método de liberación de un agente citotóxico y/o terapéutico a una célula que expresa STEAP-1, que comprende conjugar el agente citotóxico a un anticuerpo que se enlaza inmunoespecíficamente a un epítopo de STEAP-1, y, exponer la célula al conjugado anticuerpo-agente. Otra realización ilustrativa es un método para tratar un individuo que se sospecha sufre de cáncer que ha hecho metástasis, que comprende un paso de administrar parentealmente a dicho individuo una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo conjugado a un agente citotóxico y/o terapéutico.

La inmunoterapia del cáncer que usa anticuerpos anti-STEAP-1 se puede hacer de acuerdo con varios criterios que han diso empleados exitosamente en el tratamiento de otros tipos de cáncer, incluyendo, pero sin limitarse a cáncer de colon (Arlen et al., 1998, Crit. Rev. Immunol. 18:133-138), mieloma múltiple (Ozaki *et al.*, 1997, Blood 90:3179-3186, Tsunenari *et al.*, 1997, Blood 90: 2437-2444), cáncer gástrico (Kasprzyk *et al.*, 1992, Cancer Res. 52:2771-2776), linfoma de célula B (Funakoshi *et al.*, 1996, J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 19:93-101), leucemia (Zhong *et al.*, 1996, Leuk. Res. 20:581-589), cáncer colorrectal (Moun *et al.*, 1994, Cancer Res. 54: 6160-6166; Velders *et al.*, 1995, Cancer Res. 55: 4398-4403), y cáncer de seno (Shepard *et al.*, 1991, J. Clin. Immunol. 11:117-127). Algunos criterios terapéuticos involucran la conjugación de un anticuerpo desnudo a una toxina o radioisótopo, de forma que la conjugación de Y^{91} o I^{131} a anticuerpos anti-CD20 (e.g., Zevalin™, IDEC Pharmaceuticals Corp. O Bexxar™, Coulter Pharmaceuticals) respectivamente, mientras otros involucran la co-administración de anticuerpos y otros agentes terapéuticos, tales como Herceptin™ (trastuzuMAb) con paclitaxel (Genentech, Inc.). Los anticuerpos pueden estar conjugados a un agente terapéutico. Para tratar el cáncer de próstata, por ejemplo, los anticuerpos STEAP-1 pueden ser administrados en conjunción con radiación, quimioterapia o ablación de hormona. Además, los anticuerpos pueden ser conjugados a una toxina tal como calicheamicina (e.g., Mylotarg™, Wyeth-Ayerst, Madison, NJ, un anticuerpo IgG4 kapa humanizado recombinante conjugado a calicheamicina

antibiótica antitumor) o un maltansinoide (e.g., Profármaco Activado por tumor basado en taxano, TAP, platforma, ImmunoGen, Cambridge, MA, ver también e.g., Patente US 5,416,064) o Auristatina E (Seattle Genetics).

Aunque la terapia de anticuerpo de STEAP-1 es útil para todas las etapas del cáncer, la terapia de anticuerpo puede ser particularmente apropiada en cánceres avanzados o que han hecho metástasis. El tratamiento con la terapia de anticuerpo de la invención está indicada para pacientes que han recibido una o más rondas de quimioterapia. Alternativamente, la terapia de anticuerpo de la invención es combinada con un régimen quimioterapéutico o de radiación para pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico. Adicionalmente, la terapia de anticuerpo puede permitir el uso de dosis reducidas de quimioterapia concomitante, particularmente para pacientes que no toleran la toxicidad del agente quimioterapéutico muy bien. Fan et al. (Cancer Res. 53:4637-4642, 1993), Prewett et al., (International J. of Onco. 9:217-224, 1996), y Hancock et al. (Cancer Res. 51: 4575-4580, 1991) describen el uso de varios anticuerpos junto con los agentes quimioterapéuticos.

Aunque la terapia de anticuerpo de STEAP-1 es útil para todas las etapas del cáncer, la terapia de anticuerpo puede ser particularmente apropiada en cánceres avanzados o que han hecho metástasis. El tratamiento con la terapia de anticuerpo de la invención está indicada para pacientes que han recibido una o más rondas de quimioterapia. Alternativamente, la terapia de anticuerpo de la invención es combinada con un régimen quimioterapéutico o de radiación para pacientes que no han recibido tratamiento quimioterapéutico. Adicionalmente, la terapia de anticuerpo puede permitir el uso de dosis reducidas de quimioterapia concomitante, particularmente para pacientes que no toleran la toxicidad del agente quimioterapéutico muy bien.

Los pacientes de cáncer pueden ser evaluados para la presencia y nivel de la expresión de STEAP-1, preferiblemente usando evaluaciones inmunohistoquímicas de tejido de tumor, representación gráfica cuantitativa de STEAP-1, u otras técnicas que indican confiablemente la presencia y grado de la expresión de STEAP-1. El análisis inmunohistoquímico de biopsias de tumor o muestras quirúrgicas es preferido para este propósito. Los métodos para el análisis inmunohistoquímico de tejidos de tumor son bien conocidos en la técnica.

Los anticuerpos monoclonales anti-STEAP-1 que tratan el cáncer de próstata y otros cánceres incluyen aquellos que inician una respuesta inmune potente contra el tumor o aquellos que son directamente citotóxicos. En este aspecto, los anticuerpos monoclonales anti-STEAP-1 (MAbs) can elicitar la lísis de célula de tumor ya sea mediante mecanismos de citotoxicidad mediada por complemento o dependiente de anticuerpo (ADCC), ambos requieren una porción Fc intacta de la molécula de inmunoglobulina para la interacción con sitios de receptor Fc de célula efectora sobre proteínas complemento. Adicionalmente, los MAbs anti-STEAP-1 que ejercen un efecto biológico directo en el crecimiento de tumor son útiles para tratar cánceres que expresan STEAP-1. Los mecanismos mediante los cuales las MAbs citotóxicas actúan directamente, incluyen: Inhibición de crecimiento celular, modulación de diferenciación celular, modulación de perfiles del factor de angiogénesis de tumor, y la inducción de apóptosis. El(los) mecanismo(s) en en donde un MAb particular anti-STEAP-1 ejerce un efecto anti-tumor se evalúa usando cualquier número de ensayos *in vitro* que evaluan la muerte celular tales como ADCC, ADMMC, lísis de célula mediada por complemento, etc., como son generalmente conocidos en la técnica.

En algunos pacientes, el uso de anticuerpos monoclonales murinos o no humanos, o MAbs quiméricos humano/ratón pueden inducir respuestas inmunes moderadas a fuertes contra el anticuerpo no humano. Esto puede producir una depuración del anticuerpo de circulación y eficacia reducida. En los casos más severos, tal respuesta inmune puede conducir a la formación extensiva de complejos inmunes que, potencialmente, pueden producir falla renal. En consecuencia, los anticuerpos monoclonales preferidos usando en los métodos terapéuticos de la invención son aquellos que son totalmente humanos o humanizados y que se enlazan específicamente al antígeno STEAP-1 objetivo con alta afinidad, pero que exhiben baja o no antigenicidad en el paciente.

Los métodos terapéuticos de la invención contemplan la administración de MAbs anti-STEAP-1 simples así como combinaciciones, o cocteles, de diferentes MAbs. Tales cocteles de MAb pueden tener ciertas ventajas casi tanto como las contienen MAbs que marcan diferentes epítopos, explotan diferentes mecanismos efectores o combinan MAbs citotóxicos directamente con MAbs que se basan en la funcionalidad efectora inmune. Tales MAbs en combinación pueden exhibir efectos terapéuticos sinergísticos. Adicionalmente, los Mabs anti-STEAP-1 pueden ser administrados concomitantemente con otras modalidades terapéuticas, incluyendo, pero sin limitarse a varios agentes

quimioterapéuticos, bloqueadores de andrógeno, moduladores inmunes (e.g., IL-2, GM-CSF), cirujía o radiation. Los MAbs anti-STEAP-1 son administrados en su forma "desnuda" o no conjugada, o pueden tener un agente(s) terapéutico(s) conjudado(s) a estos.

Las formulaciones de anticuerpo anti-STEAP-1 son administradas por cualquier ruta capaz de liberar los anticuerpos a una célula de tumor. Las rutas de aministración incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intratumor, intradérmica, y similares. El tratamiento generalmente involucra la administración repetida de la preparación del anticuerpo anti-STEAP-1, por una ruta de administración aceptable tal como inyección intravenosa (IV), típicamente a una dosis en el rango de aproximadamente 0.1, .2, .3, .4, .5, .6, .7, .8, 9., 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, o 25 mg/kg de peso corporal. En general, las dosis en el rango de 10-1000 mg de MAb por semana son efectivas y bien toleradas.

Basados en la experiencia clínica con el Mab Herceptin™ en el tratamiento de cáncer de tumor que ha hecho metástasos, una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente IV, seguido por dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de MAb anti-STEAP-1 representa un régimen de dosis aceptable. Preferiblemente, la dosis de carga inicial es administrada como ina infusión de 90 minutos o mayor. La dosis de mantenimiento periódico es administrada como una infusión de 30 minutos o mayor, siempre y cuando la dosis inicial sea bien tolerada. Como lo aprecian los expertos en la técnica, varios factores pueden incluenciar el régimen de dosis inicial en un caso particular. Tales factores incluyen, por ejemplo, la afinidad de enlace y la vida media del Ab o MAbs usados, el grado de expresión de STEAP-1 en el paciente, la magnitud de antígeno STEAP-1 derramado circulante, el nivel de concentración de anticuerpo estado estable deseado, la frecuencia del tratamiento, y la influencia del quimioterapéutico u otros agentes usados en combinación con el método de tratamiento de la invención, así como el estado de salud de un paciente particular.

Opcionalmente, los pacientes deben ser evaluados para los niveles de STEAP-1 en una muestra dada (e.g., los niveles de antígeno de STEAP-1 circulante y/o células que expresan STEAP-1) con el fin de ayudar en la determinación del régimen de dosis más efectivo, etc. Tales evaluaciones también se usan para propósitos de monitoreo durante la terapia, y son útiles para medir el éxito terapéutico en combinación con la evaluación de otros

parámetros (por ejemplo, citología de orina y/o niveles ImmunoCyt en la terapia del cáncer de vejiga, o por analogía, niveles de PSA en suero en la terapia del cáncer de próstata).

Los anticuerpos anti-STEAP-1 anti-idiotípicos también se pueden usar en la terapia anti-cáncer como una vacuna para inducir una respuesta inmune a células que expresan una proteína relacionada con STEAP-1. En particular, la generation de anticuerpos anti-idiotípicos es bien conocida en la técnica; esta metodología puede ser fácilmente adaptada para generar anticuerpos anti-STEAP-1 anti-idiotípicos que imitan un epítopo sobre una proteína relacionada con STEAP-1 (ver, por ejemplo, Wagner *et al.*, 1997, Hybridoma 16: 33-40; Foon *et al.*, 1995, J. Clin. Invest. 96: 334-342; Herlyn *et al.*, 1996, Cancer Immunol.Immunother. 43: 65-76). Tal anticuerpo anti-idiotípico se puede usar en estrategias de vacuna contra cáncer.

X.C.) STEAP-1 como un Objetivo para Respuestas Inmunes Celulares

Las vacunas y los métodos para preparar vacunas que contienen una cantidad inmunológicamente efectiva de uno o más péptidos que se enlazan a HLA como se describe aquí, son realizaciones adicionales de la invención. Adicionalmente, las vacunas de acuerdo con la invención abarcan composiciones de uno o más de los péptidos reivindicados. Un péptido puede estar presente en una vacuna individualmente. Alternativamente, el péptido puede existir como un homopolímero que comprende multiple copias del mismo péptido, o como un heteropolímero de varios péptidos. Los polímeros tienen la ventaja de reacción inmunológica aumentada y, cuendo se usan epítopos de péptido diferentes para preparar el polímero, la habilidad adicional para inducir anticuerpos y/o CTLs que reacción co diferentes determinantes de antígeno del organismo patogénico o péptido marcado relacionado con tumor para una respuesta inmune. La composición puede ser una región que se encuentra naturalmente de un antígeno o se puede preparar, e.g., recombinantemente o por síntesis química.

Los vehículos que se pueden usar con las vacunas de la invención son bien conocidos en la técnica, e incluyen, e.g., tiroglobulina, albúminas tales como albímuna de suero humana, toxoide tétanos, ácidos poliamino tales como poli L-lisina, ácido poli L-glutámico, influenza, proteína de núcleo del virus de hepatitis B, y similares. Las vacunas pueden contener un diluyente

fisiológicamente tolerable (i.e., aceptable) tal como agua, o solución salina, preferiblemente solución salina amortiguada con fosfato. Las vacunas incluyén también típicamente un adyuvante.

Adyuvantes tales como adyuvante de Freund incompleto, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, o alumbre son ejemplos de materiales bien conocidos en la técnica. Adicionalmente, como se revela aquí, las respuestas CTL pueden ser cebadas conjugando péptidos de la invención a lípidos, tal como tripalmitoil-S-glicerilcisteinliseril-serina (P3CSS). Más aún, se ha encontrado que un adyuvante tal como oligonucleótidos que contienen citosina-fosforotiolada-guanina sintética (CpG) aumenta las respuestas CTL de 10 a 100 veces. (Ver, e.g. Davila y Celis, J. Immunol. 165: 539-547 (2000)).

A la inmunización con una composición de péptido de acuerdo con la invención, mediante rutas de inyección, aerosol, oral, transdérmica, transmucosa, intrapleural, intratecal, u otras adecuadas, el sistema inmune del hospedero responde a la vacuna produciendo grandes cantidades de CTLs y/o HTLs específicos para el antígeno deseado. En consecuencia, el hospedero se vuelve al menos parcialmente inmune al desarrolo posterior de células que expresan o sobreexpresan el antígeno STEAP-1, o deriva al menos algún beneficio terapéutico cuando el antígeno estaba asociado con tumor.

En algunas realizaciones, puede ser deseable combinar los componentes de péptido clase I con componentes que inducen o facilitan la neutralización del anticuerpo y o las respuestas de célula T auxiliar dirigidas al antígeno objetivo. Una realización preferida de tal composición comprende epítopos clase I y clase II de acuerdo con la invención. Una realización alternativa de tal composición comprende un epítopo clase I y/o clase II de acuerdo con la invención, junto con un epítopo HTL que reacciona cruzadamente, tal como la molécula PADRE™ (Epimmune, San Diego, CA) (descrita e.g., en la Patente U.S. Nímero 5,736,142).

Una vacuna de la invención también puede incluir células que presentan antígeno (APC), tales como células dendríticas (DC), como un vehículo para presentar los péptidos de la invención. Las composiciones de vacuna pueden ser creadas *in vitro*, siguiendo la mobilización y recolección de célula dendrítica, por medio de la cual la carga de células dendríticas ocurre *in vitro*. Por ejemplo, las células dendríticas son transfectadas, e.g., con un minigen de acuerdo con la invención, o son pulsadas con péptidos. La célula dendrítica puede entonces

ser administrada a un paciente para elicitar respuestas inmunes *in vivo*. Las composiciones de vacuna, basadas en ADN o péptido, también pueden ser administradas *in vivo* en combinación con la movilización de célula dendrítica, por medio de la cual la carga de las células dendríticas ocurre *in vivo*.

Preferiblemente, los siguientes principios se utilizan cuando se selecciona una distribución de epítopos para inclusión en una composición poliepitópica para uso en una vacuna, o para seleccionar epítopos discretos para ser incluidos en una vacuna y/o para ser codificados por ácidos nucleicos tales como un minigen. Se prefiere que cada uno de los siguientes principios sea balanceado en orden para hacer la selección. Los epítopos múltiples a ser incorporados en una composición de vacuna dada pueden estar, pero no necesitan estar, contiguos en secuencia en el antígeno nativo desde el cual los epítopos son derivados.

1.) Se seleccionan epítopos que, a la administración, imitan respuestas inmunes que se ha observado que están correlacionadas con depuración del tumor. Para HLA Clase I, esto incluye 3-4 epítopos que vienen de al menos un antígeno asociado con tumor (TAA). Para HLA Clase II, se emplea una base similar; de nuevo se seleccionan 3-4 epítopos de al menos un TAA (ver, e.g., Rosenberg *et al., Science* 278: 1447-1450). Los epítopos de un TAA se pueden usar en combinación con epítopos de uno o más TAAs adicionales para producir una vacuna que marca tumores con patrones de expresión diferentes de TAAs expresadas frecuentemente.

2.) Se seleccionan epítopos que tienen la afinidad de enlace que se establece requerida correlacionada con inmunogenicidad: para HLA Clase I, un IC_{50} de 500 nM o menos, usualmente 200 nM o menos; y para Clase II, un IC_{50} de 1000 nM o menos.

3.) Péptidos que portan supermotivos suficientes, o una distribución suficiente de páptidos que portan motivos específicos de alelo, son seleccionados para far cubrimiento de población extenso. Por ejemplo, es preferible tener al menos 80% de cubrimiento de población. Un análisis de Monte Carlo, una evaluación estadística conocida en la técnica, se puede emplear para evaluar amplitud, o redundancia del cubrimiento de la población.

4.) Al seleccionar epítopos de antígenos relacionados con cáncer, usualmente es útil seleccionar análogos porque el paciente puede tener tolerancia desarrollada al epítopo nativo.

5.) De relevancia particular son los epítopos referidos como "epítopos anidados". Los epítopos anidados se encuentran al menos dos epítopos superpuestos en una secuencia de péptido dada. Una secuencia de péptido anidada puede comprender apítopos de célula B, HLA clase I y/o HLA clase II. Cuando se proveen epítopos anidados, un objetivo general es proveer el mayor número de epítopos por secuencia. Así, un aspecto es evitar proveer un péptido que es más largo que el terminal amino del epítopo terminal amino y el terminal carboxilo del epítopo del terminal carboxilo en el péptido. Al proveer una secuencia multi-epitípica, tal como una secuencia que comprende epítopos anidados, generalmente es importante seleccionar la secuencia con el fin de asegurar que no tiene propiedades patológicas u otras nocivas.

6.) Si se crea una proteína poliepitópica, o al crear un minigen, un objetivo es general el péptido más pequeño que abarca los epítopos de interés. Este principio es similar, si no el mismo que el empleado al seleccionar un péptido que comprende epítopos anidados. Sin embargo, con un péptido poliepitópico artificial, el objetivo de minimización de tamaño es balanceado contra la necesidad de integrar cualquier secuencia espaciadora entre epítopos en la proteína poliepitópica. Los residuos de amino ácido espaciadores pueden, por ejemplo, ser introducidos para evitar epítopos de unión (un epítopo reconocido por el sistema inmune, no presente en el antígeno objetivo, y creado solamente por yuxtaposición de epítopos hechos por el hombre), o facilitar el clivado entre epítopos y por medio de esto, mejorar la presentación de epítopo. Los epítopos de unión son generalmente evitados porque el recipiente puede generar una respuesta inmune a ese epítopo no nativo. De importancia particular es un epítopo de unión que es un "epítopo dominante". Un epítopo dominante puede conducir a una respuesta ferviente que dimsimuye o suprime las respuestas inmunes a otros epítopos.

7.) Cuando las secuencias de múltiples variantes de la misma proteína objetivo están presentes, los epítopos de péptido potenciales también pueden ser seleccionados con base en su conservación. Por ejemplo, un criterio para conservación puede definir que la secuencia entera de un péptido de enlace de HLA clase I o el núcleo de 9 meros entero de un polipéptido de

enlace clase II sea conservada en un porcentaje diseñado de las secuencias evaluadas para un antígeno de proteína específico.

X.C.1. Vacunas de minigen

Un número de diferentes criterios están disponibles que permiten la liberaciónsimultánea de epítopos múltiples. Los ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la invención son una realización particularmente útil de la invención. Los epítopos para inclusión en un minigen son seleccionados preferiblemente de acuerdo con las guías indicadas en la sección anterior. Un medio preferido para administrar ácidos nucleicos que codifican los péptidos de la invención, usa constructos de minigen que codifican un péptido que comprende uno o múltiples epítopos de la invención.

El uso de minigenes multi-epítopo se describe más adelante y en Ishioka *et al., J. Immunol.* 162:3915-3925, 1999; An, L. y Whitton, J.L., *J. Virol.* 71:2292, 1997; Thomson, S.A. *et al., J. Immunol.* 157:822, 1996; Whitton, J.L. *et al., J. Virol.* 67:348, 1993; Hanke, R. *et al., Vaccine* 16:426, 1998. Por ejemplo, se puede diseñar un plásmido de ADN multi-epítopo que codifica epítopos que portan supermotivo y/o motivo derivados de STEAP-1, el epítopo de célula T auxiliar universal PADRE™ o epítopos de HLA múltiples de STEAP-1 (ver e.g., Tablas V-XVIII y XXII a LI), y una secuencia de señal traslocación de retículo endoplásmico. Una vacuna puede también comprende epítopos que son derivados de otros TAAs.

La inmunogenicidad de un minigen multi-epitópico puede ser confirmada en ratones transgénicos para evaluar la magnitud de las respuestas de inducción de CTL contra los epítopos probados. Además, la inmunogenicidad de epítopos codificados con ADN *in vivo* puede estar correlacionada con las respuestas *in vitro* de líneas CTL específicas contra células objetivo transfectadas con el plásmido de ADN. Así, estos experimentos pueden mostrar que el minigen sirve para: 1.) generar una respuesta CTL, y 2.) que los CTLs inducidos reconocieron células que expresan los epítopos codificados.

Por ejemplo, para crear una secuencia de ADN que codifica los epítopos seleccionados (minigen) para la expresión en células humanas, las secuencias de amino ácido de los epítopos pueden ser trasladadas inversas. La tabla de uso de codón humano se puede utilizar para guiar la elección de codón para cada amino ácido. Estas secuencias de ADN que codifican epítopo pueden ser

unidas directamente, de forma que cuando son trasladadas se crea una secuencia de polipéptido continua. Para optimizar la expresión y/o inmunogenicidad, elementos adicionales pueden ser incorporados en el diseño del minigen. Ejemplos de secuencias de amino ácido que pueden ser trasladadas inversas e incluidas en la secuencia de minigen, incluyen: epítopos de HLA clase I, epítopos de HLA clase II, epítopos de anticuerpo, una secuencia de señal de ubiquitinación, y/o una señal de marcar retículo endoplásmico. Adicionalmente, la presentación de HLA de epítopos CTL y HTL puede ser mejorada incluyendo secuencias de flanqueo sintéticas (e.g. poli-alanina) o o que se encuentran naturalmente, adyacentes a los epítopos CTL o HTL; estos péptidos más grandes que comprende el(los) epítopo(s) están dentro del alcance de la invención.

La secuencia de minigen puede ser convertida a ADN ensamblando oligonucleótidos que codifican las cadenas más y menos del minigen. Los oligonucleótidos de superposición (30-100 bases de longitud) pueden ser sintetizados, fosforilados, purificados y recocidos bajo aondiciones apropiadas usando técnicas bien conocidas. Los extremos de los oligonucleótidos pueden ser unidos, por ejemplo, usando ADN ligasa T4. Este minigen sintético, que codifica el polipéptido epítopo, puede entonces ser clonato en un vector de expresión deseado.

Secuencias reguladoras estándar bien conocidas por los expertos en la técnica son preferiblemente incluidas en el vector para asegurar la expresión en las células objetivo. Varios elementos de vector son deseables: un promotor con sitio de clonación descendente para inserción del minigen; una señal de poliadenilación para terminación de transcripción eficiente; un origen *E. coli* de replicación; y un marcador *E. coli* seleccionable (e.g., resistencia a la ampicilina o kanamicina). Se pueden usar numerosos promotores para este propósito, e.g., el promotor de citomegalovirus humano (hCMV). Ver, e.g., Patentes U.S. Nos. 5,580,859 y 5,589,466 para otras secuencias promotoras adecuadas.

Modificaciones de vector adicionales pueden ser deseadas para optimizar la expresión del minigen e inmunogenicidad. En algunos casos, se requiren intrones para la expresión del gen eficiente, y uno o más intrones sintéticos o que se encuentran naturalmente pordrían ser incorporados en la región transcrita del minigen. La inclusión de secuencias de estabilización de mARN y secuencias para replicación en células mamíferas también pueden considerarse para aumentar la expresión del minigen.

Una vez un vector de expresión es seleccionado, el minigen es clonado en la región de polienlace descendentemente del promotor. Este plásmido es transformado en una cepa *E. coli* apropiada, y el ADN se prepara usando técnicas estándar. La orientación y secuencia de ADN del minigen, así como otros elementos incluidos en el vector, son confirmados usando mapeo de restricción y análisis de secuencia de ADN. Células bacterians que alberga el plásmido correcto pueden ser almacenadas como un banco de célula maestra y un banco de célula de trabajo.

Adicionalmente, las secuencias inmunoestimuladoras (ISSs o CpGs) parecen jugar un papel en la inmunogenicidad de las vacunas de ADN. Estas secuencias pueden estar incluidas en el vector, fuera de la secuencia de codificación del minigen, si se desea, para mejorar la inmunogenicidad.

En algunas realizaciones, se puede usar un vector de expresión bi-cistrónico que permite la producción tanto de los epítopos codificados con minigen y una segunda proteína (incluida para mejorar o disminuir la inmunogenicidad). Ejemplos de proteínas o polipéptidos que podrían mejorar benéficamente la respuesta inmune si se co-expresan incluyen citocinas (e.g., IL-2, IL-12, GM- CSF), moléculas que inducen citocina (e.g., LeIF), moléculas coestimuladoras, o para respuestas HTL, proteínas de enlace pan-DR (PADRE™, Epimmune, San Diego, CA). Los epítopos auxiliares (HTL) pueden estar unidos a señales de marcado intracleular y expresados separadamente de los epítopos CTL; esto permite la dirección de los epítopos HTL a un compartimiento de célula diferente al de los epítopos CTL. Si se requiere, esto podría facilitar la entrada más eficiente de os epítopos HTL en la ruta de HLA clase II, mejorando así la inducción de HTL. En contraste a la inducción de HTL o CTL, la disminuir específicamente la respuesta inmune mediante la co-expresión de moléculas inmunosupresoras (e.g. TGF-β) puede ser benéfico en ciertas enfermedades.

Las cantidades terapéuticas de ADN plásmido pueden ser producidas por ejemplo, mediante fermentación en *E coli*, seguida por purificación. Se usan alícuotas del banco de células de trabajo para inocular el medio de crecimiento, y son cultivadas hasta saturación en frascos agitadores o un biorreactor, de acuerdo con las técnicas bien conocidas. El ADN plásmido puede ser purificado usando tencologías de bioseparación estándar tales como resinas de intercambio de anión en fase sólida suministradas por QIAGEN, Inc. (Valencia,

California). Si se requiere, ADN de superhélice puede ser asilado de las formas circular y lineal usando electroforesis de gel u otros métodos.

El ADN plásmido purificado se puede preparar por inyección usando una variedad de formulaciones. La más simple de estas es la reconstitución de ADN liofilizado en solición salina amortiguada con fosfato (PBS). Este enfoque, conocido como "ADN desnudo", es actualmente usada para la administración intramuscular (IM) en ensayos clínicos. Para maximizar los efectos inmunoterapéuticos de las vacunas de ADN de minigen, puede ser deseable un método alternativo para formular ADN plásmido purificado. Se han descrito una variedad de métodos, y nuevas técnicas pueden volverse disponibles. También se pueden usar lípidos catiónicos, glicolípidos, y liposomas fusogénicos en la formulación (ver, e.g., como se describe en WO 93/24640; Mannino & Gould-Fogerite, BioTechniques 6 (7): 682 (1988); Patente U.S. No. 5,279,833; WO 91/06309; y Felgner, *et al., Proc.Nat'l Acad. Sci.* USA 84: 7413 (1987). Adicionalmente, los péptidos y compuestos referidos colectivamente como compuestos de no condensación, interactivos, protectores (PINC) podrían ser también complejados al ADN plásmido purificado para influenciar variables tales como estabilidad, dispersión intramuscular, o tráfico a órganos específicos o tipos de células.

Se puede usar la sensibilización de célula objetivo como un ensayo funcional para la expresión y presentación de HLA clasa I de epítopos CTL codificados con minigen. Por ejemplo, el ADN plásmido es introducido en una linea celular mamífera que es adecuada como un objetivo para los ensayos de liberación de cromo CTL estándares. El método de trasnfección será dependiente de la formulación final. Se puede usar electroporación para "ADN desndo", mientras que los lípidos catiónicos permitirán la transfección directa *in vitro*. Un plásmido que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) puede ser co-transfectado para permitir el enriquecimiento de células transfectadas usando clasificación de célula activada por fluorescencia (FACS). Estas células son entonces etiquetadas con cromo-51 (^{51}Cr) y se usan como células objetivo para líneas CTL específicas de epítopo; la citósisis, detectada por la liberación de ^{51}Cr, indica la producción de, y presentación de HLA, de apítopos CTL codificados con minigen. La expresión de epítopos HTL se puede evaluar de forma análoga usando ensayos para evaluar la actividad HTL.

La inmunogenicidad *in vivo* es un segndo criterio para las pruebas funcionales de las formulaciones con ADN de minigen. Ratones transgénicos

que expresan proteínas HLA humanas apropiadas son inmunizados con el producto de ADN. La dosis y ruta de aministración son dependientes de la formulación (e.g., IM para ADN en PBS, intraperitoneal (i.p.) para ADN complejado con lípido). Veintiun días después de la inmunización, los esplenocitos son recolectados y re-estimulados por una semana en la presencia de péptidos que codifican cada epítopo que es probado. Posteriormente, para las células efectoras CTL, los ensayos son conducidos para citólisis de células objetivo etiquetadas con ^{51}Cr, cargadas con péptido usando técnicas estándar. La lisis de células objetivo que fueron sensibilizadas con HLA cargado con epítopos de péptido, correspondientes a epítopos codificados con minigen, demuestra la función de vacuna de ADN para la inducción *in vivo* de CTLs. La inmunogenicidad de epítopos HTL es confirmada en ratones transgénicos de forma análoga.

Alternativamente, se pueden administrar ácidos nucleicos usando liberación balística como se describe, por ejemplo, en la Patente U.S. No. 5,204,253. Usando esta técnica solamente las partículas que comprenden ADN son administradas. En una realización alternativa adicional, el ADNA puede estar adherido a laspartículas, tales como partículas de oro.

Los minigenes también pueden ser liberados usando otros sistemas de liberación bacteriana o viral bien conocidos en la técnica, e.g., un constructo de expresión que codifica epítopos de la invención se puede incorporar en un vector viral tal como vaccinia.

X.C.2. Combinaciones de Péptidos CTL con Péptidos Auxiliares

Las composiciones de vacuna que comprenden péptidos CTL de la invención pueden ser modificadas, e.g., analogadas, para proveer atributos deseados, tales como vida media de suero mejorada, ciubrimiento de población ampliado o inmunogenicidad mejorada.

Por ejemplo, la habilidad de un péptido para inducir actividad CTL puede ser mejorada enlazando el péptido a unaa secuencia que contiene al menos un epítopo que es capaz de inducir una respuesta de célula T auxiliar. Aunque un péptido CTL puede estar directamente enlazado a un péptido auxiliar T, susualmente los conjugados de epítopo CTL/ epítopo HTL están enlazados mediante una molécula espaciadora. El espaciador está típicamente comprendido de moléculas neutras relativamente pequeñas, tales como amino

ácidos o imitadores de amino ácido, que están sustancialmente no cargadas bajo condiciones fisiológicas. Los espaciadores son típicamente seleccionados de, e.g., Ala, Gly, u otros especiadores neutros de amino ácidos no polares o amino ácidos polares neutros. Se entenderá que el espaciador presente opcionalmente no necesita estar comprendido de los mismos residuos, y por ende, puede ser un hetero- u homo-oligómero. Cuando está presente, el espaciador será usualmente de al menos uno o dos residuos, más usualmente de tres a seis residuos y algunas veces de 10 o más residuos. El apítopo de péptido CTL puede estar enlzado al epítopo deel terminal amino o carboxi del péptido CTL. Los terminales amino de cualquier péptido inmunogénico o el péptido auxiliar T pueden estar acilados.

En ciertas realizaciones, el péptido auxiliar T es uno que es reconocido por células auxiliares T presentes en una mayoría de una población genéticamente diversa. Esto puede realizarse seleccionando péptidos que se enlazan a muchas, la mayoría, o todas las moléculas HLA clase II. Ejemplos de tales amino ácidos que se enlazan a moléculas HLA clase II incluyen secuencias de antígenos tales como *tetanus toxoid* en las posiciones 830-843 QYIKANSKFIGITE; (SEQ ID NO: 64), proteína de *Plasmodium falciparum circumsporozoite* (CS) en las posiciones 378-398 DIEKKIAKMEKASSVFNVVNS; (SEQ ID NO: 65), y proteína de *Streptococcus* de 18kD en las posiciones 116-131 GAVDSILGGVATYGAA; (SEQ ID NO: 66). Otros ejemplos incluyen péptidos que portan un supermotivo DR 1-4-7, o cualquiera de los motivos DR3.

Alternativamente, es posible preparar péptidos sintéticos capaces de estimular los linfocitos auxiliares T, en una forma libremente restringida al HLA, usando secuencias de amino ácido no encontradas en la naturaleza (ver, e.g., Publicación PCT WO 95/07707). Estos compuestos sintéticos llamados epítopos de enlace a Pan-DR (e.g., PADRE™, Epimmune, Inc., San Diego, CA) son diseñados, más preferiblemente, para enlazarse a la mayoría de las moléculas HLA-DR (HLA clase II humano). Porejemplo, in péptido de epítopo que se enlaza a pan-DR, que tiene la formula: XKXVAAWTLKAAX (SEQ ID NO: 67), en donde "X" es ciclohexilalanina, fenilalanina, o tirosina, y es D-alanina o L-alanina, se ha encontrado que se enlaza a la mayoría de los alelos de HLA-DR, y estimula la respuesta de linfocitos auxiliares T de la mayoría de los individuos, sin importar su tipo de HLA. Un epítopo de enlace a pan-DR alternativo comprende todos los amino ácidos "L" naturales y puede ser proporcionado en la forma de ácidos nucleicos que codifican el epítopo.

Los epítopos de péptido HTL también pueden ser modificados para alterar sus propiedades biológicas. Por ejemplo, pueden ser modificados para incluir D-amino ácidos para aumentar su resistencia a proteasas y así extender su vida media de suero, o pueden estar conjugados a otras moléculas tales como lípidos, proteínas, carbohidratos, y similares para aumentar su actividad biológica. Por ejemplo, un péptido auxiliar T puede estar conjugado a una o más cadenas de ácido palmítico en cualquiera de los terminales amino o carboxilo.

X.C.3. Combinaciones de Péptidos CTL con Agentes de Cebado de células T

En algunas realizaciones puede ser deseable incluir en las composiciones farmacéuticas de la invención al menos un componente que ceba linfocitos B o linfocitos T. Los lípidos han sido identificados como agentes capaces de cebar CTL *in vivo*. Por ejemplo, los residuos de ácido palmítico pueden estar unidos a los grupos amino ε y α de un residuo de lisina y luego enlazarse, e.g., mediante uno o más residuos enlazantes tales como Gly, Gly-Gly-, Ser, Ser-Ser, o similares, a un péptido inmunogénico. El péptido lipidato puede entonces ser administrado ya sea directamente en una micela o partícula, incorporada en un liposoma, o emulsificada en un adyuvante, e.g., adyuvante de Freund incompleto. En una realización preferida, una composición inmunogénica particularmente preferida comprende ácido palmítico unido a los grupos ε- y α de Lys, que está unida mediante enlace, e.g., Ser-Ser, al teminal amino del péptido inmunogénico.

Como otro ejemplo de cebado en lípido de respuestas CTL, se pueden usar lipoproteínas de *E.coli*, tales como tripalmitoil-S- glicerilcisteinliseril- serina (P3CSS) para cebar CTL específico de virus cuando está unido covalentemente a un péptido apropiado (ver, e.g., Deres, *et al.*, *Nature* 342:561, 1989). Los péptidos de la invención pueden estar acoplados a P3CSS, por ejemplo, y el lipopéptido ser administrado a un individuo para cebar específicamente una respuesta inmune al antígeno objetivo. Más aún, como la inducción de anticuerpos neutralizadores también puede ser cebada con epítopos conjugados con P3CSS, dos de tales composiciones pueden ser combinadas para elicitar más efectivamente las respuestas humorales y mediadas por célula.

X.C.4. Composiciones de Vacuna que comprenden DC pulsadas con péptidos CTL y/o HTL

Una realización de una composición de vacuna de acuerdo con la invención comprende la administración *ex vivo* de un coctel de péptidos que portan epítopo a PBMC, o DC aisladas de este, de la sangre del paciente. Se puede usar un farmacéutico para facilitar la recolección de DC, tal como Progenipoietin™ (Pharmacia-Monsanto, St. Louis, MO) o GM-CSF/IL-4. Después de pulsar las DC con los péptidos y antes de la re-infusión en los pacientes, las DC son lavadas para remover los péptidos no enlazados. En esta realización, una vacuna comprende DCs pulsadas con péptido que presentan los epítopos de péptido pulsados complejados con moléculas HLA en sus superficies.

Las DC pueden ser pulsadas *ex vivo* con un coctel de péptidos, lgunos de los cuales estimulan las respuestas CTL a STEAP-1. Opcionalmente, un péptido de célula T auxiliar (HTL), tal como un péptido natural o artificial de HLA clase II libremente restringido, puede ser incluido para facilitar la respuesta CTL. Así, una vacuna de acuerdo con la la invención se usa para tratar un cáncer que expresa o sobreexpresa STEAP-1.

X.D. Inmunoterapia Adoptiva

También se usan péptidos relacionados con STEAP-1 antigénicos para elicitar una respuesta CTL y/o HTL *ex vivo*. Lás células CTL o HTL resultantes se pueden usar para tratar tumores en pacientes que no responden a otras formas de terapia convencionales, o no responderán a un péptido o ácido nucleico de vacuna terapéutica de acuerdo con la invención. Las respuestas CTL o HTL *ex vivo* a un antígeno particular son inducidas incubando en cultivo de tejido del paciente, o células precursoras de CTL o HTL, genéticamente compatibles, junto con una fuente de células que presentan antígeno (APC), tales como células dendríticas, y el péptido inmunogénico apropiado. Después de un tiempo de incubación apropiado (típicamente aproximadamente 7-28 días), en el cual las células precursoras son activadas y expandidas en las células efectoras, las células son inyectadas de nuevo en el paciente, en donde destruirán (CTL) o facilitarán la descrutcción (HTL) de su célula objetivo específica (e.g., una célula de tumor). También se pueden usar células dendríticas transfectadas como células que presentan antígeno.

X.E. Administración de Vacunas para Propósitos Terapéuticos Profilácticos

Las composiciones farmacéuticas y de vacuna de invención se usan típicamente para tratar y/o prevenir un cáncer que expresa o sobreexpresa STEAP-1. En aplicaciones terapéuticas, las composiciones de péptido y/o ácido nucleico son administradas a un paciente en una cantidad suficiente para elicitar una respuesta de célula B, CTL y/o HTL al antígeno y curar o al menos detener parcialmente o disminuir los síntomas y/o complicaciones. Una cantidad adecuada para cumplir esto se define como "dosis terapéuticamente efectiva". Las cantidades efectivas para este uso dependerán de, e.g., la composición particular administrada, la manera de administración, el estado y severidad de la enfermedad que es tratada, el peso y estado general de salud del paciente, y el juicio del médico tratante.

Para las composiciones farmacéuticas, los péptidos inmunogénicos de la invención, o ADN que los codifica, son generalmente administrados a un individuo que ya porta un tumor que expresa STEAP-1. Los péptidos o ADN que los codifica, pueden ser administrados individualmente o como fusiones de una o más secuencias de péptido. Los pacientes pueden ser tratados con los péptidos inmunogénicos separadamente o en conjunción con otros tratamientos, tales como cirujía, según sea apropriado.

Para uso terapéutico, la administración debe iniciar generalmente en el primer diagnóstico de cáncer asociado con STEAP-1. Esto es seguido por dosis de refuerzo hasta que los síntomas sean al menos sustancialmente aplacados y por un período de tiempo posterior. La realización de la composición de vacuna (i.e., incluyendo, pero sin limitarse a realizaciones tales como cocteles de péptido, polipéptidos poliepitópicos, minigenes, o CTLs específicos de TAA o células dendríticas pulsadas) liberada al paciente puede variar de acuerdo con el estado de la enfermedad o el estado de salud general del paciente. Por ejemplo, en un paciente con un tumor que expresa STEAP-1, una vacuna que comprende CTL específico de STEAP-1 puede ser más eficaz eliminando células de tumor en el paciente con enfermedad avanzada que las realizaciones alternativas.

Generalmente es importante proveer una cantidad del epítopo de péptido liberado por un modo de administración suficiente para estimular efectivamente una respuesta de célula T citotóxica; las composiciones que estimulan las respuestas de célula T auxiliar también pueden ser administradas de acuerdo con esta realización de la invención.

La dosis para una inmunización terapéutica inicial está usualmente en un rango de dosis de unidad en donde el valor menor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500, o 1,000 μg y su valor mayor es de aproximadamente 10,000; 20,000; 30,000; o 50,000 μg. Los valores de dosis para un humano varían típicamente de aproximadamente 500 μg a aproximadamente 50,000 μg por paciente de 70 kilogramos. Las dosis de refuerzo de entre aproximadamente 1.0 μg a aproximadamente 50,000 μg de péptido conforme a un régimen de refuerzo de semanas a meses, pueden ser administradas dependiendo de la respuesta del paciente y la condición determinada midiendo la actividad específica de CTL y HTL obtenida de la sangre del paciente. La Administración debe continuar hasta que al menos los síntomas clínicos o pruebas de laboratorio indiquen que la neoplasia ha sido eliminada o reducida y por un período posterior. Las dosis, rutas de administración, y los programas de dosis están ajustados de acuerdo con las metodoologías conocidas en la técnica.

En ciertas realizaciones, los péptidos y composiciones de la presente invención se emplean en estados de enfermedad serios, esto es, situaciones de amenaza a la vida o potencialmente amenaza a la vida. En tales casos, como resultado de las cantidades mínimas de sustancias extrañas y la naturaleza no tóxica relativa de los péptidos en composiciones preferidas de la invención, es posible y puede ser deseable por el médico tratante, aministrar exceso sustancial de esas composiciones de péptido relativas a las cantidades de dosis declaradas.

Las composiciones de vacuna de la invención también se pueden usar puramente como agentes profilácticos. Generalmente, la dosis para una inmunización profiláctica inicial está generalmente en un rango de dosis de unidad en donde el valor menor es de aproximadamente 1, 5, 50, 500, o 1000 μg y el valor mayor es de aproximadamente 10,000; 20,000; 30,000; o 50,000 μg. Los valores de dosis para un humano varían típicamente de aproximadamente 500 μg a aproximadamente 50,000 μg por paciente de 70 kilogramos. Esto es seguido por dosis de refuerzo de entre aproximadamente 1.0 μg a aproximadamente 50,000 μg de péptido administrado a intervalos

definidos de aproximadamente cuatro semanas a seis meses después de la administración inicial de la vacuna. La inmunogenicidad de la vacuna puede ser evaluada mediendo la actividad de CTL y HTL obtenido de una muestra de la sangre del paciente.

Las composiciones farmacéuticas para tratamiento terapéutico están destinadas para administración parenteral, tópica, oral, nasal, intratecal, o local (e.g. como una crema o ungüento tópico). Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas son administradas patenteralmente, e.g., intravenosamente, subcutáneamente, intradérmicamente, o intramuscularmente. Así, la invención provee composiciones para administración parenteral que comprenden una solución de los péptidos inmunogénicos disueltos o suspendidos en un vehículo aceptable, preferiblemente un vehículo acuoso.

Se puede usar una variedad de vehículos acuosos, e.g., agua, agua amortiguada, 0.8% de solución salina, 0.3% de glicina, ácido hialurónico y similares. Estas composiciones pueden ser esterilizadas mediante técnicas de esterilización convencionales bien conocidas, o pueden ser filtradas estériles. Las soluciones acuosas resultantes pueden ser empacadas para uso como están, o liofilizadas, la preparation liofilizada es combinada con una solución estéril antes de la administración.

Las composiciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables según se requiera para aproximar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y amortiguadores, agentes de ajuste de tonicidad, agentes humectantes, preservativos, y similares, por ejemplo, acetato de sodio, lactato de sodio, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaureato de sorbitán, oleato de trietanolamina, etc.

La concentración de péptidos de la invención en las formulaciones farmacéuticas puede variar ampliamente, i.e., de menos de aproximadamente 0.1 %, usualmente a o al menos aproximadamente 2% hasta tanto como 20% a 50% o más en peso, y se seleccionará principalmente por volúmenes de fluido, viscosidades, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado.

Una forma de dosis de unidad humana de una composición está típicamente incluida en una composición farmacéutica que comprende una

dosis de unidad humana de un vehículo aceptable, en una realización un vehículo acuoso, y es administrada en un volumen/cantidad que es conocida por los expertos en la técnica para ser usada para administración de tales composiciones a humanos (ver, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, A. Gennaro, Editor, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania, 1985). Por ejemplo, una dosis de péptido para inmunización inicial puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 50,000 μg, generalmente 100-5,000 μg, para un paciente de 70 kg. Por ejemplo, para ácidos nucleicos, una inmunización inicial puede ser realizada usando un vector de expresión en la forma de ácido nucleico desnudo administrado IM (o SC o ID) en las cantidades de 0.5-5 mg en múltiples sitios. El ácido nucleico (0.1 a 1000 μg) también puede ser administrado usando una pistola de gen. Siguiendo un período de incubación de 3-4 semanas, una dosis de refuerzo es luego administrada. El refuerzo puede ser virus de viruela de aves de corral recombinante administrado a una dosis de $5\text{-}10^7$ a $5x10^9$ pfu.

Para anticuerpos, un tratamiento generalmente involucra la administración repetida de la preparación de anticuerpo anti-STEAP-1, mediante una ruta de administración acceptable tal como inyección intravenosa (IV), típicamente a una dosis en el rango de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal. En general, las dosis en el rango de 10-500 mg de MAb por semana son efectivas y bien toleradas. Más aún, una dosis de carga inicial de aproximadamente 4 mg/kg de peso corporal del paciente IV, seguida por dosis semanales de aproximadamente 2 mg/kg IV de la preparación de MAb anti-STEAP-1 representa un régimen de dosis aceptable. Como lo aprecian los expertos an la técnica, varios factores pueden influir en la dosis ideal en un caso particular. Tales factores incluyen, por ejemplo, vida media de una composición, la afinidad de enlace de un Ab, la inmunogenicidad de una sustancia, el grado de expresión de STEAP-1 en el paciente, la extensión de antígeno STEAP-1 derramado circulante, el nivel de concentración de estado estable deseado, la frecuencia del tratamiento, y la influencia del quimioterapéutico u otros agentes usados en combinación con el método de tratamiento de la invención, así como el estado de salud de un paciente particular. Dosis de unidad humanas preferidas son, por ejemplo, 500 μg – 1 mg, 1 mg – 50 mg, 50 mg -100 mg, 100 mg – 200 mg, 200 mg – 300 mg, 400 mg – 500 mg, 500 mg – 600 mg, 600 mg – 700 mg, 700 mg – 800 mg, 800 mg – 900 mg, 900 mg - 1g, o 1mg – 700 mg. En ciertas realizaciones, la dosis está en un rango de 2-5 mg/kg de peso corporal, e.g., siguiendo con dosis semanales de 1-3 mg/kg; 0.5mg, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,10 mg/kg de peso

corporal, seguida por, e.g., dosis semanales en dos, trea o cuatro semanas; 0.5 – 10 mg/kg de peso corporal, e.g., seguida por dosis semanales de dos, tres o cuatro semanas; 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400 mg m^2 de área corporal semanal; 1-600 mg m^2 de área corporal semanal; 225-400 mg m^2 de área corporal semanal; esto puede seguir con dosis semanales para 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 19, 11, 12 o más semanas.

En una realización, las formas de dosis de unidad humanas de polinucleótidos comprenden un rango de dosis adecuado o cantidad efectiva que provee cualquier efecto terapéutico. Como lo apreciará el experto en la técnica, un efecto terapéutico depende de un número de factores, incluyendo la secuencia del polinucleótido, peso molecular del polinucleótido y la ruta de administración. Las dosis son generalmente seleccionadas por em médico o profesional de cuidado de la salud, de acuerdo con una variedad de parámetros conocidos en la técnica, tales como la severidad de los síntomas, historia del paciente y similares. Generalmente, para un polinucleótido de aproximadamente 20 bases, un rago de dosis puede ser seleccionado de, por ejemplo, un límite inferiore seleccionado independientemente, tal como aproximadamente 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 300, 400 o 500 mg/kg hasta in límite superiore seleccionado independientemente, mayor que el límite inferior, de aproximadamente 60, 80, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 7000, 8000, 9000 o 10,000 mg/kg. Por ejemplo, una dosis puede ser de aproximadamente cualquiera de las sigueintes: 0.1 a 100 mg/kg, 0.1 a 50 mg/kg, 0.1 a 25 mg/kg, 0.1 a 10 mg/kg, 1 a 500 mg/kg, 100 a 400 mg/kg, 200 a 300 mg/kg, 1 a 100mg/kg, 100 a 200 mg/kg, 300 a 400 mg/kg, 400 a 500 mg/kg, 500 a 1000 mg/kg, 500 a 5000 mg/kg, o 500 a 10,000 mg/kg. Generalmente, las rutas parenterales de administración pueden requerir dosis mayores de polinucleótido comparadas con la aplicación directa del nucleótido al tejido enfermo, como con los polinucleótidos de longitudes en aumento.

En una realización, las formas de dosis de unidad humanas de células T comprenden un rango de dosis adecuado o cantidad efectiva que provve cualquier efecto terapéutico. Como lo aprecia un experto en la técnica, un efecto terapéutico depende de un número de factores. Las dosis son generalmente seleccionadas por el médico u otro profesional proveedor de cuidado, de acuerdo con una variedad de parámetros conocidos en la técnica, tales como severidad de los síntomas, historia del paciente y similares. Una dosis puede ser de aproximadamente 10^4 células a aproximadamente 10^6

células, aproximadamente de 10^6 células a aproximadamente 10^8 células, aproximadamente 10^8 a aproximadamente 10^{11} células, o aproximadamente 10^8 a aproximadamente 5×10^{10} células. Una dosis también puede ser de aproximadamente 10^6 células/m^2 a aproximadamente 10^{10} células/m^2, o aproximadamente 10^6 células/m^2 a aproximadamente 10^8 células/m^2.

La(s) proteínas(s) de la invención, y/o ácidos nucleicos que codifican la proteína(s), son administrados también mediante liposomas, que también pueden servir para: 1) marcar la(s) proteínas(s) a un tejido particular, tal como un tejido linfoide; 2) marcar selectivamente a células enfermas; o, 3) aumentar la vida media de la composición de péptido. Los liposomas incluyen emulsiones, espumas, micelas, monocapas insolubles, cristales líquidos, dispersiones de fosfolípido, capas lamerales y similares. En estas preparaciones, el péptido a ser liberado es incorporado como parte de un liposoma, solo o en conjunción con una molécula que se enlaza a un receptor prevalerte entre las células linfoides, tales como anticuerpos se enlazan al antígeno CD45, o con otras composiciones terapéuticas o inmunogénicas. Así, los liposomas rellenos o decorados con un péptido deseado de la invención pueden ser dirigidos al sitio de células linfoides, en donde los liposomas liberan entonces las composiciones de péptido. Los liposomas para uso de acuerdo con la invención se forman a partir de lípidos formadores de vesícula estándar, que generalmente incluyen fosfolípidos neutros o cargados negativamente y un esterol, tal como colesterol. La selección de lípidos está generalmente guiada por consideración de, e.g., tamaño del liposoma, debilidad del ácido y estabilidad de los liposomas en la corriente sanguínea. Una variedad de métodos están disponibles para preparar liposomas, como se describe en, e.g., Szoka, *et al., Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9: 467 (1980), y las Patentes U.S. Nos. 4,235,871, 4,501,728, 4,837,028, y 5,019,369.

Para el marcado de células del sistema inmune, un ligando a ser incorporado en el liposoma puede incluir, e.g., anticuerpos o fragmentos de los mismos específicos para determinantes de la superficie celular del células del sistema inmune deseados. Una suspensión con liposoma que contiene un péptido puede ser administrado intravenosamente, localmente, tópicamente, etc., en una dosis que varía de acuerdo, *inter alia*, la manera de administración, el péptido que es liberado, y el estado de la enfermedad que es tratada.

Para composiciones sólidas, los vehículos sólidos no tóxicos convencionales se pueden usar incluyendo, por ejemplo, grados farmacéuticos

de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina de sodio, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magensio, y similares. Para administración oral, una composición no tóxica farmacéuticamente aceptable se forma incorporando cualquiera de los excipientes empleados normalmente, tales como aquellos vehículos listados previamente, y generalmente 10- 95% del ingrediente activo, esto es, uno o más péptidos de la invención, y más preferiblemente a una concentración de 25%-75%.

Para dministración en aerosol, los péptidos inmunogénicos son preferiblemente suministrados en forma finamente dividida junto con un surfactante y propelente. Los porcentajes típicos de péptidos son aproximadamente 0.01 %-20% en peso, preferiblemente aproximadamente 1%-10%. El surfactante debe, por supuesto, ser no tóxico, y preferiblemente soluble en el propelente. Representativos de tales agentes son los ésteres o ésteres parciales de ácidos grasos que contienen de aproximadamente 6 a 22 átomos de carbono, tales como ácidos caprólco, octanólco, láurico, palmítico, esteárico, linoléico, linolénico, ácidos olestéricos y oléico con un alcohol polihídrico alifático o su anhídrido cíclico. Se pueden emplear ésteres mezclados, tales como glicéridos mezclados o naturales. El surfactante puede constituir aproximadamente 0.1% - 20% en peso de la composición, preferiblemente aproximadamente 0.25 - 5%. El resto de la composición es comúnmente propelente. Un vehículo también puede ser incluido, según se desee, como con, e.g., lecitina para liberación intranasal.

XI.) Realizaciones de Diagnóstico y Pronóstico de STEAP-1.

Como se revela aquí, los polinucleótidos, polipéptidos, células T citotóxicas reactivas (CTL), células T auxiliares reactivas (HTL) y anticuerpos anti-polipéptido de STEAP-1 se usan en ensayos bien conocidos de diagnóstico, pronóstico y terapéuticos que examinan condiciones asociadas con crecimiento celular desregulado, tal como cáncer, en particular los cánceres listados en la Tabla I (ver, e.g., su patrón específico de expresión de tejido, así como su sobreexpresión en ciertos cánceres descritos, por ejemplo en el Ejemplo titulado "Análisis de la Expresión STEAP-1 en tejidos normales, y muestras de paciente ").

El STEAP-1 puede ser analogado a un antígeno PSA asociado con la próstata, el marcador arquetipo que ha sido usado por los médicos por años para identificar y monitorear la presencia de cáncer de próstata (ver, e. g.,

Merrill *et al.*, J. Urol. 163(2): 503-5120 (2000); Polascik *et al.*, J. Urol. Aug; 162(2):293-306 (1999) y Fortier *et al.*, J. Nat. Cancer Inst. 91(19): 1635- 1640 (1999)). Una variedad de otros marcadores de diagnóstico también se usan en contextos similares incluyendo p53 y K-ras (ver, e.g., Tulchinsky *et al.*, Int J Mol Med 1999 Jul 4(1):99-102 y Minimoto *et al.*, Cancer Detect Prev 2000; 24(1):1-12). Por lo tanto, esta revelación de polinucleótidos y polipéptidos de STEAP-1 (así como sondas de polinucleótido de STEAP-1 y anticuerpos anti-STEAP-1 usados para identificar la presencia de estas moléculas) y sus propiedades le permiten al experto utilizar estas moléculas en métodos que son análogos a los usados, por ejemplo, en una variedad de ensayos de diagnóstico dirigidos a condiciones de examen asociadas con el cáncer.

Realizaciones típicas de métodos de diagnóstico que utilizan los polinucleótidos, polipéptidos, células T reactivas y anticuerpos de STEAP-1 son análogas a aquellos métodos de ensayo de diagnóstico bien establecidos, que emplean, e.g., polinucleótidos, polipéptidos, células T reactivas y anticuerpos de PSA. Por ejemplo, así como los polinucleótidos de PSA se usan como sondas (por ejemplo en el análisis Northern, ver, e. g., Sharief *et al.*, Biochem. Mol. Biol. Int. 33 (3):567-74(1994)) e iniciadores (por ejemplo en análisis de PCR, ver, e. g., Okegawa *et al.*, J. Urol. 163(4): 1189-1190 (2000)) para obervar la presencia y/o el nivel de mARNs de PSA en los métodos para monitorear la sobreexpresión de PSA o la metástasis de los cánceres de próstata, los polinucleótidos de STEAP-1 descritos aquí se pueden utilizar en la misma forma para detectar la sobreenpresión de STEAP-1 o la metástasis de cáncer de próstata y otros cánceres que expresan este gen. Alternativamente, así como los polipéptidos de PSA se usan para generar anticuerpos específicos para PSA que se pueden luego usar para observar la presencia y/o nivel de proteínas PSA, en los métodos para monitorear la sobreexpresión de la proteína PSA (ver, e.g., Stephan *et al.*, Urology 55 (4):560-3 o la metástasis de células de próstata (ver, e.g., Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192(3):233-7 (1996)), los polipéptidos de STEAP-1 descritos aquí se pueden utilizar para generar anticuerpos para uso en la detección de la sobreexpresión de STEAP-1 o la metástasis de células de próstata y células de otros cánceres que expresan este gen.

Específicamente, como las metástasis involucran el movimiento de células de cáncer desde un órgano de origen (tal como el pulmón y la glándula prostática, etc.) a un área diferente del cuerpo (tal como un ganglio linfático), se pueden usar ensayos que examinan una muestra biológica para la presencia de

células que expresan polinucleótidos y/o polipéptidos de STEAP-1 para proveer evidencia de metástasis. Por ejemplo, cuando se encuentra que una muestra biológica de tejido que normalmente no contiene células que expresan STEAP-1 (ganglio linfático) contiene células que expresan STEAP-1, tal como la expresión de STEAP-1 vista en LAPC4 y LAPC9, xenoinjertos aislados de metástasis de ganglio linfático y hueso, respectivamente, este hallazgo es indicativo de metástasis.

Alternativamente, los polinucleótidos y/o polipéptidos de STEAP-1 se pueden usar para proveer evidencia de cáncer, por ejemplo, cuando se encuentra que las células en una muestra biológica que normalmente no expresa STEAP-1 o expresa STEAP-1 a un nivel diferente, expresan STEAP-1 o tienen una expresión aumentada de STEAP-1 (ver, e.g., la expresión de STEAP-1 en los cánceres listados en la Tabla I y en muestras de paciente etc., mostrados en las Figuras acompañantes). En tales ensayos, los expertos pueden desear generar evidencia suplementaria de metástasis probando la muestra biológica para la presencia de un segundo marcados restringido a tejido (además de STEAP-1) tal como PSA, PSCA etc. (ver, e.g., Alanen *et al.*, Pathol. Res. Pract. 192 (3): 237 (1996)).

El uso de inmunihistoquímica para identificar la presencia de un polipéptido de STEAP-1 dentro de una sección de tejido puede identificar un estado alterado de ciertas células dentro de ese tejido. Es bien entendido en la técnica que la habilidad de un anticuerpo para localizar a un polipéptido es está expresado en células de cáncer, es una forma de diagnosticar la presencia de enfermedad, estado de enfermedad, progresión y/o agresividad del tumor. Tal anticuerpo también puede detectar una distribución alterada del polipéptido dentro de las células de cáncer, comparadas con el tejido no maligno correspondiente.

Las composiciones de polipéptido de STEAP-1 e inmunogénicas también son útiles en vista de los fenómenos de localización de proteína subcelular alterada en estados de enfermedad. La alteración de las células de estado normal a enfermas produce cambios en la morfología celular y está usualmente asociada con cambios en la localización/distribución de proteína subcelular. Por ejemplo, las proteínas de membrana celular que están expresadas de una manera polarizada en células normales puede estar alterada en la enfermedad, produción distribución de la proteína de una manera no polar sobre la superficie celular entera.

El fenómeno de localización de proteína subcelular alterada en un estado de enfermedad ha sido demostrado con la expresión de la proteína MUC1 y Her2 por el uso de medios inmunohistoquímicos. Las células epiteliales normales tienen una distribución apical típica de MUC1, además de alguna localización supranuclear de la glicoproteína, mientras que las lesiones malignas usualmente demuestran un patrón de tinción apolar (Diaz *et al*, The Breast Journal, 7; 40-45 (2001); Zhang *et al*, Clinical Cancer Research, 4; 2669-2676 (1998): Cao, *et al*, The Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 45:1547-1557 (1997)). Adicionalmente, el epitelio de seno normal es negativo para proteína Her2 o exhibe solamente una distribución basolateral mientras que las células malignas pueden expresar la proteína dobre la superficie celular entera (De Potter, *et al*, International Journal of Cancer, 44; 969-974 (1989): McCormick, *et al*, 117; 935-943 (2002)). Alternativamente, la distribución de la proteína puede ser alterada de una superficie solamente en localización para incluir expresión citoplásmica difusa en el estado enfermo. Tal ejemplo se puede ver con MUC1 (Diaz, et al, The Breast Journal, 7: 40-45 (2001)).

La alteración en la localización/distribución de una proteína en la célula, detectada por métodos inmunohistoquímicos, también puede proveer información valiosa relacionada con la favorabilidad de ciertas modalidades de tratamiento. Este último punto se ilustra por una situación en donde una proteína puede ser intracelular en tejido normal, bero de superficie celular en células malignas; la ubicación de superficie celular hace a las células favorablemente dispuesto al diagnóstico basado en anticuerpo y regímenes de tratamiento. Cuando tal alteración de localización de proteína ocurre para STEAP-1, la proteína STEAP-1 y las respuestas inmunes relacionadas a esta son muy útiles. En consecuencia, la habilidad para determinar si una alteración de localización de proteína subcelular ocurrió para 24P4C12, hacen muy útiles a la proteína de STEAP-1 y las respuestas inmunes relacionadas a esta. El uso de las composiciones de STEAP-1 permite al experto tomar decisiones de diagnóstico y terapéuticas importantes. Los reactivos inmunohistoquímicos específicos para STEAP-1 también son útiles para detectar metástasis de tumores que expresan STEAP-1 cuando el polipéptido aparece en tejidos en donde STEAP-1 no se produce normalmente.

Así, los polipéptidos de STEAP-1 y los anticuerpos resultantes de las respuestas inmunes a estos, son útiles en una variedad de contextos

importantes tales como diagnóstico, pronóstico, propósitos preventativos y/o terapéuticos conocidos por los expertos en la técnica.

Así como los fragmentos de polinucleítudo de PSA y los variantes de polinucleótido son empleados por los expertos para uso en métodos para monitorear PSA, los fragmentos de polinucleótido de STEAP-1 y los variantes de polinucleótido, se usan de una manera análoga. En particular, los polinucleótidos de PSA usados en los métodos para monitorear PSA son sondas o iniciadores que consisten de fragmentos de la secuenia de cADN de PSA cADN secuencia. Ilustrando esto, los iniciadores usados para amplificar por PCR un polinucleótido de PSA deben incluir al menos la secuencia de PSA entera para funcionar en la reacción en cadena de polimerasa. En el contexto de tales reacciones de PCR, los expertos generalmente crean una variedad de diferentes fragmentos de polinucleótido que se pueden usar como iniciadores con el fin de amplificar diferentes porciones de un polinucleótido de interés o para optimizar las reacciones de amplificación (ver, e.g., Caetano-Anolles, G. Biotechniques 25 (3): (1998); Robertson *et al.*, Methods Mol. Biol. 98: 121-154 (1998)). Una ilustración adicional del uso de tales fragmentos se provee en el Ejemplo titulado "Análisis de la Expresión de STEAP-1 en tejidos normales, y muestras de paciente", en donde el fragmento de polinucleótido de STEAP-1 se usa como una sonda para mostrar la expresión de ARNs de STEAP-1 en células de cáncer. Adicionalmente, las secuencias de polinucleótido variante son típicamente usadas como iniciadores y sondas para los mRNAs correspondientes en la PCR y el análisis al Norte (ver, e.g., Sawai *et al.*, Fetal Diagn. Ther. 1996 Nov-Dec 11 (6):407-13 y Current Protocols in Molecular Biology, Volume 2, Unit 2, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995)). Los fragmentos de polinucleótido y variantes son útiles en este contexto en donde son capaces de enlazarse a una secuencia de polinucleótido objetiva (e.g., un polinucleótido de STEAP-1 mostrado en la Figura 2 o variante del mismo) bajo condiciones de alta severidad.

Adicionalmente, los polipéptidos de PSA que contienen un epítopo que puede ser reconocido por un anticuerpo o célula T que se enlaza específicamente a ese epítopo, se usan en métodos para monitorear PSA. Los fragmentos de polipéptido de STEAP-1 y polipéptidos análogos o variantes también se pueden usar de manera análoga. Esta práctica de usar fragmentos de polipéptido o variantes de polipéptido para generar anticuerpos (tales como anticuerpos anti-PSA o células T) es típico en la técnica con una amplia variedad de sistemas tales como proteínas de fusión usadas por médicos (ver,

e.g., Current Protocols In Molecular Biology, Volume 2, Unit 16, Frederick M. Ausubel *et al.* eds., 1995). En este contexto, cada epítopo(s) provee la arquitectura con la cual un anticuerpo o célula T es reactiva. Típicamente, los expertos crean una variedad de fragmentos de polipéptido diferentes que se pueden usar con el fin de generar respuestas inmunes específicas para porciones diferentes de un polipéptido de interés (ver, e.g., Patente U.S. No. 5,840,501 y Patente U.S. No. 5,939,533). Por ejemplo, puede ser preferible utilizar un polipéptido que comprende uno de los motivos biológicos de STEAP-1 discutidos aquí, o una subsecuencia que porta motivo que es fácilmente identificada por el experto en la técnica con base en los motivos disponibles en la técnica. Los fragmentos, variantes o análogos de polipéptido, son típicamente útiles en este contexto en la medida en que comprenden un epítopo capaz de generar un anticuerpo o célula T para una secuencia de polipéptido objetivo (e.g. un polipéptido de STEAP-1 mostrado en la Figura 3).

Como se muestra aquí, los polinucleótidos y polipéptidos de STEAP-1 (así como la sondas de polinucleótido de STEAP-1 y anticuerpos anti-STEAP-1 o células T usandas para identificar la presencia de estas moléculas) exhiben propiedades específicas que los hacen útiles para diagnosticar cánceres tales como los listados en la Tabla I. Los ensayos de diagnóstico que miden la presencia de productos del gen STEAP-1, in el fin de evaluar la presencia o aparación de una condición de enfermedad descrita aquí, tal como cáncer de próstata, se usan para identificar pacientes para medidas preventivas o monitoreo adicional, como se ha hecho tan exitosamente con PSA. Más aún, estos materiales satisfacen una necesidad en la técnica de moléculas que tienen características similares o complementarias a PSA en situaciones en donde, por ejemplo, no se puede hacer un diagnóstico definitvo de metástasis de origen prostático basado en una prueba para PSA solo (ver, e.g., Alanen et al., Pathol. Res.Pract. 192(3): 233-237 (1996)), y en consecuencia, los materiales tales como polinucleótidos y polipéptidos de STEAP-1 (así como las sondas de polinucleótido de STEAP-1 y anticuerpos anti-STEAP-1 usados para identificar la presencia de estas moléculas) necesitan ser empleados para confirmar una metástasis de origen prostático.

Finalmente, además de su uso en ensayos de diagnóstico, los polinucleótidos de STEAP-1 revelados aquí tienen un número de otras utilidades tales como su uso en la identificación de anormalidades cromosómicas oncogenéticas en la región cromosómica a la cual el gen STEAP-1 se mapea (ve el Ejemplo titulado "Mapeo cromosómico de STEAP-1"

siguiente). Más aún, además de su uso en los ensayos de diagnóstico, las proteínas o polinucleótidos relacionados con STEAP-1 y los polinucleótidos revelados aquí tienen otras utilidades tales como su uso en el análisis forense de tejidos de origen desconocido (ver, e.g., Takahama K Forensic Sci Int 1996 Jun 28; 80 (1-2): 63-69).

Adicionalmente, las proteínas o polinucleótidos relacionados con STEAP-1 de la invención se pueden usar para tratar una condición patológica caracterizada por la sobre-expresión de STEAP-1. Por ejemplo, la secuencia de amino ácido o ácido nucleico de la Figura 2 o Figura 3, o fragmentos de cualquiera, se pueden usar para generar una respuesta inmune a un antígeno STEAP-1. Los anticuerpos u otras moléculas que reaccionan con STEAP-1 se pueden usar para modular la función de esta molécula, y de esta forma proveen un beneficio terapéutico.

XII.) Inhibición de la Función de Proteína STEAP-1

La invención incluye varios métodos y composiciones para inhibir el enlace de STEAP-1 a su compañero de enlace o su asociación con otra(s) proteína(s) así como los métodos para inhibir la función de STEAP-1.

XII.A.) Inhibición de STEAP-1 con Anticuerpos Intracelulares

En un criterio, un vector recombinante que codifica anticuerpos de cadena sencilla que se enlazan específicamente a STEAP-1 es introducido en células que expresan STEAP-1 mediante tecnologías de transferencia de gen. En consecuencia, el anticuerpo anti-STEAP-1 de cadena sencilla codificado está expresado intracelularmente, se enlaza a la proteína STEAP-1, y de esta forma inhibe su función. Los métodos para diseñar tales anticuerpos de cadena sencilla intracelular son bien conocidos. Tales anticuerpos intracelulares, también conocidos como "intracuerpos", son específicamente marcados a un compartimiento particular dentro de la célula, proporcionando control en donde la actividad inhibidora del tratamiento está enfocada. Esta tecnología ha sido aplicada exitosamente en la técnica (para revisión, ver Richardson y Marasco, 1995, TIBTECH vol. 13). Los intracuerpos han mostrado que virtualmente eliminan la expresión de receptores de superficie celular abundantes de otra forma (ver, e.g., Richardson *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3137-3141; Beerli *et al.*, 1994, J. Biol. Chem. 289: 23931-23936; Deshane *et al.*, 1994, Gene Ther.1: 332-337).

Los anticuerpos de cadena sencilla comprende los dominios variables de la cadena pesada y ligera unida mediante un polipéptido enlazante flexible, y son expresados como un polipéptido simple. Opcionalmente, los anticuerpos de cadena simple son expresados como un fragmento de región variable de cadena sencilla unido a la región constante de cadena ligera. Las señales de tráfico intracelular bien conocidas son diseñadas en vectores de polinucleótido recombinantes tales como anticuerpos de cadena sencilla, con el fin de marcar precisamente el intracuerpo al compartimiento intracelular deseado. Por ejemplo, los intracuerpos marcados al retículo endoplásmico (ER) son diseñados para incorporar un péptido líder y, opcionalmente, una señal de retención ER en el C-terminal, tal como el motivo KDEL de amino ácido. Los intracuerpos están destinados a ejercer actividad en el núcleo, son diseñados para incluir una señal de localización nuclear. Las mitades de lípido están unidas a los intracuerpos con el fin de atar el intracuerpo al lado citosólico de la membrana de plasma. Los intracuerpos también pueden ser marcados para ejercer la función en el citosol. Por ejemplo, los intracuerpos citosólicos se usan para secuestrar factores dentro del citosol, evitando así que sean transportados a su destino celular natural.

En una realización, los intracuerpos se usan para capturar STEAP-1 en el núcleo, evitando así su actividad dentro del núcleo. Las señales de marcado nuclear son diseñadas en tales intracuerpos STEAP-1 con el fin de alcanzar el marcado deseado. Tales intracuerpos STEAP-1 son diseñados para enlazarse específicamente a un dominio de STEAP-1 particular. En otra realización, los intracuerpos citosólicos que se enlazan específicamente a una proteína STEAP-1 se usan para evitar STEAP-1 de obtener acceso al núcleo, evitando así que ejerzan cualquier actividad biológica dentro del núcleo (e.g., evitar que STEAP-1 forme complejos de trasncripción con otros factores).

Con el fin de dirigir específicamente la expresión de tales intracuerpos a células particulares, la trancripción del intracuerpo es colocada bajo el control regulador de un promotor y/o mejorador específico de tumor apropiado. Con el fin de marcar la expresión de intracuerpo específicamente a la próstata, por ejemplo, se puede utilizar el promotor y/o promotor/mejorador de PSA (Ver, for ejemplo, Patente U.S. No. 5,919,652 emitida el 6 de Julio de 1999).

XII.B.) Inhibición de STEAP-1 con Proteínas Recombinantes

En otro criterio, las moléculas recombinantes se enlazan a STEAP-1 y de esta forman inhiben la función STEAP-1. Por ejemplo, estas moléculas recombinantes evitan o inhiben STEAP-1 de acceder/enlazarse a su compañero(s) de enlace o asociado con otra(s) proteína(s). Tales moléculas recombinantes pueden, por ejemplo, contener la(s) parte(s) reactivas de una molécula de anticuerpo específica de STEAP-1. En una realización particular, el dominio de enlace STEAP-1 de un compañero de enlace a STEAP-1 es diseñado en una proteína de fusión dimérica, por medio de la cual la proteína de fusión comprende dos domicios de enlace de ligando STEAP-1 enlazados a la porción Fc de un IgG humano, tal como IgG1 humano. Tal porción IgG puede contener, por ejemplo, los dominios C_H2 y C_H3 y la región bisagra, pero no el dominio C_H1. Tales proteínas de fusión diméricas son administradas en forma soluble a pacientes que sufren de un cáncer asociado con la expresión de STEAP-1, por medio de la cual la proteína de fusión dimérica se enlaza específicamente a STEAP-1 y bloquea la interacción de STEAP-1 con un compañero de enlace. Tales proteínas de fusión dimérica son además combinadas en proteínas multidiméricas usando técnicas de enlace de anticuerpo conocidas.

XII.C.) Inhibición de la Transcripción o Traducción de STEAP-1

La presente invención también comprende varios métodos y composiciones para inhibir la transcripción del gen STEAP-1. Igualmente, la invención también provee métodos y composiciones para inhibir la traducción de mARN de STEAP-1 en la proteína.

En un criterio, un método para inhibir la transcripción del gen STEAP-1 comprende contactar el gen STEAP-1 con un polinucleótido antisentido de STEAP-1. En otro criterio, un método para inhibir la traducción de mARN de STEAP-1 comprende contactar un mARN de STEAP-1 con un polinucleótido antisentido. En otro criterio, una ribozima específica de STEAP-1 se puede usar para clivar un mensaje de STEAP-1, inhibiendo así la traducción. Tales métodos basados en antisentido y ribozima también pueden estar dirigidos a las regiones reguladoras del gen STEAP-1, tales como elementos promotores y/o mejoradores de STEAP-1. Igualmente, las proteínas capaces de inhibir un factor de transcripción del gen STEAP-1 se usan para inhibir la transcripción del mARN de STEAP-1. Los diferentes polinucleótidos y composiciones útiles en los métodos mencionados anteriormente han sido descritas antes. El uso de

moléculas antisentido y de ribozima para inhibir la transcripción y traducción es bien conocido en la técnica.

Otros factores que inhiben la transcripción de STEAP-1 interfieriendo la activación transcripcional de STEAP-1 son también útiles para tratar cánceres que expresan STEAP-1. Igualmente, los factores que interfieren con el procesamiento de STEAP-1 son útiles para tratar cánceres que expresan STEAP-1. Los métodos de tratamiento del cáncer que utilizan tales factores están también dentro del alcance de la invención.

XII.D.) Consideraciones Generales para Estrategias Terapéuticas

Las tecnologías de transferencia de gen y terapia de gen se pueden usar para liberar moléculas de polinucleótido terapéuticas a células de tumor que sintetizan STEAP-1 (i.e., moléculas antisentido, ribozima, polinucleótidos que codifican intracuerpos y otras inhibidoras de STEAP-1). Un número de criterios de terapia de gen son conocidos en la técnica. Los vectores recombinantes que codifican polinucleótidos antisentido de STEAP-1, ribozimas, factores capaces de interferir con la transcripción de STEAP-1, y etc., pueden ser liberados para marcar células de tumor usando tales criterios de terapia de gen.

Los criterios terapéuticos anteriores pueden ser combinados con uno cualquiera de una amplia variedad de regímenes de terapia quirúrgica, quimioterapia o radiación. Los criterios terapéuticos de la invención pueden permitir el uso de dosis reducidas de quimioterapia (u otras terapias) y/o la administración menos frecuente, una ventaja para todos los pacientes y particularmente para aquellos que no toleran bien la toxicidad del agente quimioterapéutico.

La actividad anti-tumor de una composición particular (e.g., antisentido, ribozima, intracuerpo), o una combinación de tales composiciones, se puede evaluar usando varios sistemas de ensayos *in vitro* e *in vivo*. Los ensayos *in vitro* que evaluan la actividad terapéutica incluyen ensayos de crecimiento celular, ensayos de agar blando y otrso ensayos indicativos de actividad promotora de tumor, ensayos de enlace capaces de determinar la extensión a la cual una composición terapéutica inhibirá el enlace de STEAP-1 a un compañero de enlace, etc.

In vivo, el efecto de una composición terapéutica de STEAP-1 puede ser evaluada en un modelo de animal adecuado. Por ejemplo, se pueden usar modelos de cáncer de próstata xenogénico, en donde explantes de cáncer de próstata humano o tejidos de xenoinjerto pasados son introducidos en los animales comprometidos inmunes, tales como ratones sin tratamiento o SCID (Klein *et al.*, 1997, Nature Medicine 3: 402-408). Por ejemplo, La Solicitud de Patente PCT W098/16628 y Patente U.S. 6,107,540 describen varios modelos de xenoinjertos de cáncer de próstata humano capaz ce recapitular wl desarrollo de tumors primarios, micrometástasis, y la formación de metástasis osteoblástica característica de enfermedad en último estado. Se puede predecir la eficacia usando ensayos que miden la inhibición de formación de tumor, regresión de tumor o metástasis, y similares.

Los ensayos *in vivo* que evaluan la promoción de apóptosis son útiles para evaluar las composiciones terapéuticas. En una realización, los xenoinjertos de ratones que portan tumor, tratados con la composición terapéutica pueden ser examinados para la presencia de focos apoptóticos y compararlos con ratones que portan xenoinjerto de control no tratado. La extensión a la cual los focos apoptóticos se encunetran en los tumores de los ratones tratados provee una indicación de la eficacia terapéutica de la composición.

Las composiciones terapéuticas usadas en la preáctica de los métodos anteriores pueden ser formuladas en composiciones farmacéuticas que comprenden un vehículo adecuado para el método de liberación deseado. Vehículos adecuados incluyen cualquier material que cuando es combinado con la composición terapéutica retiene la función anti-tumor de la composición terapéutica, es generalmente no reactivo con el sistema inmune del paciente. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de un número de vehículos farmacéuticos estándar tales como soluciones salinas amortiguadas con fosfato estériles, agua bacteriostática, y similares (ver, generalmente, Remington's Pharmaceutical Sciences 16th Edition, A. Osal., Ed., 1980).

Las formulaciones terapéuticas pueden ser solubilizadas y administradas por cualquier ruta capaz de liberar la composición terapéutica al sitio del tumor. Las rutas de administración potencialmente efectivas incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, parenteral, intraperitoneal, intramuscular, intratumor, intradérmica, intraórgano, ortotópica, y similares. Una formulación preferida para inyección intravenosa comprende la composición terapéutica en una

solución de agua bacteriostática preservada, agua estéril no preservada, y/o bolsas de polivinilcloruro o polietileno que contienen 0.9% de Cloruro de Sodio estéril para Inyección, USP. Las preparaciones de proteína terapéuticas pueden ser liofilizadas y almacenadas como polvos estériles, preferiblemente al vacío, y luego reconstituidas en agua bacteriostática (que contiene por ejemplo, preservativo de alcohol bencílico) o en agua estéril antes de la inyección.

Las dosis y los protocolos de administración para el tratamiento de cánceres usando los métodos anteriores variará con el método y al cáncer objetivo, y dependerá generalmente de un número de otros factores apreciados en la técnica.

XIII.) Identificación, Caracterización y Uso de Moduladores de STEAP-1

Métodos para Identificar y Usar Moduladores

En una realización, se realiza la selección para identificar moduladores que inducen o suprimen un perfil de expresión particular, suprimen o inducen rutas específicas, preferiblemente generadno así el fenotipo asociado. En otra realización, habiendo identificado diferencialmente los genes expresados importantes en un estado particular; se realizan selecciones para identificar moduladores que alteran la expresión de genes individuales, ya sea aumentan o disminuyen. En otra realización, se realiza selección para identificar moduladores que alteran una función biológica del producto de expresión de un gen expresado diferencialmente. De nuevo, habiendo identificado la importancia de un gen em im estado particular, se realizan selecciones para identificar agentes que se enlazan y/o modulan la actividad biológica del producto del gen.

Adicionalmente, se hacen selecciones para genes que son inducidos en respuesta a un agente candidato. Después de identificar un modulador (uno que suprime un patrón de expresión de cáncer que conduce a un patrón de expresión normal, o un modulador de un gen de cáncer que conduce a la expresión del gen como en tejido normal), se realiza una selección para identificar genes que son específicamente modulados en respuesta al agente. Al comparar los perfiles de expresión entre tejido normal y tejido de cáncer tratado con agente, se revelan gener que no están expresados en tejido normal

o tejido de cáncer, pero que están expresados en tejido tratado, y vice versa. Estas secuencias específicas de agente son identificadas y usadas por los métodos descritos aquí para genes de cáncer o proteínas. En particular, estas secuencias y las proteínas que las codifican se usan para marcar o identificar células tratadas con el agente. Adicionalmente, los anticuerpos son elevados contra las proteínas inducidas por agente y se usan para marcar terapéuticos novedosos a la muestra de tejido de cáncer tratada.

Identificación Relacionada con Modulador y Ensayos de Selección:

Ensayos Relacionados con la Expresión del Gen

Las proteínas, ácidos nucleicos, y anticuerpos de la invención se usan en ensayos de selección. Las proteínas asociadas con cáncer, anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas y células que contienen estas secuencias se usan en ensayos de selección, tales como evaluar el efecto de los fármacos candidatos en un "perfil de expresión del gen", el perfil de expresión de polipéptidos o la alteración de la función biológica. En una realización, se usan los perfiles de expresión, preferiblemente en conjunción con técnicas de selección de alto desempeño para permitir el monitoreo de genes de perfil de expresión después del tratamiento con un agente candidato (e.g., Davis, GF, *et al*, J Biol Screen 7: 69 (2002); Zlokarnik, et al., Science 279: 84-8 (1998); Heid, Genome Res 6:986- 94,1996).

Las proteínas de cáncer, anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas modificadas y células que contienen las proteínas de cáncer nativas o modificadas o genes, se usan en ensayos de selección. Esto es, la presente invención comprende métodos para seleccinar composiciones que modulan el fenotipo de cáncer o una función fisiológica de una proteína de cáncer de la invención. Esto se hace en el mismo gen o evaluando el efecto de fármacos candidatos en un "perfil de expresión del gen" o función biológica. En una realización, los perfiles de expresión se usan, preferiblemente en cnjunción con técnicas de selección de alto desempeño para permitir el monitoreo después del tratamiento con un agente candidato, ver Zlokarnik, supra.

Se ejecuta una variedad de ensayos dirigidos a los genes y proteínas de la invención. Los ensayos son corridos sobre un nivel de ácido nucleico o

proteína individual. Esto es, habiendo identificado un gen particular como regulado ascendentemente en cáncer, los compuestos de prueba son seleccionados para la habilidad de modular la expresión del gen o para el enlace a la proteína de cáncer de la invención. "Modulación" en este contexto incluye un aumento o un descenso en la expresión del gen. La cantidad preferida de modulación dependerá del cambio original de la expresión del gen en tejido normal versus sometido a cáncer, con cambios de al menos 10%, preferiblemente 50%, más preferiblemente 100-300%, y en algunas realizaciones 300-1000% o mayor. Así, si un gen exhibe un aumento de 4 veces en el tejido de cáncer comparado con tejido normal, una disminución de aproximadamente 4 veces es usualmente deseada; igualmente, una disminución de 10 veces en el tejido con cáncer comparado con el tejido normal, un valor objetivo de un aumento de 10 veces en la expresión por el compuesto de prueba, es usualmente deseado. Los moduladores que exacerban el tipo de expresión de gen vistos en el cáncer también son útiles, e.g., como un objetivo regulado ascendentemente en análisis adicionales.

La cantidad de expresión de gen es monitoreada usando sondas de ácido nucleico y la cuantificación de los niveles de expresión del gen, o, alternativamente, un producto del gen en sí es monitoreado, e.g., a través del uso de anticuerpos a la proteína de cáncer e inmunoensayos estándar. Las técnicas proteómicas y de separación también permiten la cuantificación de la expresión.

Monitoreo de Expresión para Identificar Compuestos que Modifican la Expresión del Gen

En una realización, el monitoreo de expresión del gen, i.e., un perfil de expresión, es monotireado simultáneamente por un número de entidades. Tales perfiles involucrarán típicamente uno o más de los genes de la Figura 2. En esta realización, e.g., las sondas de ácido nucleico de cáncer son unidas a biochips para detectar y cuantificar las secuencias de cáncer en una célula particular. Alternativamente se puede usar PCR. Así, una serie, e.g., agujeros de una placa microtituladora, puede ser usada con iniciadoras dispensados en los agujeros deseados. Entonces se puede realizar una reacción de PCR y analizar cada agujero.

El monitoreo de expresión se realiza para identificar compuestos que modifican la expresión de una o más secuencias asociadas con cáncer, e.g.,

una secuencia de polinucleótido indicada en la Figura 2. Generalmente, se agrega un modulador de prueba a las células antes del análisis. Más aún, también se proveen selecciones para identificar agentes que modulan el cáncer, modulan las proteínas de cáncer de la invención, se enlazan a una proteína de cáncer de la invención, o interfieren con el enlace de una proteína de cáncer de la invención y un anticuerpo u otro compañero de enlace.

En una realización, los métodos de selección de alto desempeño involucran una biblioteca que contiene un gran número de compuestos terapéuticos potenciales (compuestos candidatos). Tales "bibliotecas químicas combinacionales" son entonces seleccionadas en uno o más ensayos para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases químicas particulares) que muestran una actividad característica deseada. Los compuestos identificados de esta forma pueden servir como "compuestos líderes" convencionales, como compuestos para selección o como teraéuticos.

En ciertas realizaciones, las bibliotecas combinacionales de moduladores potenciales son seleccionadas para una habilidad de enlazarse a un polipéptido de cáncer o modular la actividad. Convencionalmente, nuevas entidades químicas con propiedades útiles son generadas identificando un compuesto químico (llamado "compuesto sonda") con alguna propiedad o actividad deseada, e.g., actividad inhibidora, creando variantes del compuesto sonda, y evaluando la propiedad y actividad de aquellos compuestos variantes. Usualmente se emplean métodos de selección de alto desempeño (HTS) para tal análisis.

Como se notó anteriormente, el monitoreo de la expresión del gen se usa convenientemente para probar los moduladores candidatos (e.g., proteína, ácido nucleico o molécula pequeña). Después que el agente candidato ha sido agregado y las células se han dejado incubar por un período, la muestra que contiene una secuencia objetivo a ser analizada es, e.g., agregadaa un biochip.

Si se requiere, la secuencia objetivo es preparada usando técnicas conocidas. Por ejemplo, una muestra es tratada para lisar las células, usando amortiguadores de lisis conocidos, electroporación, etc., realizando purificación y/o amplificación con PCR según sea apropiado. Por ejemplo, se realiza una transcripción *in vitro* con etiquetas unidas covalentemente a los nucleótidos. Generalmente, los ácidos nucleicos son etiquetados con biotina-FITC o PE, o con cy3 o cy5.

La secuencia objetivo puede ser etiquetada con, e.g., un fluorescente, un quimioluninescente, un químico, o una señal radiactiva, para proporcionar un medio de detección del enlace específico de una secuencia objetivo a una sonda. La etiqueta también puede ser una enzima, tal como fosfatasa alcalina o peroxidasa de rábano picante, que cuando es proporcionada con un sustrato apropiado, produce un producto que es detectado. Alternativamente, la etiqueta es un compuesto o molécula pequeña marcada, tal como un inhibidor de enzima, que se enlaza pero no es catalizada o alterada por la enzima. La etiqueta también puede ser una mitas o compuesto, tal como, una etiqueta de epítopo o biotina que se enlaza específicamente a estreptavidina. Para el ejemplo de biotina, la estreptavidina es etiquetada como se describió anteriormente, proporcionanado así una señal detectable para la secuencia objetivo enlazada. La esterptavidina etiquetada no enlazada es típicamente removida antes del análisis.

Como lo apreciarán los expertos en la técnica, estos ensayos pueden ser ensayos de hibridación directos o pueden comprender "ensayos emparedados", que incluyen el uso de múltiples sondas, como se indica generalmente en las Patentes U.S. Nos. 5, 681,702; 5,597,909; 5,545,730; 5,594,117; 5,591,584; 5,571,670; 5,580,731; 5,571,670; 5,591,584; 5,624,802; 5,635,352; 5,594,118; 5,359,100; 5,124, 246; y 5,681,697. En esta realización, en general, el ácido nucleico objetivo es preparado como se indicó anteriormente, y luego agregado al biochip que comprende una pluralidad de sondas de ácido nucleico, bajo condiciones que permiten la formación de un complejo de hibridación.

Una variedad de condiciones de hibridación se usan en la presente invención, incluyendo condiciones de alta, moderada y baja severidad como se indicaron anteriormente. Los ensayos son generalmente corridos bajo condiciones de severidad que permiten la formación del complejo de hibridación de sonda etiqueta solamente en la presencia de un objetivo. La severidad puede ser controlada alterando un parámetro de paso que es una variable termodinámica, incluyendo, pero sin limitarse a, temperatura, concentración de formamida, concentración de sal, pH de concentración de sal caotrópica, concentración de solvente orgánico, etc. Estos parámetros pueden también usarse para controlar el enlace no específico, como está generalmente indicado en la Patente U.S. No. 5,681,697. Así, puede ser deseable realizar ciertos pasos a condiciones de severidad mayores para reducir el enlace no específico.

Las reacciones indicadas aquí se pueden realizar en una variedad de formas. Los componentes de la reacción pueden ser agregados simultáneamente, o secuencialmente, en diferentes ordenes, con realizaciones preferidas indicadas más adelante. Adicionalmente, la reacción puede incluir una variedad de otros reactivos. Estos incluyen sales, amortiguadores, proteínas neutras, e.g. albúmina, detergentes, etc., que se pueden usar para facilitar la hibridación y detección óptimas, y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. Los reactivos que mejoran de otra forma la eficiencia del ensayo, tales como inhibidores de proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes anti-microbianos, etc., también se pueden usar según sea apropiado, dependiendo de los métodos de preparación de la muestra y la pureza del objetivo. Los datos del ensayo so analizados para determinar los niveles de expresión de genes individuales, y los cambios en los niveles de expresión como entre estados, formando un perfil de expresión del gen.

Ensayos Relacionados con Actividad Biológica

La invención provee métodos para identificar o seleccionar un compuesto que modula la actividad de un gen relacionado con cáncer o proteína de la invención. Los métodos comprenden agregar un compuesto de prueba, como se definió anteriormente, a una célula que comprende una proteína de cáncer de la invención. Las células contienen un ácido nucleico recombinante que codifica una proteína de cáncer de la invención. En otra realización, una biblioteca de agentes candidatos es probada en una pluralidad de células.

En un aspecto, los ensayos son evaluados en la presencia o ausencia de exposición previa o posterior de señales fisiológicas, e.g. hormonas, anticuerpos, péptidos, antígenos, citocinas, factores de crecimiento, potenciales de acción, agentes farmacológicos incluyendo quimioterapéuticos, radiación, carcinogénicos, u otras células (i.e., contactos célula-célula). En otro ejemplo, las determinaciones se hacen en diferentes estados del proceso del ciclo celular. De esta forma se identifican los compuestos que modulan los genes o proteínas de la invención. Los compuestos con actividad farmacológica son capaces de menojar o interferir con la actividad de una proteína de cáncer de la invención. Una vez identificadas, las estructuras similares son evaluadas para identificar caracterfiisticas estructurales críticas del compuesto.

En una realización, se provee un método para modular (e.g., inhibir) la división de célula de cáncer; el método comprende la administración de un

modulador de cáncer. En otra realización, se provee un método para modular (e.g., inhibir) cáncer; el método comprende la administración de un modulador de cáncer. En una realización adicional, se proveen los métodos para tratar células o individuos con cáncer; el método comprende la administración de un modulador de cáncer.

En una realización, se provee un método para modular el estado de una célula que expresa un gen de la invención. Como se usa aquí, estatus comprende los parámetros aceptados en la técnica tales como crecimiento, proliferación, supervivencia, función, apóptosis, senescencia, ubicación, actividad enzimética, transducción de señal, etc., de una célula. En una realización, un inhibidor de cáncer es un anticuerpo como se discutió anteriormente. En otra realización, el inhibidor de cáncer es una molécula en antisentido. Una variedad de ensayos de crecimiento celular, proliferación, y metástasos con conocidos por los expertos en la técnica, como se describe aquí.

Selección de Alto Desempeño para Identificar Moduladores

Los ensayos para identificar moduladores adecuados están dispuestos para la selección de alto desempeño. Los ensayos preferidos detectan por ende el mejoramiento o inhibición de la transcripción del gen de cáncer, inhibición o mejoramiento de la expresión de polipéptido, e inhibición o mejoramiento de la actividad de polipéptido activity.

En una realización, los moduladores evaluados en los métodos de selección de alto desempeño son proteínas, usualmente proteínas que se encuentran naturalmente o fragmentos de proteínas que se encuentran naturalmente. Así, e.g., se usan extractos celulares que contienen proteínas, o digestiones aleatorias o dirigidas de extractos celulares proteináceos. De esta forma, se hacen bibliotecas de proteínas para la selección en los métodos de la invención. Particularmente preferidas en esta realización son bibliotecas de proteínas bacterianas, fungosa, virales, y mamíferas, prefiriéndose las últimas, siendo especialmente preferidas las humanas. Los compuestos de prueba particularmente útiles serán dirigidos a la clase de proteínas a las cuales pertenece el objetivo, e.g., sustratos para enzimas, o ligandos y receptores.

Uso de Crecimiento en Agar Blando y Formación de Colonia para Identificar y Caracterizar Moduladores

Las células normales requieren un sustrato sólido para unirse y crecer. Cuando las células son transformadas, peirden su fenotipo y crecen desprendidas del sustrato. Por ejemplo, las células transformadas pueden crecer en sultivo en suspensión agitada o medio semi-solido suspendido, tal como agar semi-sólido o blando. Las células transformadas, cuando son transfectadas con genes supresores de tumor, pueden regenerarse al fenotipo normal y requerir de nuevo un sustrato sólido para unirse y crecer. El crecimiento en agar blando o formación de coloncia en ensayos se usa para identificar moduladores de secuencias de cáncer, que cuando están expresadas en células hospederas, inhiben la proliferación y transformación anormal. Un modulador reduce o elimina la habilidad de las células hospederas para crecer suspendidas en medio sólido o semisólido, tal como agar.

Las técnicas de crecimiento en agar blando o formación de colonia en ensayos de suspensión se describen en Freshney, Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique (3rded., 1994). Ver también, la sección de métodos de Garkavtsev *et al.* (1996), supra.

Evaluation de Inhibición de Contacto y Limitación de Densidad de Crecimiento para Identificar y Caracterizar Moduladores

Las células normales típicamente crecen en un patrón plano y organizado en un cultivo de célula hasta que se tocan entre sí. Cuando las células se tocan entre sí, son inhibidas por contacto y dejan de crecer. Las células transformadas, sin embargo, no son inhibidas por contacto y continuan creciendo a densidades altas en focos desorganizados. Así, las células transformadas crecen a mayor densidad de saturación que las células normales correspondientes. Esto es detectado morfológicamente mediante la formación de una mono capa desorientada de células o células en focos. Alternativamente, el índice de etiquetado con (H)-timidina a la densidad de saturación se usa para medir la limitación de densidad de crecimiento, igualmente un ensayo de MTT o Alamar azul revelará la capacidad de proliferación de las células y la habilidad de los moduladores para afectarla. Ver Freshney (1994), supra. Las células transformadas, cuando están trasnfectadas con genes supresores de tumor, pueden regererarse al fenotipo normal y volverse inhibidas por contacto y crecerían a una densidad menor.

En este ensayo, el índice de etiquetado con H)-timidina a densidad de saturación es un método preferido para medir la limitación de densidad de crecimiento. Las células hospederas transformadas son transfectadas con una secuencia asociada con cáncer y con cultivadas por 24 horas a densidad de saturación en condiciones de medio no limitantes. El porcentaje de células etiquetadas con (H)-timidina es determinado por el cpm incorporado.

El crecimiento independiente de contacto se usa para identificar moduladores de secuencias de cáncer, que habían conducido a la proliferación celular anormal y transformación. Un modulador reduce o elimina el crecimiento independiente de contacto, y devuelve las células a un fenotipo normal.

Evaluación del Factor de Crecimiento o Dependencia de Suero para Identificar y Caracterizar Moduladores

Las células transformadas tienen menor dependencia de suero que sus contrapartes normales (ver, e. g., Temin, J. Natl. Cancer Inst. 37: 167-175 (1966); Eagle et al., J. Exp. Med 131:836-879 (1970)); Freshney, supra. Esto se debe en parte a la liberación de varios factores de crecimiento por las células transformadas. El grado de factor de crecimiento o dependendica de suero de las células hospederas transformadas puede ser comparado con el del control. Por ejemplo, el factor de crecimiento o dependencia de suero de una célula es monitoreado en los métodos para identificar y caracterizar los compuestos que modulan las secuencias asociadas con cáncer de la invención.

Uso de Niveles de Marcador específicos de Tumor para Identificar y Caracterizar Moduladores

Las células de tumor liberan una cantidad aumentada de ciertos factores (de aquí en adeante "marcadores específicos de tumor") que sus contrapartes normales. Por ejemplo, el activador de plasminógeno (PA) es liberado del glioma humano a un nivel mayor que el de las células cerebrales normales (ver, e.g., Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, in Biological Responses in Cancer, pp. 178-184 (Mihich (ed.) 1985)). Igualmente, El Factor de Angiogénesis de Tumor (TAF) es liberado a un nivel mayor en células de tumor que sus contrapartes normales. Ver, e. g.,

Folkman, Angiogenesis and Cancer, Sem Cancer Biol. (1992)), mientras que bFGF es liberado de tumores endoteliales (Ensoli, B et al).

Varias técnicas que miden la liberación de estos factores se describen en Freshney (1994), supra. También, ver, Unkless et al., J. Biol. Chem. 249: 4295-4305 (1974); Strickland & Beers, J. Biol. Chem. 251:5694-5702 (1976); Whur et al., Br. J. Cancer 42: 305 312 (1980); Gullino, Angiogenesis, Tumor Vascularization, and Potential Interference with Tumor Growth, in Biological Responses in Cancer, pp. 178-184 (Mihich (ed.)1985); Freshney, Anticancer Res. 5: 111-130 (1985). Por ejemplo, los niveles de marcador específico de tumor son monitoreados en los métodos para identificar y caracterizar los compuestos que modulan las secuencias asociadas con cáncer de la invención.

Invasividad en Matrigel para Identificar y Caracterizar Moduladores

Se puede usar el grado de invasividad en Matrigel o un constituyente de matriz extracelular como un ensayo para identificar y caracterizar los compuestos que modulan las secuencias asociadas con cáncer. Las células de tumor enhiben una correlación positiva entre malignancia e invasividad de las células en Matrigel o algún otro constituyente de matriz extracelular. En este ensayo, las células tumorigénicas son típicamente usadas como células hospederas. La expresión de un gen supresor de tumor en estas células hospederas disminuiría la invasividad de las células hospederas. Se pueden usar las técnicas descritas en Cancer Res. 1999; 59: 6010; Freshney (1994), supra. Brevemente, el nivel de invación de células hospederas se mide usando filtros recubiertos con Matrigel o algún otro constituyente de matriz extracelular. La penetración en el gel, o a través del lado distal del filtro, es clasificada como invasividad, y clasificada histológicamente por el número de células y la distancia desplazada, o preetiquetando las células con ^{125}I y contando la radiactividad en el lado distal del filtro o fondo del disco. Ver, e.g., Freshney (1984), supra.

Evaluación de Crecimiento de Tumor In Vivo para identificar y Caracterizar Moduladores

Los efectos de las secuencias asociadas con cáncer en el crecimiento celular son probados en organismos transgénicos o inmuno suprimidos. Los organismos transgénicos son preparados en una variedad de formas aceptadas en la técnica. Por ejemplo, organismos transgénicos eliminados, e.g., se crean

mamíferos tales como ratones, en los cuales un gen de cáncer es afectado o en los cuales un gen de cáncer es insertado. Los ratones transgénicos eliminados se hacen por inserción de un marcador u otro gen heterólogo en en el sitio de gen de cáncer endógeno en el genoma de ratón mediante recombinación homóloga. Tales ratones también se pueden hacer sustituyendo el gen de cáncer endógeno con una versión mutada del gen de cáncer, o mutante el gen de cáncer endógeno, e.g., por exposición a carcinógenos.

Para preparar animales quiméricos transgénicos, e.g., ratones, un constructo de ADN es introducido en el núcleo de células troncales embriónicas. Las células que contienen la lesión genéticamente diseñada son inyectadas en un embión de ratón hospedero, que es reimplantado en una hembra recipiente. Algunos de estos embriones desarrolan ratones quiméricos que poseen células germinales, algunas de las cuales son derivadas de la línea celular mutante. Por lo tanto, criando ratones quiméricos, es posible obtener una línea nueva de ratones que contienen la lesión genética introducida (ver, e.g., Capecchi et al., Science 244: 1288 (1989)). Los ratones quiméricos pueden derivarse de acuerdo con la Patente US 6,365,797, emitida el 2 de Abril de 2002; Patente US 6,107,540 emitida el 22 de Agosto de 2000; Hogan et al., Manipulating the Mouse Embryo: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) y Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, ed. , IRL Press, Washington, D. C., (1987).

Alternativamente, se pueden usar varios animales hospederos inmuno suprimidos o inmuno deficientes. Por ejemplo, se puede usar como un hospedero un ratón "desnudo" genéticamente atímico (ver, e.g., Giovanella et al., J. Natl. Cancer Inst. 52: 921 (1974)), un ratón SCID, un ratón timectomizado, o un ratón irradiado (ver, e.g., Bradley et al., Br. J. Cancer 38: 263 (1978); Selby et al., Br. J. Cancer 41:52 (1980)). Las células de tumor transplantables (típicamente aproximadamente 10^6 células) inyectadas en los hospederos isogénicos producen tumores invasivos en una alta proporción de casos, mientras que las células normales de origen similar no. En hospederos que desarrollaron tumores invasivos, las células que expresan secuencias asociadas con cáncer son inyectadas subcutáneamente u ortotópicamente.

Los ratones con entonces separados en grupos, incluyendo grupos de control y grupos experimentales tratados) e.g. tratados con un modulador). Después de un tiempo apropiado, preferiblemente 4-8 semanas, se mide el crecimiento de tumor (e.g., por volumen o por sus dos dimensiones más largas,

o peso) y se compara con el control. Se dice que los tumores que tienen reducción estadísticamente significativa (usando, e.g., Prueba T de Student) tienen crecimiento inhibido.

Ensayos *In Vitro* para Identificar y Caracterizar Moduladores

Los ensayos para identificar los compuestos con actividad moduladora se pueden realizar *in vitro*. Por ejemplo, un polipéptido de cáncer es primero contactado con un modulador potencial e incubado por una cantidad de tiempo adecuada, e.g., de 0.5 a 48 horas. En una realización, los niveles de polipéptido de cáncer se determinan *in vitro* midiento el nivel de proteína o mARN. El nivel de proteína se mide usando inmunoensayos tales como manchado Occidental, ELISA y similares con un anticuerpo que se enlaza selectivamente al polipéptido de cáncer o un fragmento del mismo. Para la medida de mARN, amplificación, e.g., usando PCR, LCR, o ensayos de hibridación, e.g., hibridación al Norte, protección de ARNsa, manchas puntuales, son preferidos. El nivel de proteína o mARN es detectado usando agentes de detección etiquetados directamente o indirectamente, e. g., ácidos nucleicos etiquetados fluorescentemente o radioactivamente, anticueros etiquetados radioactivamente o enzimáticamente, y similares, como se describen aquí.

Alternativamente, se puede idear un sistema de gen reportero usando un promotor de proteína de cáncer operablemente enlazado a un gen reportero tal como luciferasa, proteína fluorescente verdo, CAT, o P-gal. El constructo reportero es típicamente transfectado en una célula. Después del tratamiento con un modulador potencial, se mide la cantidad de transcripción, traducción, o actividad del gen reportero de acuerdo con técnicas estándar conocidas por los expertos en la técnica (Davis GF, supra; Gonzalez, J. & Negulescu, P. Curr. Opin. Biotechnol. 1998: 9:624).

Como se indicó anteriormente, las selecciones *in vitro* se hacen en genes individuales y productos de gen. Esto es, habiendo identificado un gen expresado diferencialmente como importante en un estado particular, se realiza la selección de moduladores de la expresión del gen o producto del gen en sí.

En una realización se lleva a cabo la selección de moduladores para la expresión del gen(es) específico. Típicamente se evalua solamente la expresión de uno o unos pocos genes. En otra realización, las selecciones son diseñadas para primero encontrar compuestos que se enlazan a proteínas expresadas

diferencialmente. Estos compuestos son entonces evaluados para la habilidad de modular diferencialmente la acividad expresada. Más aún, una vez los compuestos candidatos iniciales con identificados, los variantes pueden ser seleccionados adicionalmente para evaluar mejor las relaciones estructura actividad.

Ensayos de Enlace para Identificar y Caracterizar Moduladores

En los ensayos de enlace de acuerdo con la invención generalmente se usa un producto del gen purificado o aislado de la invención. Por ejemplo, los anticuerpos son generados a una proteína de la invención, y los inmunoensayos se corren para determinar la cantidad y/o ubicación de la proteína. Alternativamente, las células que comprenden las proteínas de cáncer se usan en los ensayos.

Así, los métodos comprenden combinar una proteína de cáncer de la invención y un compuesto candidato tal como un ligando, y determinar el enlace del compuesto a la proteína de cáncer de la invención. Realizaciones preferidas utilizan la proteína de cáncer humano; también se pueden desarrollar y usar modelos animales de enfermedad humana. Además, también se pueden usar otras proteínas mamíferas análogas como lo apreciarán los expertos en técnica. Más aún, en algunas realizaciones se usan proteínas de cáncer variantes o derivadas.

Generalmente, la proteína de cáncer de la invención, o el ligando, está enlazado no difusiblemente a un soporte insoluble. El soporte puede, e.g., ser uno que tiene áreas de recepción de muestra aisladas (una placa microtituladora, una distribución, etc). Los soportes insolubles se pueden hacer de cualquier composición a la cual las composiciones pueden estar enlazadas, ser fácilmente separados del material soluble, y ser compatibles de otra forma con el método de selección general. La superficie de tales soportes puede ser sólida o pororsa y de cualquier forma conveniente.

Ejemplos de soportes insolubles adecuados incluyen include placas microtituladoras, distribuciones, membranas y lechos. Estos són típicamente hechos de vidrio, plástico (e.g., poliestireno), polisacárido, nylon, nitrocelulosa, o Teflon™, etc. Las placas microtituladoras y las distribuciones son especialmente convenientes porque un gran número de ensayos se pueden llevar a cabo simultáneamente, usando pequeñas cantidades de reactivos y muestras. La

manera particular de enlace de la composición al soporte no es crucial mientras sea compatible con los reactivos y los métodos generales de la invención, mantenga la actividad de la composición y no sea difundible. Los métodos preferidos de enlace incluyen el uso de anticuerpos que no bloquean estéricamente ni el sitio de enlace del ligando ni la secuencia de activation cuando se une la proteína al soporte, dirigen el enlace a soportes "pegajosos" o iónicos, reticulación química, la síntesis de la proteína o agente en la superficie, etc. Siguiendo el enlace de la proteína o ligando/agente de enlace al soporte, el exceso de material no enlazado es removido mediante lavado. Las áreas que reciben muestra pueden entonces ser bloequeadas a través de la incubación con albúmina de suero bovino (BSA), caseína u otra proteína inócua u otra mitad.

Una vez una proteína de cáncer de la invención es enlazada al soporte, un compuesto de prueba es agregado al ensayo. Alternativamente, el agente de enlace candidato es enlazado al soporte y la proteína de cáncer de la invención es entonces agregada. Los agentes de enlace incluyen anticuerpos específicos, agentes de enlace no naturales identificados en selecciones de bibliotecas químicas, análogos de péptido, etc.

Son de interés particular los ensayos para identificar agentes que tienen una baja toxicidad para células humanas. Se puede usar una amplia variedad de ensayos para este propósito, incluyendo ensayos de proliferación, ensayos de cAMP, ensayos de enlace proteína-proteína *in vitro* etiquetadas, ensayos de cambio de mobilidad electroforética, inmunoensayos para enlace de proteína, ensayos funcionales (ensayos de fosforilación, etc.) y similares.

Una determinación del enlace del compuesto de prueba (ligando, agente de enlace, modulador, etc.) a una proteína de cáncer de la invención se puede hacer en un número de formas. El compuesto de prueba puede ser etiquetado, y el enlace determinado directamente, e.g., uniendo tota o una porción de la proteína de cáncer de la invención a un soporte sólido, agregando un compuesto candidato etiquetado (e.g., una etiqueta fluorescente), lavando el reactivo en exceso, y determinando si la estiqueta está presente en el soporte sólido. Se pueden utilizar varios pasos de bloqueo y lavado según sea apropiado.

En ciertas realizaciones, solamente uno de los componentes está etiquetado, e.g., una proteína de la invención o ligandoss etiquetados.

Alternativamente, más de un componente es etiquetado con diferentes etiquetas, e.g., I^{125}, para las proteínas y un fluoróforo para el compuesto. También son útiles los reactivos de proximidad, e.g., reactivos de neutralización o de transferencia de energía.

Enlace Competitivo para Identificar y Caracterizar Moduladores

En una realización, el enlace del "compuesto de prueba" es determinado mediante el ensayo de enlace competitivo con un "competidor". El competidor es una mitad enlazante que se enlaza a la molécula objetivo (e.g., una a proteína de cáncer de la invención). Los competidores incluyen compuestos tales como anticuerpos, péptidos, compañeros de enlace, ligandos, etc. Bajo ciertas circunstancias, el enlace competitivo entre el compuesto de prueba y el competidor desplaza el compuesto de prueba. En una realización, el compuesto de prueba está etiquetado. Cualquiera entre el compuesto de prueba, el competidor, o ambos, es agregado a la proteína por un tiempo suficiente para permitir el enlace. Las incubaciones se realizan a una temperatura que facilita la actividad óptima, típicamente entre cuatro y 40 °C. Los períodos de incubación son típicamente optimizados, e.g., para facilitar la selección de alto desempeño rápida; típicamente entre cero y una hora será suficiente. El reactivo de exceso es generalmente removido o lavado. El segundo componente es entonces agregado, y la presencia o ausencia del componente etiquetado es seguida, para indicar el enlace.

En una realización, el competidor es agregado primero, seguidpo por el compuesto de prueba. El desplazamiento del competidor es una indicación que el compuesto de prueba está enlazado a la proteína de cáncer y por ende es capaz de enlazar, y potencialmente modular, la actividad de la proteína de cáncer. En esta realización, cualquier componente puede estar etiquetado. Así, e.g., si el competidor es etiquetado, la presencia de etiqueta en la solución de lavado del compuesto después de la prueba indica el desplazamiento por el compuesto de prueba. Alternativamente, si el compuesto de prueba está etiquetado, la presencia de la etiqueta en el soporte indica desplazamiento.

En una realización alternativa, el compuesto de prueba es agregado primero, con incubación y lavado, seguido por el competidor. La ausencia de enlace por el competidor indica que el compuesto de prueba se enlaza a la proteína de cáncer com mayor afinidad que el competidor. Así, si el compuesto de prueba está etiquetado, la presencia de la etiqueta en el soporte, acoplada

con una falta de enlace de competidor, indica que el compuesto de prueba se enlaza y, por ende, potencialmente modula la proteína de cáncer de la invención.

En consecuencia, los métodos de enlace competitivo comprenden selección diferencial para identificar agentes que son capaces de modular la actividad de las proteínas de cáncer de la invención. En esta realización, los métodos comprenden combinar una proteína de cáncer y un competidor en una primera muestra. Una segunda muestra comprende un compuesto de prueba, la proteína de cáncer, y un competidor. El enlace del competidor es determinado para ambas muestras, y un cambio, o diferencia en el enlace entre las dos muestras indica la presencia de un agente capaz de enlazarse a la proteína de enlace y potencialmente modular su actividad. Esto es, si el enlace del competidor es diferente en la segunda muestra con relación a la primera muestra, el agente es capaz de enlazarse a la proteína de cáncer.

Alternativamente, la selección diferencial se usa para identificar fármacos candidatos que se enlazan a la proteína de cáncer nativa, pero que no se pueden enlazar a proteínas de cáncer modificadas. Por ejemplo, la estructura de la proteína de cáncer es modelada y se usa en un diseño de fármaco racional para sintetizar agentes que interactúan con ese sitio, agentes que generalmente no se enlazan a las proteínas con sitio modificado. Más aún, tales fármacos candidatos que afectan la actividad de una proteína de cáncer también son identificados mediante fármacos de selección para la habilidad de mejorar o reducir la actividad de tales proteínas.

Se pueden usar controles positivos y controles negativos en los ensayos. Preferiblemente, las muestras de control y de prueba se realizan en al menos triplicado para obtener resultados estadísticamente significativos. La incubación de todas las muestras se realiza por un tiempo suficiente para permitir el enlace del agente a la proteína. Siguiendo la incubación, las muestras son lavadas libres de material no específicamente enlazado, y se determina la cantidad de agente generalmente etiquetado, enlazado. Por ejemplo, cuando se emplea una radioetiqueta, las muestras pueden ser contadas en un contador de cintilación para determinar la cantidad de compuesto enlazado.

Una variedad de reactivos se pueden incluir en los ensayos de selección. Estos incluyen reactivos como sales, proteínas neutras, e.g. albúmina, detergentes, etc., que se usan para facilitar el enlace óptimo proteína-proteína

y/o reducir las interacciones no específicas o de fondo. También se pueden usar reactivos que mejoran de otra forma la eficiencia del ensayo, tales como inhibidores de la proteasa, inhibidores de nucleasa, agentes anti-microbianos, etc. La mezcla de componentes se agrega en un orden que provee el enlace requerido.

Uso de Polinucleótidos para Regular Descendentemente o Inhibir una Proteína de la invención.

Los moduladores de polinucleótido de cáncer pueden ser introducidos en una célula que contiene la secuencia de nucleótido objetivo mediante la formación de un conjugado con una molécula de enlace a ligando, como se describe en WO 91/04753. Moléculas de enlace a ligando adecuadas incluyen, pero no se limitan a, receptores de superficie celular, factores de crecimiento, otras citocinas, u otros ligandos que se enlazan a receptores de superficie celular. Preferiblemente, la conjugación de la molécula de enlace a ligando no interfiere sustancialmente con la habilidad de la molécula de enlace a ligando de enlazarse a su molécula o receptor correspondiente, o bloquear la entrada del oligonucleótido den el sentido o antisentido o su versión conjugada en la célula. Alternativamente, un modulador de polinucleótido de cáncer puede ser introducido en una célula que contiene la secuencia de ácido nucleico objetivo, e.g., mediante la formación de un complejo polinucleótido-lípido, como se describe en WO 90/10448. Se entiende que el uso de moléculas antisentido o eliminadas y eliminación en modelos, también se puede usar en los ensayos de selección discutidos anteriormente, además de los métodos de tratamiento.

Nucleótidos Inhibidores y Antisentido

En ciertas realizaciones, la actividad de una proteína asociada con cáncer es regulada descendentemente, o totalmente inhibida, mediate el uso de polinucleótido antisentido o ARN nuclear pequeño inhibidor (snARN), i.e., un ácido nucleico complementario a, y que puede preferiblemente hibridarse específicamentea a, una secuencia de ácido nucléico de mARN de codificación, e.g., una proteína de cáncer de la invención, mARN, o una subsecuencia del mismo. El enlace del polinucleótido antisentido al mARN reduce la traducción y/o estabilidad del mARN.

En el contexto de esta invención, los polinucleótidos antisentido pueden comprender nucleótidos que se encuentran naturalmente, o especies sintéticas

formadas a partir de subunidades que se encuentran naturalmente o sus homólogos cercanos. Los polinucleótidos antisentido también pueden tener mitades de azúcar modificadas o enlaces inter-azúcar. Ejemplares entre estos están el fosforotiioato y otras especies que contienen azufre que con conocidas para uso en la técnica. Los análogos están comprendidos en esta invención en la medida en que funcionen efectivamente para hibridarse con nucleótidos de la invención. Ver, e.g., Isis Pharmaceuticals, Carlsbad, CA; Sequitor, Inc., Natick, MA.

Tales polinucleótidos antisentido pueden ser fácilmente sintetizados usando medios recombinantes, o pueden ser sintetizados *in vitro*. Ek equipo para tal síntesis es suministrado por varios vendedores, incluyendo Applied Biosystems. La preparación de otros oligonucleótidos tales como fosforotioatos y derivados alquilados, es también bien conocida por los expertos en la técnica.

Las moléculas antisentido como se usa aquí, incluyen oligonucleótidos en el sentido y antisentido. Los oligonucleótidos en el sentido pueden, e.g., emplearse para bloquear la transcripción mediante el enlace a la cadena anti-sentido. El oligonucleótido en el sentido o antisentido comprende una cadena sencilla de secuencia de ácido nucleico (ya sea ARN o ADN) capaz de enlazarse a secuencias de mARN objetivo (sentido) o ADN (antisentido) para moléculas de cáncer. Los oligonucleótidos en el sentido o antisentido, de acuerdo con la presente invención, comprenden un fragmento generalmente de al menos aproximadamente 12 nucleótidos, preferiblemente de aproximadamente 12 a 30 nucleótidos. La habilidad de derivar un oligonucleótido en el sentido oantisentido, con base en la secuencia de cADN que codifica una proteína dada se describe en, e.g., Stein & Cohen (Cancer Res. 48: 2659 (1988 y van der Krol et al. (BioTechniques 6: 958 (1988)).

Ribozimas

Además de los polinucleótidos antisentido, las ribozimas se pueden usar para marcar e inhibir la transcripción de secuencias de nucleótido asociadas con cáncer. Una ribozima es una molécua de ARN que cliva catalíticamente otras moléculas de ARN. Se han descrito diferentes clases de ribozimas, incluyendo ribozimas grupo I, ribozimas en cabeza de martillo, ribozimas de horquilla, RNasa P, y ribozimas cabeza de hacha (ver, e. g., Castanotto et al., Adv. in Pharmacology 25: 289-317 (1994) para una revisión general de las propiedades de diferentes ribozimas).

Las características generales de las ribozimas de horquilla se describen, e. g., en Hampel et al., Nucl. Acids Res. 18:299-304 (1990); Publicación de Patente Europea No. 0360257; Patente U.S. No. 5,254,678. Los métodos para prepararlas son bien conocidos por los expertos en la técnica (ver, e.g., WO 94/26877; Ojwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6340-6344 (1993); Yamada et al., Human Gene Therapy 1:39-45 (1994); Leavitt et al., Proc. Natl. Acad Sci. USA 92: 699- 703 (1995); Leavitt et al., Human Gene Therapy 5:1151-120 (1994); y Yamada et al., Virology 205:121-126 (1994)).

Uso de Moduladores en la Selección Fenotípica

En una realización, un compuesto de prueba es administrado a una población de células de cáncer, que tienen una perfil de expresión de cáncer asociado. "Administración" o "contacto" aquí, quiere decir que el modulador es agregado a las células de manera que permite al modulador actuar en la célula, ya sea por captación y acción intracelular, o por acción en la superficie celular. En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un agente proteináceo (i.e., un péptido) es colocado en un constructo viral tal como un constructo adenoviral o retroviral, y es agregado a la célula, de forma que se realiza la expresión del agente péptido, e.g., PCTUS97/01019. También se pueden usar sistemas de terapia de gen regulables. Una vez el modulador ha sido administrado a las células, las células son lavadas, si se desea, y se dejan incubar preferiblemente bajo condiciones fisiológicas por algún período. Las células son entonces recolectadas y un nuevo perfil de expresión del gen es generado. Así, e.g., el tejido de cáncer es seleccionado para agentes que modulan, e.g., inducen o suprimen, el fenotipo de cáncer. Un cambio en al menos un gen, preferiblemente muchos, del perfil de expresión indica que el agente tiene un efecto en la actividad del cáncer. Igualmente, la alteración de una función biológica o ruta de señalización es indicativa de actividad moduladora. Al definir tal alteración para el fenotipo de cáncer, se aconsejan selecciones para nuevos fármacos que alteran el fenotipo. Con este criterio, el fármaco objetivo no necesita ser conocido y no necesita ser representado en la plataforma de selección de expresión de gen/proteína original, ni el nivel de transcrito para la proteína objetivo necesita cambiarse. La función inhibidora del modulador servirá como un marcador subrogante.

Como se indicó anteriormente, se hacen selecciones para evaluar los genes o productos de gen. Esto es, habiendo identificado un gen expresado

particularmente como importante en un estado particular, se realiza la selección de moduladores de la expresión del gene o el producto del gen en sí.

Uso de Moduladores para Afectar los Péptidos de la invención

Las medidas para la actividad del polipéptido de cáncer, o del fenotipo de cáncer se realizan usando una variedad de ensayos. Por ejemplo, los efectos moduladores en la function de polipéptido(s) de cáncer se miden examinando los parámetros descritos anteriormente. Un cambio fisiológico que afecta la actividad se usa para evaluar la influencia de un compuesto de prueba en los polipéptidos de esta invention. Cuando los resultados funcionales se determinan usando células o animales intactos, se puede evaluar una variedad de efectos tales como, en el caso de un cáncer asociado con tumores sólidos, crecimiento de tumor, metástasis de tumor, neovascularización, liberación de hormona, cambios transcripcionales a marcadores genéticos conocidos o no caracterizados (e.g., mediante manchas al Norte), cambios en el metabolismo de la célula tales como crecimiento celular o cambios de pH, y cambios en los segundos mensajeros tales como cGNIP.

Métodos para Identificar Caracterizar las Secuencias Asociadas con Tumor

La expresión de varias secuencias de gen está correlacionada con e cáncer. En consecuencia se determinan los trastornos basados en genes de cáncer mutantes o variantes. En una realización, la invención provee métodos para identificar células que contienen genes de cáncer variantes, e.g., determinar la presencia de, toda o en parte, la secuencia de al menos un gen de cáncer endógeno en una célula. Esto se realiza usando cualquier número de técnicas de secuenciamiento. La invención comprende métodos para identificar el genotipo de cáncer de un individuo, e.g., determinando la secuencia toda o enparte, de al menos un gene de la invención en el individuo. Esto se hace generalmente en al menos un tejido del individuo, e.g., un tejido indicado en la Tabla I, y puede incluir la evaluación de un número de tejidos o diferentes muestras del mismo tejido. El método puede incluir comparer la secuencia del gen secuenciado con un gen de cáncer conocido, i.e., un gen tipo nativo para determinar la presencia de miembros de la familia, homologías, mutaciones o variantes. La secuencia de todo o parte del gen puede entonces ser comparada con la secuencia de un gen de cáncer conocida para determinar si existe alguna diferencia. Esto se hace usando cualquier número de programas de homología

conocidos, tales como BLAST, Bestfit, etc. La presencia de una diferencia en la secuencia entre el gen de cáncer del paciente y el gen de cáncer conocido se correlaciona con un estado de enfermedad o una propensión para un estado de enfermedad, como se indica aquí.

En una realización preferida, los genes de cáncer se usan como sondas para determiner el número de copias del gen de cáncer en el genoma. Los genes de cáncer se usan como sondas para determiner la localización cromosómica de los genes de cáncer. La información de localización cromosómica encuentra uso para proporcionar un diagn´sotico o pronóstico, en particular cuando las anormalidades cromosómicas, tales como translocationes, y similares son identificadas en los puntos de gen de cáncer.

XIV.) ARNI y Uso Terapéutico de ARN pequeño de Intereferencia (siRNAs)

La presente invención también está dirigida hacia oligonucleótidos de siARN, particularmente ARNs decatenarios que abarcan al menos un fragmento de la región de codificación de STEAP-1 o las ragiónes UTR de 5", o complemento, o cualquier oligonucleótido antisentido específico a la secuencia de STEAP-1. En una realización tales oligonucleótidos se usan para dilucidar una function de STEAP-1, o se usan para seleccionar o evaluar moduladores la función o expresión de STEAP-1. En otra realización, la expresión del STEAP-1 es reducida usando transfección de siARN y produce una capacidad profliferativa significativamente reducida de las células de cáncer transformadas que expresan endógenamente el antígeno; ás células tratadas con siARNs específicos a STEAP-1 muestran supervivencia reducida medida, e.g., mediante una lectura metabólica de la viabilidad celular, que se correlaciona con la capacidad proliferativa reducida. Así, las composiciones de siARN de STEAP-1 comprenden siARN (RNA decatenario) que corresponde a la secuencia ORF de ácido nucleico de la proteína STEAP-1 o subsecuencias de la misma; estas subsecuencias son generalmente de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o más de 35 nucleótidos de ARN contiguos de longitud y puede contener secuencias que son complemantarias y no complementarias a al menos una porción de la secuencia de codificación de mARN. En una realización preferida, las subsecuencias con de 19-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 21-23 nucleótidos de longitud.

La interferencia de ARN es un criterio novedoso para silenciar genes *in vitro* e *in vivo*, por ende, los ARNs pequeños decatenarios (siRNAs) son valiosos agentes terapéuticos. El poder de los siARNs para silenciar actividades de gen específicas ha sido ahora llevado a modelos animales de enfermedad y se usan también en humanos. Por ejemplo, se ha probado que la infusión hidrodinámica a una solución de siARN en un ratón con un siARN contra un objetivo particular es terapéuticamente efectiva.

El trabajo pionero de Song et al. indica que un tipo de ácido nucleico enteramente natural, ARNs pequeños de interferencia (siRNAs), servían como agentes terapéuticos incluso sin modificación química adicional (Song, E., et al. "RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis" Nat. Med. 9(3): 347-51 (2003)). Este trabajo proporcionó la primera evidencia *in vivo* que la infusión de siARNs en un animal podía aliviar la enfermedad. En ese caso, los autores dieron a ratones inyecciones de siARN diseñados para silenciar la proteína FAS (un receptor de la muerte celular que cuando es sobre-activado durante la respuesta inflamatoria induce la muerte de hepatocitos u otras células). Al siguiente día, los animales fueron administrados con un anticuerpo específco para Fas. Los ratones de control murieron de falla hepática aguda en unos pocos días, mientras que el 80% de los ratones tratados con siARN permanecieron libres de enfermedad seria y sobrevivieron. Aproximadamente del 80% a 90% de sus células de hígado incorporaron los oligonucleótidos de siARN desnudo. Adicionalmente, las moléculas de ARN funcionaron por 10 días antes de perder el efecto después de 3 semanas.

Para uso en terapia humana, el siARN es liberado mediante sistemas eficientes que inducen la actividad de ARNi de larga duración. Una advertencia importante para uso clínico es liberar siARNs a las células apropiadas. Los hepatocitos parecen ser particularmente receptivos al ARN exógeno. Hoy, los objetivos localizados en el hígado son atractivos porque el hígado es un órgano que puede ser fácilmente marcado por moléculas de ácido nucleico y vectores virales. Sin embargo, también se prefieren otros objetivos de tejido y órganos.

Las formulaciones de siARNs con compuestos que promueven el tránsito a lo largo de membranas celulares se usan para mejorar la administración de siARNs en terapia. Los siARN sintéticos modificados químicamente, que son resistentes a nucleasas y tienen estabilidad al suero, tienen duración mejorada concomitante de los efectos de ARNi, son una realización adicional.

Así, la tecnoclogía de siRNA es un terapéutico para malignancia humana mediante la liberación de moléculas de siARN dirigidas a STEAP- 1 a individuos con cánceres tales como los listados en la Tabla I. Tal administración de siARNs conduce al crecimiento reducido de células que cáncer que expresan STEAP-1, y provee una terapia anti-tumor, dismuniyendo la morbilidad y/o mortalidad asociada con malignancia.

La efectividad de esta modalidad de precipitación de producto del gen es significativa cuando se mide *in vitro* o *in vivo*. La efectividad *in vitro* es fácilmente demostrable a través de la aplicación de siARNs a células en cultivo (como se describió anteriormente) o a alícuotas de biopsias de pacientes con cáncer paciente cuando se usan métodos *in vitro* para detectar la expresión reducida de una proteína STEAP-1.

XV.) Kits/Artículos de Manufactura

Para uso en aplicaciones de laboratorio, de pronóstico, profilácticas, diagnósticas y terapéuticas descritas aquí, los kits están dentro del alcance de la invención. Tales kits pueden comprender un vehículo, paquete, o contenedor que está dividido para recibir uno o más contenedores tales como viales, tubos, y similares, cada uno de(los) contenedor(es) comprende uno de los elementos separado a ser usado en el método, junto con una etiqueta o inserto que comprende instrucciones de uso, tales como un suo descrito aquí. Por ejemplo, el(los) contenedor(es) comprenden una sonda que es o puede ser marcada en una forma detectable. Tal sonda puede ser un anticuerpo o polinucleótido específico para una proteína o un gen o mensaje de la invención, respectivamente. Cuando el método utiliza hibridación de ácido nucleico para detectar el ácido nucleico objetivo, el kit también puede tener contenedores que contienen nucleótido(s) para amplificación de la secuencia de ácido nucleico objetivo. Los kits pueden comprender un contenedor que comprende un reportero, tal como una proteína en enlace a biotina, tal como avidina o estreptavidina, enlazada a una molécula reportera, tal como una etiqueta enzimática, fluorescente, o radioisótopo; tal reportero se puede usar con, e.g., un ácido nucleico o anticuerpo. El kit puede incluir todas o parte de las secuencias de amino ácido de la Figura 2 o Figura 3 o análogos de las mismas, o una molécula de ácido nucleico que codifica tales secuencias de amino ácido.

El kit de la invención comprenderá típicamente el contenedor descrito anteriormente y uno o más contenedores diferentes asociados con este, que

comprenden materiales deseables desde el punto de vista comercial y de usuario, incluyendo etiquetas de amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas; vehículo, empaque, contenedor, vial y/o tub que enumeran el contenido y/o las instrucciones de uso, e insertos de empaque con instrucciones de uso.

Una etiqueta puede estar presente en o con el contenedor para indicar que la composición se usa para una terapia específica o aplicación no teraéutica, tal como aplicación de pronóstico, profiláctica, de diagnóstico o de laboratorio, y también puede indicar direcciones de uso ya sea *in vivo* o *in vitro*, tales como las descritas aquí. Las direcciones y/u otra información también se pueden incluir en un inserto (s) o etiqueta(s) con o sobre el kit. La etiqueta puede estar sobre o asociada al contenedor. Una etiqueta puede estar sobre el contenedor cuando las letras, números u otras características que forman la etiqueta son moldeadas o grabadas en el mismo contenedor; una etiqueta puede estar asociada al contenedor cuando está presente dentro de un receptáculo o vehículo que también sostiene al contenerdor, e.g., como un inserto de empaque. La etiqueta puede indicar que la composición se usa para diagnosticar, tratar, practicar profilaxis o pronosticar una condición, tal como una neoplasia de in tejido indicado en la Tabla I.

Los términos "kit" y "artículo de manufactura" se pueden usar como sinónimos.

En otra realización de la invención, se provee un artículo(s) de manufactura que contiene las composiciones, tales como secuencia(s) de amino ácido, molécula(s) pequeñas, secuencia(s) de ácido nucleico, y/o anticuerpo(s), e.g., materiales útiles para el diagnóstico, pronóstico, profilaxis y/o tratamiento de neoplasias de tejidos tales como los listados en la Tabla I. El artículo de manufactura comprende típicamente al menos un contenedor y al menos una etiqueta. Contenedores adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, y tubos de ensayo. Los contenedores se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio, metal o plástico. El contenedor puede sostener secuencia(s) de amino ácido, molécula(s) pequeña(s), secuencia(s) de ácido nucleico, poblacion(es) y/o anticuerpo(s). En una realización, el contenedor sostiene un polinucleótido para uso en el examen del perfil de expresión de mARN de una célula, junto con reactivos usados para este propósito. En otra realización un contenedor comprende un anticuerpo, fragmento de enlace del mismo o proteína de enlace específico para uso en la

evaluación de la expresión de proteína de STEAP-1 en células y tejidos, o para propósitos de laboratorio, pronóstico, diagnóstico, profilácticos y terapéuticos relevantes; las indicaciones y/o direcciones para tales usos pueden estar incluidas en o con el contenedor, como lo están los reactivos y otras composiciones o herramientas usadas para estos propósitos. En otra realización, un container comprende materiales para elicitar una respuesta inmune celular o humoral, junto con las indicaciones y/o direcciones asociadas. En otra realización, un contenedor comprende materiales para inmunoterapia adoptiva, tales como células T citotóxicas (CTL) o células T auxiliares (HTL), junto con las con indicaciones y/o direcciones asociadas; también se pueden incluir reactivos y otras composiciones o herramientas para tal propósito.

El contenedor puede alternativamente sostener una composición que es efectiva para el tratamiento, diagnóstico, pronóstico o practicar profilaxis de una condición, y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el contenedor puede tener una bolsa o un vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Los agentes activos en la composición pueden ser un anticuerpo capaz de enlazarse específicamente a STEAP-1 y modular la función de STEAP-1.

El artículo de manufactura puede comprender además un segundo contenedor que comprende un amortiguador farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina amortiguada con fosfato, solución Ringer y/o solución de dextrosa. Puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluyendo otroas amortiguadores, diluyentes, filtros, agitadores, agujas, jeringas, y/o insertos de empaque con indicaciones y/o instrucciones para uso.

EJEMPLOS:

Adicionalmente se describen e ilustran varios aspectos de la invención por medio de los diversos ejemplos que siguen, de los cuales se entenderá que ninguno limita el alcance de la invención.

Ejemplo 1: Aislamiento Generado por SSH de fragmento de cADN del Gen STEAP-1

Materiales y Métodos

Xenoinjertos de LAPC:

Se obtuvieron xenoinjertos de LAPC del Dr. Charles Sawyers (UCLA) y se generaron tal como se describió (Klein et al, 1997, Nature Med. 3: 402-408; Craft et al., 1999, Cancer Res. 59: 5030-5036). Los xenoinjertos de LAPC-4 (LAPC-4 AD y AI, respectivamente) y los xenoinjertos de LAPC-9 (LAPC-9 AD y AI, respectivamente) dependientes e independientes de andrógeno crecieron en ratones SCID machos intactos o en machos castrados, respectivamente, y se pasaron como pequeños trozos de tejido en machos recipientes. Los xenoinjertos LAPC-4 AI se derivaron de tumores de LAPC-4 AD y los xenoinjertos LAPC-9 AI se derivaron de tumores LAPC-9 AD. Para generar los xenoinjertos AI, ratones machos que portaban los tumores LAPC AD se castraron y mantuvieron durante 2-3 meses. Después de que los tumores de LAPC crecieron nuevamente, los tumores se cosecharon y pasaron en machos castrados o en ratones SCID hembras.

Los xenoinjertos LAPC-4 AD crecieron intratibialmente tal como sigue. El tejido de tumor de xenoinjerto de LAPC-4 AD que creció subcutáneamente se desmenuzó en secciones de 1-2 mm^3 mientras que el tejido se bañaba en medio Iscoves 1X, posteriormente el tejido desmenuzado se centrifugó a 1.3K rpm durante 4 minutos, el sobrenadante se resuspendió en 10 ml de medio 1X Iscoves enfriado con hielo y se centrifugó a 1.3K rpm durante 4 minutos. Posteriormente, el sedimento se resuspendió en Iscoves 1X con pronasa E 1% y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente con agitación oscilante suave seguida por la incubación en hielo durante 2-4 minutos. El filtrado se centrifugó a 1.3K rpm durante 4 minutos, y la pronasa se retiró del sedimento aspirado mediante resuspención en 10 ml de Iscoves y re-centrifugación. Posteriormente se depositaron los grupos de células en medio PrEGM y crecieron durante la noche. Posteriormente, las células se cosecharon, filtraron, lavaron 2X con RPMI, y se contaron. Se mezclaron aproximadamente 50,000 células con un volumen igual de Matrigel enfriado con hielo sobre hielo, y se inyectaron quirúrgicamente dentro de la metáfisis tibial proximal de ratones SCID a través de una aguja de calibre 27. Después de 10-12 semanas, los tumores de LAPC-4 que crecieron en la médula ósea se recuperaron.

Líneas Celulares y Tejidos:

Se obtuvieron líneas celulares humanas (por ejemplo, HeLa) de la ATCC y se mantuvieron en DMEM con suero fetal de ternero al 5%. Los tejidos

humanos para análisis de ARN y proteína se obtuvieron del Human Tissue Resource Center (HTRC) en la UCLA (Los Angeles, CA) y de QualTek, Inc. (Santa Barbara, CA).

Aislamiento de ARN:

Se homogenizaron tejido de tumor y líneas celulares en reactivo de Trizol (Life Technologies, Gibco BRL) utilizando 10 ml/g de tejido ó 10ml/10^8 células para aislar el ARN total. Se purificó el ARN Poli A del ARN total utilizando los kits Mini y Midi mRNA Oligotex de Qiagen. Se cuantificaron el mARN y el total mediante análisis espectrofotométrico (O. D. 260/280 nm) y se analizaron por medio de electroforesis de gel.

Oligonucleótidos:

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos purificados mediante HPLC.

DPNCDN (iniciador de síntesis de cADN):
5'TTTTGATCAAGCTT$_{30}$3' (SEQ ID NO: 68)

Adaptador 1:
5'CTAATACGACTCACTATAGGGCTCGAGCGGCCGCCCGGGCAG3' (SEQ ID NO: 69)
3'GGCCCGTCCTAG5' (SEQ ID NO: 70)

Adaptador 2:
5'GTAATACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTCGCGGCCGAG3' (SEQ ID NO: 71)
3'CGGCTCCTAG5' (SEQ ID NO: 72)

Iniciador 1 de PCR:
5'CTAATACGACTCACTATAGGGC3' (SEQ ID NO: 73)

Iniciador Anidado de (NP)1:
5'TCGAGCGGCCGCCCGGGCAGGA3' (SEQ ID NO: 74)

Iniciador Anidado de (NP)2:
5'AGCGTGGTCGCGGCCGAGGA3' (SEQ ID NO: 75)

Supresión por Hibridación Sustractiva:

Se utilizó Supresión por Hibridación Sustractiva (SSH) para identificar los cADNs que corresponden a los genes, los cuales pueden ser sobre-regulados en cáncer de próstata dependiente de andrógeno comparado con hiperplasia prostática benigna (BPH).

Se sintetizaron los cADNs de doble cadena correspondientes al xenoinjerto LAPC-4 AD (evaluador) y el tejido BPH (conductor) a partir de 2 µg de poli(A)+ ARN aislado del xenoinjerto y el tejido BPH, tal como se describió anteriormente, utilizando el Kit PCR-Select cDNA Substraction de CLONTECH y 1 ng de oligonucleótido de RSACDN como iniciador. Se llevó a cabo la síntesis de la primera- y segunda-cadena tal como se describió en el protocolo del manual del usuario del Kit (CLONTECH Protocolo No. PT1117-1, Catálogo No. K1804-1). Se digirió el cADN resultante con Rsa I durante 3 hrs. a 37 °C. Se extrajo el cADN digerido con fenol/cloroformo (1:1) y se precipitó en etanol.

Se generó el cADN conductor (BPH) mediante la combinación en una proporción 4 a 1 de cADN BPH digerido con Rsa I con cADN digerido de hígado de ratón, con el fin de asegurar que los genes murinos se substrayeron del cADN evaluador (LAPC-4 AD).

Se generó el cADN (LAPC-4 AD) evaluador diluyendo 1 µl de cADN LAPC-4 AD Rsa I digerido (400 ng) en 5 µl de agua. Posteriormente se ligó cADN diluido (2 µl, 160 ng) a 2 µl de adaptador 1 y adaptador 2 (10 M), en reacciones de ligación separadas, en un volumen total de 10 µl a 16 °C durante la noche, utilizando 400 u de T4 ADN ligasa (CLONTECH). Se terminó la ligación con 1 µl de EDTA 0.2 M y calentando a 72 °C por 5 min.

Se desarrolló la primera hibridación adicionando 1.5 µl (600 ng) de cADN conductor a cada uno de dos tubos que contienen 1.5 µl (20 ng) de cADN evaluador ligado a adaptador 1 y adaptador 2. En un volumen final de 4 µl, se sobrepusieron las muestras con aceite mineral, se desnaturalizaron en un ciclador térmico MJ Research a 98 °C durante 1.5 minutos, y posteriormente se permitió hibridizar durante 8 hrs a 68 °C. Posteriormente se mezclaron las dos hibridizaciones juntas con 1 µl adicional de cADN conductor desnaturalizado

fresco y se permitió que hibridazaran durante la noche a 68 °C. Posteriormente se diluyó la segunda hibridización en 200 µl de Hepes 20 mM, pH 8.3, NaCl 50 mM EDTA, 0.2 mM, se calentó a 70 °C durante 7 min. y se almacenó a -20 °C.

Amplificación por PCR, Clonación y Secuenciamiento de Fragmentos de gen Generados a partir de SSH:

Para amplificar los fragmentos de gen resultantes de las reacciones de SSH se desarrollaron dos amplificaciones por PCR. En la reacción de PCR primaria se adicionó 1 µl de la mezcla de hibridización final diluida a 1 µl del iniciador de PCR 1 (10 µM), 0.5 µl de mezcla de dNTP (10 µM), 2.5 µl de solución amortiguadora de reacción 10 x (CLONTECH) y 0.5 µl de mezcla de cADN polimerasa Advantage 50 x (CLONTECH) en un volumen final de 25 µl. Se condujo la PCR 1 utilizando las siguientes condiciones: 75 °C durante 5 min. , 94 °C durante 25 seg., posteriormente 27 ciclos de 94 °C durante 10 sec, 66 °C durante 30 seg, 72 °C durante 1.5 min. Se desarrollaron cinco reacciones de PCR primaria separadas para cada experimento. Los productos se recolectaron y diluyeron 1:10 con agua. Para la reacción de PCR secundaria, se adicionó 1 µl de la reacción de PCR primaria recolectada y diluida a la misma mezcla de reacción tal como se utilizó para PCR 1, excepto que se utilizaron los iniciadores NP1 y NP2 (10 µM) en lugar del iniciador 1 de PCR. Se desarrolló PCR 2 utilizando 10-12 ciclos de 94 °C durante 10 sec, 68 °C durante 30 sec, 72 °C durante 1.5 minutos. Se analizaron los productos de PCR utilizando electroforesis de gel con agarosa al 2%.

Los productos de la PCR se insertaron en pCR2.1 utilizando el kit de clonación de vector T/A (Invitrogen). Se sometió E. coli transformada a selección azul/blanco y ampicilina. Las colonias blancas se picaron y organizaron en placas de 96 agujeros y crecieron en líquido de cultivo durante la noche. Para identificar los insertos, se desarrolló amplificación por PCR en 1 mL de cultivo bacteriano utilizando las condiciones de PCR1 y NP1 y NP2 como iniciadores. Los productos de PCR se analizaron utilizando electroforesis de gel con agarosa al 2%.

Los clones bacterianos se almacenaron en glicerol al 20% en un formato de 96 agujeros. Se preparó el plásmido de ADN, se secuenció, y se sometió a búsquedas de homologia de ácido nucleico de las bases de datos de GenBank, dbEST, y NCI-CGAP.

Análisis de la Expresión de RT-PCR:

Se generaron los cADNs de primera cadena a partir de 1 µg de mARN con un iniciador oligo (dT)12-18 utilizando el sistema Gibco-BRL Superscript Preamplification. Se utilizó el protocolo del fabricante y se incluyó una incubación durante 50 min a 42 °C con transcriptasa inversa seguido por tratamiento con RNasa H a 37 °C durante 20 min. Después de completar la reacción, se incrementó el volumen hasta 200 µl con agua antes de la normalización. Se obtuvieron los cADNs de primera cadena de 16 tejidos humanos normales diferentes a partir de Clontech.

Se desarrolló la normalización de los cADNs de primera cadena a partir de múltiples tejidos mediante la utilización de los iniciadores 5'atatcgccgcgctcgtcgtcgacaa3' (SEQ ID NO: 76) y 5'agccacacgcagctcattgtagaagg 3' (SEQ ID NO: 77) para amplificar la β-actina. Se amplificó el cADN de primera cadena (5 µl) en un volumen total de 50 µl que contiene iniciadores 0.4 µM, 0.2 µM de cada uno de los dNTPs, solución amortiguadora de 1XPCR (Clontech, Tris-HCL 10 mM, $MgCl_2$ 1.5 mM KCl, 50 mM, pH 8.3) y 1X Klentaq ADN polimerasa (Clontech). Se removieron cinco µl de la reacción de PCR a los 18, 20, y 22 ciclos y se utilizaron para electroforesis de gel con agarosa. Se desarrolló la PCR utilizando un ciclizador térmico MJ Research bajo las siguientes condiciones: la desnaturalización inicial fue a 94 °C durante 15 sec, seguido por unos ciclos 18, 20, y 22 de 94 °C durante 15, 65 °C durante 2 min, 72 °C durante 5 sec. Se llevó a cabo una extensión final a 72 °C durante 2 min. Después de la electroforesis de gel con agarosa, se compararon las intensidades de banda de las bandas de β-actina de 283 pb de multiples tejidos mediante inspección visual. Se calcularon los factores de dilución para los cADNs de primera cadena para que resultaran en intensidades de banda de β-actina iguales en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR. Se requirieron tres rondas de normalización para alcanzar intensidades de banda iguales en todos los tejidos después de 22 ciclos de PCR.

Para determinar los niveles de expresión del gen STEAP-1, se analizaron 5 µl de cADN de primera cadena normalizado mediante PCR utilizando 25, 30, y 35 ciclos de amplificación utilizando el siguiente par de iniciadores:

5' ACT TTG TTG ATG ACC AGG ATT GGA 3' (SEQ ID NO: 78)
5' CAG AAC TTC AGC ACA CAC AGG AAC 3' (SEQ ID NO: 79)

Se logró el análisis de expresión semi cuantitativa mediante la comparación de los productos de la PCR en los números de ciclo que dieron intensidades de banda de luz.

Resultados

Se condujeron diversos experimentos de SSH tal como se describió, anteriormente, en los Materiales y Métodos, y llevaron al aislamiento de numerosos candidatos de clones de fragmento de gen. Todos los clones candidato se secuenciaron y sometieron a análisis de homología contra todas las secuencias en el gen público y las bases de datos EST con el fin de proporcionar información sobre la identidad del gen correspondiente y ayudar a guiar la decisión para analizar un gen particular para expresión diferencial. En general, los fragmentos de gen que no tuvieron homología con niguna secuencia conocida en ninguna de las de las bases de datos buscadas, y por lo tanto se considera que representan genes novedosos, así como también los fragmentos de gen que muestran homología a secuencias etiquetas (ESTs) expresadas previamente secuenciadas, se sometieron a análisis de expresión diferencial mediante RT-PCR y/o análisis al norte.

Uno de los clones de cADN, designado STEAP-1, tuvo una longitud de 436 pb y mostró homología a una secuencia EST en la base de datos de genes de tumor en NCI-CGAP. Se aisló posteriormente el cADN completo que codifica el Gen STEAP-1 utilizando este cADN y re-nombrándolo STEAP-1. La secuencia de nucleotido de cADN STEAP-1 corresponde a los residuos de nucleótido 150 a 585 en la secuencia de cADN STEAP-1 tal como se muestra en la FIG. 1. Otro clon, designado 28P3E1, de 561 pb en longitud mostró homología a un número de secuencias EST en la base de datos de gen de tumor NCI-CGAP o en otras bases de datos. Parte de la secuencia 28P3E1 (356 pb) es idéntica a un EST derivado del tejido fetal humano. Después de que se obtuvo y secuenció el cADN de STEAP-1 completo, se hizo aparente que este clon también corresponde al STEAP-1 (más específicamente, a 622 residuos a través del extremo 3' de la secuencia de nucleótido de STEAP-1 tal como se muestra en la FIG. 1).

Ejemplo 2: Aislamiento del cADN codificante de STEAP-1 de longitud Total

Se utilizó el fragmento de gen de STEAP-1 de 436 pb (Ver el Ejemplo titulado, "Aislamiento Generado por SSH de Fragmento de cADN del Gen STEAP-1") para aislar cADNs adicionales que codifican el gen 8P1D4/STEAP-1. Brevemente, se seleccionó una biblioteca de cADN de próstata humana normal (Clontech) con una sonda etiquetada generada a partir del cADN STEAP-1 de 436 pb. Uno de los clones positivos, el clon 10, tiene 1195 pb de longitud y codifica una proteína de 339 aminoácidos que tiene nucleótido y codifica secuencias de aminoácidos que no presentan homología significativa a ninguno de los genes o proteínas humanos conocidos (homología a una Proteína de Herida de Riñón de rata descrito en la Solicitud Internacional WO98/53071). La proteína codificada contiene al menos 6 motivos transmembrana predichos que implican una orientación de superficie celular. Estas características estructurales conducen a la designación "STEAP", por "Six Transmembrane Epithelial Antigen of the Prostate" (Antígeno Epitelial de Transmembrana Seis de la Próstata).

La identificación posterior de proteínas "STEAP" adicionales condujo a la re-designación del producto del Gen STEAP-1 como "STEAP-1". El cADN de STEAP-1 y las secuencias de aminoácidos codificas se muestran en FIG. 2A-Q. Se depositó el clon 10 de cADN STEAP-1 con la American Type Culture Collection ("ATCC") (10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA) como el clon 10.1 STEAP-1 plásmido en Agosto 26, 1998 como el Número de Acceso ATCC 98849. El clon de cADN STEAP-1 puede ser extirpado del mismo utilizando doble digestión EcoRI/XbaI (EcoRI en el extremo 5', XbaI en el extremo 3').

Ejemplo 3: Mapeo Cromosómico de STEAP-1

La localización cromosómica puede implicar genes en patogénesis de enfermedad. Diversos criterios de mapeo del cromosoma disponibles incluyen hibridación *in situ* fluorescente (FISH), páneles de híbrido de radiación (RH) humano/hámster (Walter etat., 1994; Nature Genetics 7: 22; Research Genetics, Huntsville Al), páneles de híbrido celular somático humano-roedor tales como el que está disponible del Coriell Institute (Camden, New Jersey), y visores genómicos que utilizan homologías BLAST para clones genómicos secuenciados y mapeados (NCBI, Bethesda, Maryland).

El STEAP-1 mapea para el cromosoma 7q21 utilizando la secuencia de STEAP-1 y la herramienta NCBI BLAST: (localizado en la Red Mundial en (.ncbi.nlm.nih.gov/genome/seqlpage.cgi?F=HsBlast.html&&ORG=Hs)).

Ejemplo 4: Análisis de Expresión de STEAP-1

En la Figura 14 (a)-(e) se muestra la expresión del STEAP-1 en muestras de pacientes con cáncer de estómago. En la Figura 14(a) se extrajo ARN de un estómago normal (N) y de 10 muestras de pacientes con cáncer de estómago diferentes (T). Se probó manchado al norte con 10 µg de ARN/lane total con la secuancia del STEAP-1. Los resultados mostraron una fuerte expresión de un STEAP-1 de aproximadamente 1.6kb en los tejidos de tumor de estómago. El panel inferior representa la tinción con bromuro de etidio de la mancha mostrando la calidad de las muestras de ARN.

La Figura 14 (b) muestra que el STEAP-1 se expresó en tejidos de pacientes con cáncer de recto. Se extrajo ARN de recto normal (N), tumores de paciente con cáncer de recto (T), y metástasis de cáncer de recto (M). Se probó manchado al norte con 10 µg de ARN total con la secuencia STEAP-1. Los resultados muestran la fuerte expresión del STEAP-1 en tejidos de paciente con cáncer de recto. El panel inferior representa tinción con bromuro de etidio de la mancha mostrando la calidad de las muestras de ARN.

La expresión de STEAP-1 mediante RT-PCR demostró que el STEAP-1 está fuertemente expresado en células endoteliales de vena umbilical de humano (HUVEC) (Figura 14 (c)). Se preparó la primera cadena de cADN a partir de células HUVEC, xenoinjertos de cáncer de próstata LAPC-4AD y LAPC-9AD, así como también de tejidos de cerebro humano. La normalización se desarrolló mediante PCR utilizando iniciadores para actina y GAPDH. Se desarrolló PCR semi-cuantitativa, utilizando Iniciadores para STEAP-1, a 27 y 30 ciclos de amplificación. Como un control, se muestra PCR utilizando Iniciadores para actina. Los resultados muestran una expresión fuerte de STEAP-1 en células HUVEC similar a la expresión detectada en tejidos de xenoinjerto de cáncer de próstata. La expresión de STEAP-1 en células HUVEC indica que la focalización en STEAP-1 también puede focalizar células endoteliales de la neovasculatura de los tumores. En la Figura 14(d) se muestra la imagen de la RT- PCR de agarosa en gel. En la Figura 14 (e) se cuantificaron los productos de la PCR utilizando el software Alphalmager. Los resultados muestran una expresión fuerte de STEAP-1 en próstata normal entre todos los

tejidos normales probados. Se detectó la expresión de la regulación ascendente de STEAP-1 en conjunto de cáncer de próstata, conjunto de cáncer de vejiga, conjunto de cáncer de riñón, conjunto de cáncer de colon, conjunto de cáncer de pulmón, conjunto de cáncer de ovario, y conjunto de cáncer de seno. Se detectó una fuerte expresión de STEAP-1 en conjunto de metástasis de cáncer, conjunto de xenoinjerto de cáncer de próstata, y metástasis de próstata hacía la glándula linfatica.

Expresión de STEAP-1 en muestras de paciente con linfoma (Figura14(f)). Se preparó la primera cadena de cADN a partir de un panel de muestras de paciente con linfoma. Se desarrolló la normalización mediante PCR utilizando iniciadores para actina. Se desarrolló PCR semi-cuantitativa, utilizando iniciadores para STEAP-1, a 26 y 30 ciclos de amplificación. Se corrieron muestras sobre un gel de agarosa, y se cuantificaron los productos de la PCR utilizando el software Alphalmager. Se registró la expresión como fuerte o media, si se detecta la señal como 26 ó 30 ciclos de amplificación respectivamente, y ausente si no se detecta ninguna señal incluso a 30 ciclos de amplificación. Los resultados muestran la expresión de STEAP-1 en 8 de 11 (72.7%) muestras de tumor probados.

Ejemplo 5: Variantes de Corte y Empalme de STEAP-1

Los variantes transcritos son variantes de mARN maduro del mismo gen los cuales surgen mediante transcripción alternativa o corte y empalme alternativo. Los transcritos alternativos son transcritos del mismo gen pero que comienzan la transcripción en puntos diferentes. Los variantes de corte y empalme son variantes de mARN cortados y empalmados de forma diferente a partir del mismo transcrito. En eucariotes, cuando un gen multi-exón es transcrito a partir de ADN genómico, el ARN inicial es cortado y empalmado para producir mARN funcional, el cual únicamente tiene exones y es empleado para traducción dentro de una secuencia de aminoácido. De acuerdo con lo anterior, un gen dado puede tener de cero a muchos transcritos alternativos y cada transcrito puede tener de cero a muchos variantes de corte y empalme. Cada variante transcrito tiene una conformación de exón única, y puede tener diferentes porciones codificantes y/o no-codificantes (extremo 5' ó 3'), del transcrito original. Los variantes transcritos pueden codificar para proteínas similares o diferentes con la misma función o una similar o pueden codificar proteínas con funciones diferentes, y pueden expresarse en el mismo tejido al mismo tiempo, o en tejidos diferentes al mismo tiempo, o en el mismo tejido en

momentos diferentes, o en diferentes tejidos en momentos diferentes. Las proteínas codificadas mediante variantes transcritos pueden tener localizaciones celulares o extracelulares similares o diferentes, por ejemplo, secretado versus intracelular.

Los variantes transcritos se identifican mediante una variedad de métodos aceptados en la técnica. Por ejemplo, los transcritos alternativos y los variantes de corte y empalme se identifican por medio de experimento de clonación completa, o mediante el uso de secuencias de transcrito completo y EST. Primero, se agruparon todas las ESTs humanas en cúmulos que muestran identidad directa o indirecta con cada uno. Segundo, las ESTs en el mismo cúmulo se agruparon adicionalmente en sub-cúmulos y se juntaron en una secuencia consenso. Se comparó la secuencia del gen original con la (s) secuencia (s) consenso u otras secuencias completas. Cada secuencia de consenso es un variante de corte y empalme potencial para este gen (ver, por ejemplo, Kan, Z., *et al.*, Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs, Genome Research, 2001 Mayo,11 (5):889-900.) Incluso cuando se identifica un variante que no es un clon completo, esa porción del variante es muy util para la generación de antígeno y para futuras clonaciones del variante de corte y empalme completo, utilizando tecnicas conocidas en la materia.

Más aún, están disponibles programas de computador en el estado de la técnica que identifican variantes transcritos basados en secuencias genómicas. Los programas de identificación de variante transcrito basados genomicamente incluyen FgenesH (A. Salamov y V. Solovyev, "Ab initio gene finding in Drosophila genomic DNA," Genome Research. 2000 Abril; 10(4):516-22); Grail (URL compbio.ornl.gov/Grail-bin/EmptyGrailForm) y GenScan (URL genes.mit.edu/GENSCAN.html). Para una discusión general de protocolos de identificación de variante de corte y empalme ver, por ejemplo, Southan, C., A genomic perspective on human proteases, FEBS Lett. 2001 Jun 8; 498(2-3):214-8; de Souza, S. J., *et al.*, Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags, Proc. Natl Acad Sci U S A. 2000 Nov 7; 97(23):12690-3.

Para confirmar posteriormente los parámetros del variante transcrito, está disponible una variedad de técnicas en el estado de la técnica, tales como clonación completa, validación proteómica, validación basada en PCR, y validación 5' RACE, etc. (ver por ejemplo, Proteomic Validación: Brennan, S. O.,

et al., Albumin banks peninsula: a new termination variant characterized by electrospray mass spectrometry, Biochem Biophys Acta. 1999 Aug 17;1433(1-2):321-6; Ferranti P, *et al.*, Differential splicing of pre-messenger RNA produces multiple forms of mature caprine alpha(s1)-casein, Eur J Biochem. 1997 Oct 1;249(1):1-7. Para validación basada en PCR: Wellmann S, *et al.*, Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endotelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology, Clin Chem. 2001 Apr; 47 (4):654-60; Jia H.P., *et al*, Discovery of new human beta-defensins using a genomics-based approach, Gene. 2001 Jan 24; 263 (1-2):211-8. Para validación basada en PCR y 5' RACE: Brigle, K. E., *et al.*, Organization of the murine reduced folate carrier gene and identification of variant splice forms, Biochem Biophys Acta. 1997 Aug 7; 1353(2): 191-8).

Se conoce en el estado de la técnica que las regiones genómicas son moduladas en los cánceres. Cuando la región genómica para la cual un gen mapea es modulada en un cáncer particular, los transcritos alternativos o variantes de corte y empalme del gen también son modulados. Lo que aquí se revela es que el STEAP-1 tiene un perfil de expresión particular relacionado con el cáncer. Los transcritos alternativos y los variantes de corte y empalme de STEAP-1 también pueden estar involucrados en cánceres en el mismo o diferentes tejidos, sirviendo de esta forma como marcadores/antígenos asociados a tumor.

Se muestra la composición del exón del transcrito original, designado como STEAP-1 v.1, en la Tabla LIII. Utilizando las secuencias de gen completo y EST, se identificaron dos variantes transcritos, designados como STEAP-1 v.2 y v.3. Comparado con STEAP-1 v.1, el variante transcrito STEAP-1 v.2 no corta y empalma el intrón 4 del STEAP-1 v.1 y el variante STEAP-1 v.3 corta y empalma un exón adicional desde el intrón 4 del STEAP-1 v.1, tal como se muestra en la Figura 11. Teóricamente, cada combinación diferente de exones en orden espacial, por ejemplo, los exones 2 y 3, es un variante de corte y empalme potencial. La Figura 11 muestra la alineación esquemática de exones de los variantes transcritos.

Ejemplo 6: Polimorfismos de Nucleótid Simple de STEAP-1

Un Polimorfismo Nucleótido Simple (SNP) es una variación de un solo par de bases en una secuencia de nucleótido en una ubicación específica. En cualquier punto dado del genoma, existen cuatro pares de bases de nucleótidos

posibles: A/T, C/G, G/C y T/A. El genotipo se refiere a la secuencia de pares de bases específica de una o más ubicaciones en el genoma de un individuo. El haplotipo se refiere a la secuencia de pares de bases de más de una ubicación en la misma molécula de ADN (o el mismo cromosoma en organismos superiores), a menudo en el contexto de un gen o en el contexto de diversos genes estrechamente relacionados. Los SNPs que ocurren en el cADN se llaman cSNPs. Estos cSNPs pueden cambiar aminoácidos de la proteína codificada por el gen y por lo tanto cambian las funciones de la proteína. Algunos SNPs causan enfermedades heredadas; otros contribuyen a variaciones cuantitativas en el fenotipo y a reacciones a factores ambientales incluyendo dieta y fármacos entre los individuos. Por lo tanto, los SNPs y/o las combinaciones de alelos (llamados haplotipos) tienen diversas aplicaciones, incluyendo el diagnóstico de enfermedades heredadas, la determinación de reacciones de fármaco y dósis, la identificación de genes responsables de enfermedades, y el análisis de la relación genética entre individuos (P. Nowotny, J. M. Kwon y A. M. Goate, "SNP analysis to dissect human traits," Curr. Opin. Neurobiol. 2001 Oct; 11(5):637-641; M. Pirmohamed y B. K. Park, "Genetic susceptibility to adverse drug reactions," Trends Pharmacol. Sci. 2001 Jun; 22(6):298- 305; J. H. Riley, C. J. Allan, E. Lai y A. Roses, " The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes," Pharmacogenomics. 2000 Feb; 1(1):39-47; R. Judson, J. C. Stephens y A. Windemuth, "The predictive power of haplotypes in clinical response", Pharmacogenomics. 2000 Feb.; 1(1):15-26).

Los SNPs se identifican por medio de una variedad de métodos aceptados en el estado de la técnica (P. Bean, "The promising voyage of SNP target discovery," Am. Clin. Lab. 2001 Oct-Nov; 20 (9):18-20; K. M. Weiss, "In search of human variation," Genome Res. 1998 Jul; 8(7):691-697; M. M. She, "Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies", Clin. Chem. 2001 Feb; 47 (2):164-172). Por ejemplo, los SNPs son identificados por medio del secuenciamiento de fragmentos de ADN que muestran polimorfismo mediante métodos basados en gel tales como polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE). También pueden ser descubiertos mediante secuenciamiento directo de muestras de ADN agrupadas a partir de diferentes individuos o por comparación de secuencias de diferentes muestras de ADN. Con la rápida acumulación de datos de secuencia en bases de datos públicas y privadas, uno puede descubrir SNPs mediante la comparación de secuencias utilizando programas de computador (Z. Gu, L.

Hillier y P. Y. Kwok, "Single nucleotide polimorphysm hunting in cyberspace," Hum. Mutat. 1998; 12(4):221-225). Los SNPs pueden verificarse y puede determinarse el genotipo o haplotipo de un individuo por medio de una variedad de métodos que incluyen el secuenciamiento directo y micromatrices de alta productividad (P. Y. Kwok, "Methods for genotyping single nucleotide polymorphisms," Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2001; 2: 235-258; M. Kokoris, K. Dix, K. Moynihan, J. Mathis, B. Erwin, P. Grass, B. Hines y A. Duesterhoeft, "High-throughput SNP genotyping with the Masscode system," Mol. Diagn. 2000 Dec; 5(4):329-340).

Utilizando los métodos descritos anteriormente, se identificaron catorce SNPs en el transcrito del clon GTH9, designado como STEAP-1 v.2, en las posiciones 602 (C/G), 386 (C/T), 1087 (T/G), 1447 (T/C), 1621 (A/T), 1625 (G/T), 1716 (C/A), 2358 (C/T), 2646 (T/G), 2859 (T/G), 2908 (A/T), 3006 (G/C), 3107 (C/T), y 3180 (A/T). Los transcritos o proteínas con alelos alternativos se designaron como variantes STEAP-1 v. 4, v.5, v.6, v.7, v.8, v.9, v.10, v.11, v.12, v.13, v.14, v.15, v.16 y v.17, respectivamente. La Figura 10 muestra el alineamiento esquemático de los variantes de SNP. La Figura 12 muestra la alineación esquemática de los variantes de proteína, correspondientes a los variantes de nucleótido. Estos alelos del SNPs, aún cuando aquí se muestran separadamente, pueden ocurrir en diferentes combinaciones (haplotipos) y en cualquiera de los variantes transcritos (tales como STEAP-1 v.1 y v. 3) que contienen el contexto de la secuencia de SNPs. Por ejemplo, los dos primeros SNP también fueron sobre STEAP-1 v.3 en las mismas posiciones, pero a 572 y 356, respectivamente, sobre STEAP-1 v.1.

Ejemplo 7: Producción de STEAP-1 Recombinante en Sistemas Procarióticos

Para expresar STEAP-1 recombinante y variantes de STEAP-1 en células procarióticas, las secuencias de cADN de STEAP-1 completo o parcial y de variante de STEAP-1 son clonadas en uno cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos en el estado de la técnica. Se utilizó el cADN completo, o cualquiera de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,25, 26, 27, 28, 29, 30 o más aminoácidos contiguos del STEAP-1, variantes, o análogos del mismo.

A. Transcripción y traducción de constructos *in vitro*:

pCRII: Para generar las sondas de ARN mensajero y antisentido de STEAP-1 para investigaciones de ARN *in situ*, se generaron constructos de pCRII (Invitrogen, Carlsbad CA) que codifican tanto a todo o a fragmentos del cADN de STEAP-1. El vector de pCRII tiene iniciadores Sp6 y T7 que flanquean al inserto para dirigir la transcripción del ARN de STEAP-1 para su uso como sondas en experimentos de hibridación de ARN *in situ*. Estas sondas son utilizadas para analizar la expresión celular y de tejido de STEAP-1 al nivel del ARN. Se utilizó el ARN de STEAP-1 transcrito que representa la región codificante de aminoácido del cADN del gen STEAP-1 en sistemas de traducción *in vitro* tales como el TnT™ Coupled Reticulolysate System (Promega, Corp. , Madison, WI) para sintetizar la proteína STEAP-1.

B. Constructos Bacterianos:

Constructos de pGEX: Para generar proteínas recombinantes de STEAP-1 en bacterias que se fusionan a la proteína glutationa S-transferasa (GST), se clonaron el todo o partes del cADN de STEAP-1 o variantes dentro del vector de fusión GST de la familia pGEX (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Estos constructos permiten expresión controlada de secuencias de la proteína STEAP-1 recombinante con GST fusionado al amino terminal y un epítopo de histidina seis (6X His) en el carboxilo terminal. Las etiquetas de GST y 6X permiten la purificación de la proteína de fusión recombinante de bacteria inducida con la matriz de afinidad apropiada y permite el reconocimiento de la proteína de fusión con los anticuerpos anti-GST y anti-His. La etiqueta de 6X His se genera mediante la adición de 6 codones de histidina al iniciador de clonación en el extremo 3', por ejemplo, del marco de lectura abierto (ORF). Puede utilizarse un sitio de escinción proteolítica, tal como el sitio de reconocimiento PreScission™ en pGEX-6P-1, de tal forma que permita la escinción de la etiqueta GST de la proteína STEAP-1-relacionada. El gen de resistencia a ampicilina y el origen pBR322 permiten la selección y el mantenimiento de los plásmidos de pGEX en *E. coli*.

Constructos de pMAL: Para generar, en bacterias, proteínas de STEAP-1 recombinantes que están unidas a la proteína enlazante de maltosa (MBP), se fusionó el toda o partes de la secuencia codificante de la proteína de cADN de STEAP-1 al gen MBP mediante la clonación dentro de los vectores pMAL-c2X y pMAL-p2X (New England Biolabs, Beverly, MA). Estos constructos permiten la

expresión controlada de las secuencias de proteína STEAP-1 recombinante con MBP fusiónado al amino terminal y una etiqueta de epítopo de 6X His en el carboxilo terminal. Las etiquetas MBP y 6X His permiten la purificación de la proteína recombinante a partir de bacteria inducida con la matriz de afinidad apropiada y permiten el reconocimiento de la proteína de fusión con los anticuerpos anti-MBP y anti-His. La etiqueta de epítopo de 6X His se genera mediante la adición de 6 codones de histidina al iniciador de clonación 3'. Un sitio de reconocimiento del factor Xa permite la escisión de la etiqueta pMAL del STEAP-1. Los vectores pMAL-c2X y pMAL-p2X se optimizan para expresar la proteína recombinante en el citoplasma o periplasma respectivamente. La expresión del periplasma favorece el plegamiento de las proteínas con enlaces disulfuro.

Constructos de pET: Para expresar STEAP-1 en células bacterianos, se clonó el todo o partes de la secuencia codificante de la proteína de cADN de STEAP-1 en la familia de vectores pET (Novagen, Madison, WI). Estos vectores permiten la expresión estrechamente controlada de la proteína STEAP-1 recombinante en bacterias con y sin fusión a proteínas que mejoran la solubilidad, tales como NusA y tioredoxin (Trx), y etiquetas de epítopo, tales como 6X His y S-Tag™ que ayudan a la purificación y detección de la proteína recombinante. Por ejemplo, los constructos se hacen utilizando el sistema de fusión pET NusA 43.1 de tal forma que las regiones de la proteína STEAP-1 se expresan como fusiones amino-terminales a NusA.

C. Constructos de Levadura:

Constructos de pESC: Para expresar STEAP-1 en la especie de levadura *Saccharomyces cerevisiae* para generación de estudios de proteína recombinante y funcionales, se clonó toda o partes de la secuencia codificante de la proteína de cADN de STEAP-1 en la familia de vectores pESC de los cuales cada uno contiene 1 de 4 marcadores seleccionables, HIS3, TRP1, LEU2, y URA3 (Stratagene, La Jolla, CA). Estos vectores permiten la expresión controlada del mismo plásmido de hasta 2 genes diferentes o secuencias clonadas que contienen bien sea las etiquetas de los epítopos Flag™ o Myc en la misma célula de levadura. Este sistema es útil para confirmar las interacciones proteína-proteína de STEAP-1. Adicionalmente, la expresión en levadura produce modificaciones pos-traduccionales similares, tales como glicosilaciones y fosforilaciones, que se encuentran cuando se expresan en células eucarióticas.

Constructos de pESP: Para expresar STEAP-1 en la especie de levadura *Saccharomyces pombe*, se clonó el todo o partes de la secuencia codificante de la proteína de cADN STEAP-1 en la familia de vectores pESP. Estos vectores permiten un alto nivel de expresión controlada de una secuencia de proteína STEAP-1 que está unida bien sea en el amino terminal o en el carboxilo terminal a GST el cual ayuda a la purificación de la proteína recombinante. Una etiqueta de epítopo de Flag™ permite la detección de la proteína recombinante con anticuerpo anti-Flag™.

Ejemplo 8: Producción de STEAP-1 Recombinante en Sistemas Eucarióticos Superiores

A. Constructos de Mamíferos:

Para expresar el STEAP-1 recombinante en células eucarióticas, las secuencias de cADN de STEAP-1 completas o parciales pueden clonarse en uno cualquiera de una variedad de vectores de expresión conocidos en el estado de la técnica. Una o más de las siguientes regiones de STEAP-1 se expresan en estos constructos, aminoácidos 1 a 339 de STEAP-1 v.1, v.4, aminoácidos 1 a 258 de v.2, aminoácidos 1 a 282 de v.3, o cualquiera de 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 o más aminoácidos contiguos de STEAP-1, variantes, o análogos del mismo. En ciertas realizaciones una región de un variante específico de STEAP-1 es expresada que codifica un aminoácido en una posición específica la cual difiere del aminoácido de cualquier otra variante encontrado en esta posición. En otras realizaciones, una región de un variante del STEAP-1 se expresa que une parcialmente o enteramente dentro de una secuencia que es única para ese variante.

Los constructos pueden transfectarse dentro de uno cualquiera de una amplia variedad de células de mamíferos tales como las células 293T. Los lisados de las células 293T transfectadas pueden sondearse con el suero policional anti-STEAP-1, aquí descrito.

Constructos de pcADN4/HisMax: Para expresar STEAP-1 en células de mamíferos, se clonó un ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, de STEAP-1 en pcADN4/HisMax Version A (Invitrogen, Carlsbad, CA). La

expression de la proteína se dirige desde el promotor del citomegalovirus (CMV) y el potenciador de la traducción SP16. La proteína recombinante tiene epítopos Xpress™y de histidina seis (6X His) fusionados al amino terminal. El vector pcADN4/HisMax también contiene la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y secuencia de terminación de transcripción para potenciar la estabilidad del mARN junto con el origen SV40 para replicación episomal y rescate de vector simple en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a zeocina admite para selección de células de mamíferos que expresan la proteína y el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de ColE1 permite la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Constructos de pcADN3.1/MycHis: Para expresar STEAP-1 en células de mamíferos, se clonó un ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, de STEAP-1 con sitio de iniciación de traducción de consenso Kozak dentro de pcADN3.1/MycHis Versión A (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se dirigió la expresión de la proteína desde el promotor del citomegalovirus (CMV). Las proteínas recombinantes tienen el epítopo myc y el epítopo 6X His unidos al carboxilo terminal. El vector de pcADN3.1/MycHis también contiene la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y la secuencia de terminación de la transcripción para potenciar la estabilidad del mARN, junto con el origen SV40 para replicación episomal y el rescate de vector simple en líneas celulares que expresan el antígeno T grande. Se utilizó el gen de resistencia a neomicina, ya que admite para selección de células de mamíferos que expresan la proteína y el gen de resistencia a la ampicilina y el origen ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*.

Constructo de pcADN3.1/CT-GFP-TOPO: Para expresar STEAP-1 en células de mamíferos y para permitir la detección de las proteínas recombinantes utilizando fluorescencia, se clonó un ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, con sitio de iniciación de traducción de consenso Kozak dentro de pcADN3.1/CT-GFP-TOPO (Invitrogen, CA). Se dirigió la expresión de la proteína desde el promotor del citomegalovirus (CMV). Las proteínas recombinantes tienen la Proteína Fluorescente Verde (GFP) unida al carboxilo terminal facilitando los estudios de detección *in vivo*, no invasiva y de biología celular. El vector de pcADN3.1 CT-GFP-TOPO también contiene la señal de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovino (BGH) y la secuencia de terminación de la transcripción para potenciar la estabilidad del mARN, junto con el origen SV40 para replicación episomal y el rescate de vector simple en

líneas celulares que expresan el antígeno T grande. El gen de resistencia a neomicina admite para selección de células de mamíferos que expresan la proteína, y el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Se hacen constructos adicionales con una fusión GFP amino terminal en pcADN3.1/NT-GFP-TOPO atravesando la longitud completa de una proteína STEAP-1.

EtiquetaPAP: Se clonó un ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, en una etiqueta de pAP-5 (GenHunter Corp. Nashville, TN). Este constructo genera una fusión de fosfatasa alcalina en el carboxilo terminal de una proteína STEAP-1 mientras que se fusiona la secuencia de señal de IgGκ al amino terminal. También se generaron constructos en los cuales se fusiona fosfatasa alcalina con una secuencia de señal de IgGκ amino-terminal al amino terminal de una proteína STEAP-1. Las proteínas de STEAP-1 recombinantes resultantes se optimizan para secreción dentro del medio de células de mamíferos transfectadas y pueden utilizarse para identificar proteínas tales como ligandos o receptores que interactúan con las proteínas de STEAP-1. Se dirigió la expresión de la proteína desde el promotor de CMV y las proteínas recombinantes contienen además los epítopos myc y 6X His fusionados en el carboxilo terminal que facilita la detección y purificación. El gen de resistencia a zeocina presente en el vector admite para selección de células de mamíferos que expresan la proteína recombinante y el gen de resistentcia a la ampicilina permite la selección del plásmido en *E. coli*.

etiquetap5: Se clonó un ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, en una etiqueta de p-5. Este vector es similar a la etiqueta de pAP pero sin la fusión de fosfatasa alcalina. Este constructo generó proteína STEAP-1 con una secuencia de señal IgGκ amino-terminal y las etiquetas de los epítopos de myc y 6X His en el carboxilo terminal que facilita la detección y purificación por afinidad. La proteína STEAP-1 recombinante resultante se optimizó para secreción dentro del medio de células de mamíferos transfectadas, y se utilizó como inmunógeno o ligando para identificar proteínas tales como ligandos o receptores que ineractúan con las proteínas de STEAP-1. Se dirigió la expresión de la proteína desde el promotor de CMV. El gen de resistencia a zeocina presente en el vector admitió para selección de células de mamíferos que expresan la proteína, y el gen de resistencia a la ampicilina permite la selección del plásmido en E. coli.

PsecFc: También se clonó un ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, en psecFc. Se conformó el vector psecFc mediante la clonación de la inmunoglobulina humana G1 (IgG) Fc (regiones de bisagra, CH2, CH3) dentro de la etiqueta de pSec2 (Invitrogen, California). Este constructo generó una fusión de IgG1 Fc en el carboxilo terminal de las proteínas de STEAP-1, fusionando al mismo tiempo la secuencia de señal IgGK al N-terminal. También se utilizaron las fusiones de STEAP-1 empleando la región IgG1 Fc murina. Las proteínas de STEAP-1 recombinantes resultantes se optimizaron para secreción dentro del medio de células de mamíferos transfectadas, y pudieron utilizarse como inmunógenos o para identificar proteínas tales como ligandos o receptores que interactúan con la proteína STEAP-1. Se dirigió la expresión de la proteína desde el promotor de CMV. El gen de resistencia a higromicina presente en el vector admitió para selección de células de mamíferos que expresan la proteína recombinante, y el gen de resistencia a la ampicilina permite la selección del plásmido en *E. coli*.

Constructos de pSRα: Para generar líneas celulares de mamíferos que expresen constitutivamente STEAP-1, ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, se clonaron de STEAP-1 dentro de constructos de pSRα. Se generaron retrovirus anfotrópicos y ecotrópicos por medio de transfección de constructos de pSRα dentro de la línea de empaquetamiento 293T-10A1 o co-transfección de pSRα y un plásmido auxiliar (que contiene las secuencias de empaquetamiento eliminadas) dentro de células 293, respectivamente. Se utilizó el retrovirus para infectar una variedad de líneas celulares de mamíferos, resultando en la integración del gen clonado, STEAP-1, dentro de las líneas celulares hospederas. Se dirigió la expresión de la proteína desde una repetición terminal larga (LTR). El gen de resistencia a neomicina presente en el vector admitió para selección de células de mamíferos que expresan la proteína, y el gen de resistencia a la ampicilina and el origen de ColE1 permiten la selección y el mantenimiento del plásmido en *E. coli*. Después de ello, se utilizaron los vectores retrovirales para infección y generación de varias líneas celulares utilizando, por ejemplo, células PC3, NIH 3T3, TsuPr1, 293 o rat-1.

Se prepararon constructos de pSRα adicionales que se fusionan a una etiqueta de epítopo tal como la etiqueta FLAG™ hacia el carboxilo terminal de secuencias de STEAP-1 para permitir la detección utilizando anticuerpos anti-Flag. Por ejemplo, se adiciona la secuencia de FLAG™ 5' gat tac aag gat gac gac gat aag 3' (SEQ ID NO: 80) al iniciador de clonación en el extremo 3' del ORF. Se hicieron constructos de pSRα adicionales para producir tanto

proteínas de fusión GFP y myc/6X His amino-terminales y carboxilo-terminales de las proteínas de STEAP-1 completas.

Vectores Virales Adicionales: Se prepararon constructos adicionales para liberación y expresión de STEAP-1 mediado por virus. Se alcanzó un alto título de virus que conduce a un alto nivel de expresión de STEAP-1 en sistemas de liberación viral tales como vectores adenovirales y vectores tipo amplicón de herpes. Se amplificaron unas secuencias codificantes de STEAP-1 o fragmentos de las mismas mediante PCR y se subclonaron dentro de un vector transportador AdEasy (Stratagene). Se desarrolló la recombinación y empaquetamiento del virus de acuerdo con las instrucciones del fabricante para generar vectores adenovirales. De manera alternativa, se clonaron secuencias codificantes de STEAP-1 o fragmentos de las mismas dentro del vector HSV-1 (Imgenex) para generar vectores virales de herpes. Después de ello, se utilizaron los vectores virales para infección de varias líneas celulares tales como células PC3, NIH 3T3, 293 o rat-1.

Sistemas de Expresión Regulada: Para controlar la expresión de STEAP-1 en células de mamíferos, se clonaron secuencias codificantes de STEAP-1, o porciones de las mismas, dentro de sistemas de expresión mamífera regulada tales como el Sistema T-Rex (Invitrogen), el Sistema GeneSwitch (Invitrogen) y el Sistema Ecdysone estrechamente regulado (Stratagene). Estos sistemas permiten el estudio de los efectos temporal y dependiente de la concentración de STEAP-1 recombinante. Estos vectores se utilizaron posteriormente para controlar la expresión de STEAP-1 en varias líneas celulares tales como células PC3, NIH 3T3, 293 o rat-1.

B. Sistemas de Expresión de Baculovirus

Para generar proteínas de STEAP-1 recombinantes en un sistema de expresión de baculovirus, se clonó ORF de STEAP-1, o porciones del mismo, dentro del vector de transferencia de baculovirus pBlueBac 4.5 (Invitrogen), el cual proporciona una etiqueta His en el N-terminal. Específicamente, se co-transfecta pBlueBac-STEAP-1 con un plásmido auxiliar pBac-N-Blue (Invitrogen) dentro de células de insecto (*Spodoptera frugiperda*) SF9 para generar baculovirus recombinante (ver el manual de instrucción de Invitrogen para detalles). Se recolectó el baculovirus posteriormente a partir del sobrenadante celular y se purificó por medio de ensayo de placa.

Se generó posteriormente proteína STEAP-1 recombinante mediante la infección de células de insecto HighFive (Invitrogen) con baculovirus purificado. Se puede detectar la proteína STEAP-1 recombinante utilizando un anticuerpo anti-STEAP-1 o anti -etiqueta-His. La proteína STEAP-1 puede purificarse y utilizarse en varios ensayos basados en células o como inmunógeno para generar anticuerpos policlonales y monoclonales específicos para STEAP-1.

Ejemplo 9:Perfiles de antigenicidad y estructura secundaria

Las Figuras 5(a)-9(a) y 5(b)-9(b) representan gráficamente cinco perfiles de aminoácido de las variantes 1 y 3 de STEAP-1 respectivamente, cada evaluación disponible por medio de acceso al sitio web ProtScale ubicado en la Red Mundial en (URL.expasy.ch/cgi-bin/protscale.pl) en el servidor de biología molecular ExPasy.

Estos perfiles: Figura 5 (a) y (b), hidrofilicidad, (Hopp T. P., Woods K.R., 1981. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78: 3824-3828); Figura 6 (a) y (b), hidropaticidad, (Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132); Figura 7 (a) y (b), Porcentaje de Residuos Accesibles (Janin J., 1979 Nature 277: 491-492); Figura 8 (a) y (b), Flexibilidad Promedio, (Bhaskaran R., y Ponnuswamy P.K., 1988. Int. J. Pept. Protein Res. 32: 242-255); Figura 9 (a) y (b), giro Beta (Deleage, G., Roux B. 1987 Protein Engineering 1:289-294); y opcionalmente otros disponibles en el estado de la técnica, tales como en el sitio web ProtScale, se utilizaron para identificar las regiones antigénicas de la proteína STEAP-1. Cada uno de los anteriores perfiles de aminoácido de STEAP-1 se generaron utilizando los siguientes parámetros de ProtScale para análisis: 1) Un tamaño de ventana de 9; 2) 100% peso de los extremos de ventana comparados con el centro de ventana; y, 3) valores normalizados de perfil aminoácido para caer entre 0 y 1.

Se utilizaron los perfiles de Hidrofilicidad (Figura 5 (a) y (b)), Hidropaticidad (Figura 6 (a) y (b)) y Porcentaje de residuos accesibles (Figura 7 (a) y (b)) para determinar los estiramientos de los aminoácidos hidrofílicos (esto es, valores mayores de 0.5 en la Hidrofilicidad y el perfil de porcentaje de residuos accesibles, y valores menores de 0.5 en el perfil de Hidropaticidad). Tales regiones probablemente son expuestas al ambiente acuoso, están presentes sobre la superficie de la proteína, y por lo tanto son disponibles para reconocimiento inmune, tal como por medio de anticuerpos.

Los perfiles de Flexibilidad promedio (Figura 8 (a) y (b)) y Giro beta (Figura 9 (a) y (b)) determinan estiramientos de aminoácidos (esto es, valores mayores de 0.5 en el de perfil Giro beta y el perfil de Flexibilidad promedio) que no son obligatorios en las estructuras secundarias tales como hojas beta y hélices alfa. Tales regiones también son más probablemente expuestas sobre la proteína y por lo tanto accesibles al reconocimiento inmune, tal como por medio de anticuerpos.

Las secuencias antigénicas de la proteína de STEAP-1 y de las proteínas variantes, indicaron por ejemplo, mediante los perfiles expuestos en la Figura 5 (a) y (b), Figura 6 (a) y (b), Figura 7 (a) y (b), Figura 8 (a) y (b), y/o Figura 9 (a) y (b) que son utilizados para preparar inmunógenos, bien sea peptidos o ácidos nucléicos para codificarlos, para generar anticuerpos de anti-STEAP- 1 terapéuticos y diagnósticos. El inmunógeno puede ser cualquiera de 5, 6, 7, 8,9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24,25, 30, 35, 40, 45, 50 o más de 50 aminoácidos contiguos, o los ácidos nucléicos correspondientes que los codifican, a partir de los variantes de Proteína STEAP-1 listados en las Figuras 2 y 3. En particular, los inmunógenos de peptido de la invención pueden comprender, una región de péptido de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0.5 en el perfil de Hidrofilicidad de la Figura 5 (a) y (b); una región de péptido de al menos 5 aminoácidos de Figuras 2 y 3 en cualquier incremento de número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor menor de 0.5 en el perfil de hidropaticidad de la Figura 6 (a) y (b) ; una región de péptido de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento del número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de .0.5 en el perfil de porcentaje de residuos accesibles de la Figura 7 (a) y (b); una región de péptido de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento del número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0.5 en el perfil de flexibilidad promedio en la Figura 8 (a) y (b); y, una región de péptido de al menos 5 aminoácidos de las Figuras 2 y 3 en cualquier incremento del número entero que incluya una posición de aminoácido que tenga un valor mayor de 0.5 en el perfil de giro beta de la Figura 9 (a) y (b). Los inmunógenos de péptido de la invención también pueden comprender ácidos nucléicos que codifiquen a cualquiera de los anteriores.

Todos los inmunógenos de la invención, péptido o ácido nucléico, pueden ser realizados en una forma de dosificación unitaria humana, o

comprendidos por una composición que incluya un excipiente farmacéutico compatible con la fisiología humana.

Se predijeron las estructura secundarias del variante 1 y el variante 3 de STEAP-1, especialmente la presencia y localización de hélices alfa, cadenas extendidas, y hélices aleatorias, a partir de las respectivas secuencias de aminoácidos primarias utilizando el método HNN - Hierarchical Neural Network (Guermeur, 1997, http: //pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_nn.html), accesado a partir del servidor de biología molecular ExPasy ubicado en la Red Mundial en (.expasy.ch/tools/). El análisis indicó que el variante 1 de STEAP-1 está compuesto de 64.60% de hélice alfa, 4.72% de cadena extendida, y 30.68% de hélice aleatoria (Figura 13a). El variante 2 de STEAP-1 está compuesto de 62.79% de hélice alfa, 3.10% de cadena extendida, y 34.11 % de hélice aleatoria (Figura 13b). El variante 3 de STEAP-1 está compuesto de 58.87% de hélice alfa, 5.32% de cadena extendida, y 35.82% de hélice aleatoria (Figura 13c).

Se llevó a cabo un análisis para la presencia potencial de dominios de transmembrana en los variantes de STEAP-1 utilizando una variedad de algoritmos de predicción transmembrana accesados a partir del servidor de biología molecular ExPasy localizado en la Red Mundial en (.expasy.ch/tools/). Se muestran gráficamente los resultados del análisis del variante 1 que representan la presencia y localización de 6 dominios de transmembrana utilizando el programa TMpred (Figura 13d) y el programa TMHMM (Figura 13e). También se muestran los resultados del análisis del variante 2 representando la presencia y localización de 4 dominios de transmembrana utilizando TMpred (Figura 13f) y 3 dominios de transmembrana utilizando TMHMM (Figura 13g). El análisis del variante 3 predijo la presencia de 4 dominios de transmembrana utilizando el TMpred (Figura 13h) y 3 dominios de transmembrana con TMHMM (Figura 13i). Los resultados de cada programa, especialmente los aminoácidos que codifican los dominios de transmembrana están resumidos en la Tabla XX.

Ejemplo 10: Generación de Anticuerpos policlonales de STEAP-1

Los anticuerpos policlonales pueden generarse en un mamífero, por ejemplo, mediante una o más inyecciones de un agente inmunizante y, si se desea, un adyuvante. Típicamente, el agente inmunizante y/o el adyuvante se inyectarán en el mamífero por medio de múltiples inyecciones subcutáneas o

intraperitoneales. Adicionalmente a la inmunización con un variante de proteína STEAP-1 completo, se emplean algoritmos de computadora en el diseño de inmunógenos que, con base en análisis de secuencia de aminoácidos contienen características de ser antigénicos y disponibles para reconocimiento por medio del sistema inmune del hospedero inmunizado (ver el Ejemplo titulado "Perfiles de antigenicidad y Estructura secundaria"). Se puede predecir que tales regiones sean hidrofílicas, flexibles, en conformaciones de giro beta, y expuestas sobre la superficie de la proteína (ver, por ejemplo, Figura 5 (a) y (b), Figura 6 (a) y (b), Figura 7(a) y (b), Figura 8 (a) y (b), y/o Figura 9 (a) y (b) para perfiles de aminoácido que indican tales regiones de los variantes 1 y 3 de proteína STEAP-1).

Por ejemplo, las proteínas o péptidos de fusión bacteriana recombinante que contienen regiones hidrofílicas, flexibles, de giro beta de variantes de proteína STEAP-1 son empleados como antígenos para generar anticuerpos policlonales en conejos Blancos de Nueva Zelandia o anticuerpos monoclonales tal como los descritos en el ejemplo titulado ("Generación anticuerpos monoclonales de STEAP-1 (MAbs). Por ejemplo, tales regiones incluyen, pero no están limitadas a, aminoácidos 1-40, aminoácidos 143-165, aminoácidos 180-220, de los variantes 1, 2, y 3 de STEAP-1, aminoácidos 312-339 de variante 1 de STEAP-1, y aminoácidos 250-282 del variante 3 STEAP-1. Es útil conjugar el agente inmunizante a una proteína que se sepa es inmunogénica en el mamífero a ser inmunizado. Ejemplos de tales proteínas inmunogénicas incluyen, pero no están limitados a, hemocianina de lapa californiana (KLH), albúmina de suero, tiroglobulina bovina, e inhibidor de tripsina de soya. En una realización, se conjugó un péptido que codifica a los aminoácidos 250-282 del variante 3 de STEAP- 1 a KLH. Este péptido se utiliza posteriormente como inmunógeno. Alternativamente, el agente inmunizante puede incluir el todo o porciones de la proteínas variantes de STEAP-1, análogos o proteínas de fusión del mismo. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos del variante 1 de STEAP-1 puede fusionarse utilizando técnicas de ADN recombinante a uno cualquiera de una variedad de colaboradores de proteínas de fusión que son bien conocidos en el estado de la técnica, tales como glutationa-S-transferasa (GST) y proteínas de fusión HIS etiquetadas. En otra realización, se fusionan los aminoácidos 250-282 de variante 1 de STEAP-1 a GST utilizando técnicas recombinantes y el vector de expresión pGEX, expresado, purificado y utilizado para inmunizar un conejo. Tales proteínas de fusión se purifican a partir de bacterias inducidas utilizando la matriz de afinidad apropiada.

Otras proteínas de fusión bacteriana recombinantes que pueden utilizarse incluyen la proteína enlazante a maltosa, LacZ, tioredoxina, NusA, o una región constante de inmunoglobulina (ver la sección titulada "Producción de STEAP-1 en Sistemas Procarióticos" y Current Protocols In molecular Biology, Volumen 2, Unidad 16, Frederick M. Ausubul et al.eds., 1995; Linsley, P. S., Brady, W. , Urnes, M. , Grosmaire, L. , Damle, N. , y Ledbetter, L. (1991) J.Exp.Med. 174, 561-566).

Adicionalmente a las proteínas de fusión derivadas de bacteria, también se utilizaron antígenos de proteína expresados por mamífero. Estos antígenos se expresan a partir de vectores de expresión mamífera tales como los vectores etiqueta5 y fusión Fc (ver la sección titulada "Producción de STEAP-1 Recombinante en Sistemas Eucarióticos"), y retienen modificaciones post-transduccionales tales como las glicosilaciones encontradas en la proteína nativa. En una realización, se clonaron los aminoácidos 185-218 del variante 1 de STEAP-1 dentro del vector de secreción mamífera de etiqueta5, y se expresaron en células 293T. Se purificó la proteína recombinante mediante cromatografía de quelato metálico a partir los sobenadantes del cultivo de tejido de células 293T que expresan establemente el vector recombinante. La proteína purificada de etiqueta 5 del variante 1 de STEAP-1 se utiliza posteriormente como inmunógeno.

Durante el protocolo de inmunización, es útil mezclar o emulsificar el antígeno en adyuvantes que potencian la respuesta inmune del animal hospedero. Ejemplos de adyuvantes incluyen, pero no están limitados a, adyuvante de Freund completo (CFA) y adyuvante MPL-TDM (monofosforil lípido A, dicorinomicolato de trehalosa sintético).

En un protocolo típico, los conejos inicialmente se inmunizan subcutáneamente con hasta 200 µg, típicamente 100-200 µg, de proteína de fusión o péptido conjugado a KLH mezclado en adyuvante de Freund completo (CFA). Posteriormente los conejos se inyectan subcutáneamente cada dos semanas con más de 200 µg, típicamente 100-200 µg, del inmunógeno en adyuvante de Freund incompleto (IFA). Se toman sangrados de prueba aproximadamente 7-10 días después de cada inmunización y se utilizan para monitorear el título del antisuero mediante ELISA.

Para evaluar la reactividad y espécificidad de suero inmune, tal como el suero de conejo derivado de inmunización con la GST de fusión de proteína del

variante 1 de STEAP-1, se clonó el cADN del variante 1 de STEAP-1 completo dentro del vector de expresión pCADN 3.1 myc-his (Invitrogen, ver el Ejemplo titulado "Producción de STEAP-1 Recombinante en Sistemas Eucarióticos"). Después de la transfección de los constructos en células 293T, se sondearon los lisados celulares con el suero anti-STEAP-1 y con anticuerpo anti-His (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA) para determinar la reactividad específica para proteína STEAP-1 desnaturalizada utilizando la técnica de mancha occidental. Adicionalmente, se evaluó el suero inmune mediante microscopía de fluorescencia, flujo citométrico e inmunoprecipitación contra 293T y otras células que expresan STEAP-1 recombinante para determinar el reconocimiento específico de la proteína nativa. También se llevaron a cabo las técnicas de mancha occidental, inmunoprecipitación, microscopía de fluorescencia, y flujo citométrico utilizando células que expresan endógenamente STEAP-1 para probar reactividad y especificidad.

Se purificó el anti-suero de conejos inmunizados con proteínas de fusión de variante STEAP-1, tales como las proteínas de fusión GST y MBP, por medio de agotamiento de anticuerpos reactivos a la secuencia compañera de fusión mediante su paso en una columna de afinidad que contiene el compañero de fusión bien sea solo o en el contexto de una proteína de fusión irrelevante. Por ejemplo, el antisuero derivado a partir de una proteína de fusión GST- STEAP-1 de variante 1 se purifica primero por medio de su paso en una columna de proteína GST unida covalentemente a matriz de AffiGel (BioRad, Hercules, Calif.). El antisuero se purifica posteriormente por afinidad por medio de su paso en una columna compuesta de una proteína de fusión MBP-STEAP-1 acoplada covalentemente a matriz de Affigel. El suero se purifica posteriormente mediante cromatografía de afinidad por proteína G para aislar la fracción IgG. Sueros de otros antígenos His-etiquetados y conejos péptido inmunizados así como también sueros agotados de compañero de fusión se purifican por afinidad mediante su paso sobre una columna de matriz compuesta del inmunógeno de proteína original o el péptido libre.

Ejemplo 11: Generación de Anticuerpos monoclonales de STEAP-1 (MAbs)

En una realización, los MAbs terapeúticos para variantes STEAP-1 comprenden aquellos que reaccionan con epítopos específicos por cada proteína variante o específicos para secuencias en común entre los variantes que pueden unir, internalizar, interrumpir o modular la función biológica de los variantes de STEAP-1, por ejemplo aquellos que pueden interrumpir la

interacción con ligandos y compañeros de unión. Los inmunógenos para la generación de tales MAbs incluyen aquellos diseñados para codificar o contener el dominio extracelular o la secuencia de variante de proteína STEAP-1 entera, regiones predichas para contener motivos funcionales, y regiones de los variantes de proteína STEAP-1 predichas para se antigénicas a partir del análisis por computadora de la secuencia de aminoácidos (ver, por ejemplo, Figura 5 (a)-(b), 6 (a)-(b), 7 (a)-(b), 8 (a)-(b), Figura 9 (a)-(b), y el ejemplo titulado "Perfiles de antigenicidad y Estructura secundaria"). Los inmunógenos incluyen péptidos, proteínas bacterianas recombinante, y proteínas de Etiqueta 5 expresadas por mamífero y proteínas de fusión IgG FC humano y murino. Adicionalmente, se utilizan la proteína ETIQUETAp5, vectores de ADN que codifican las de ETIQUETAp5 modificadas para expresar altos niveles de un variante de STEAP-1 respectivo, tales como las células de variante 1 293T-STEAP-1 o 3T3, RAT, o 300.19-STEAP-1 variante 1 murino Pre-B, para inmunizar ratones.

Para generar MAbs para variantes de STEAP-1, los ratones se inmunizan primero intraperitonealmente (IP) o en la almohadilla de la pata con, típicamente, 10-50 µg de inmunógeno de proteína o 10^7 células que expresan STEAP-1 mezcladas en adyuvante de Freund completo. Ejemplos de otros adyuvantes utilizados son Titermax (Sigma) e Immuneasy (Qiagen). Los ratones son entonces inmunizados posteriormente IP cada 2- 4 semanas con, típicamente, 10-50 µg de inmunógeno de proteína o 10^7 células mezcladas en adyuvante de Freund incompleto. Alternativamente, se utiliza adyuvante MPL-TDM en las inmunizaciones. Adicionalmente a las estratregias de inmunización basadas en proteína y célula anteriores, se empleó un protocolo de inmunización con base en ADN en el cual se utiliza un vector de expresión mamífera que codifica una secuencia de variante de STEAP-1 para inmunizar ratones por medio de inyección directa del ADN plásmido. Por ejemplo, se clonaron los aminoácidos 185-218 de STEAP-1 del variante 1 dentro del vector de secreción mamífera Etiqueta5 y el vector recombinante se utilizó como inmunógeno. En otro ejemplo, se clonaron los mismos aminoácidos dentro de un vector de secreción de fusión Fc en el cual la secuencia de variante 1 de STEAP-1 está unida en el amino terminal a una secuencia IgK líder y en el carboxilo terminal a la secuencia codificante de la región IgG Fc humana o murina. Este vector recombinante se utilizó posteriormente como inmunógeno. Los protocolos de inmunización de plásmido se utilizaron en combinación con proteínas purificadas expresadas a partir del mismo vector y con células que expresan el variante de STEAP-1 respectivo. En otro ejemplo, se generó un

anticuerpo monoclonal para variante 3 de STEAP-1 utilizando un péptido que codifica los aminoácidos 250-282. Se conjugó el péptido a KLH y se utilizó como inmunógeno. Se utilizó ELISA en péptido libre para identificar los clones inmunoreactivos. Se monitoreó la reactividad y especificidad de los anticuerpos monoclonales para proteína de variante 1 de STEAP-1 completa por medio de manchado occidental, inmunoprecipitación, y citometría de flujo utilizando bien sea células de variante 1 de STEAP-1 recombinantes y de expresión endógena.

Durante el protocolo de inmunización, se tomaron sangrados de prueba 7-10 días después de una inyección para monitorear el título y especificidad de la respuesta inmune. Una vez se obtiene una reactividad y especificidad apropiadas tal como se determina por medio de análisis de ELISA, manchado occidental, inmunoprecipitación, microscopía de fluorescencia, y flujo citométrico, se lleva a cabo posteriormente la fusión y generación de hibridoma con procedimientos establecidos bien conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Harlow y Lane, 1988).

Se determinó la afinidad enlazante de los anticuerpos monoclonales específicos de variante 1 de STEAP-1 utilizando tecnologías estándar. Las medidas de afinidad cuantifican la fuerza del enlace anticuerpo a epítopo y son empleadas para ayudar a definir cuales anticuerpos monoclonales de variante de STEAP-1 son preferidos para para uso diagnóstico o terapéutico, tal como se apreciaría por una persona versada en el estado de la técnica. El sistema BIAcore (Uppsala, Sweden) es un método preferido para la determinación de la afinidad enlazante. El sistema BIAcore utiliza resonancia de plasmón en superficie (SPR, Welford K. 1991, Opt. Quant. Elect. 23: 1; Morton y Myszka, 1998, Methods in Enzymology 295: 268) para monitorear interacciones biomoleculares en tiempo real. El análisis BIAcore genera convenientemente constantes de velocidad de asociación, constantes de velocidad de disociación, constantes de disociación de equilibrio, y constantes de afinidad.

Para generar anticuerpos monoclonales específicos para otros variantes de STEAP-1, se diseñan inmunógenos para codificar secuencias de aminoácidos únicas para los variantes. En una realización, se sintetizan péptidos que codifican aminoácidos únicos para variantes de STEAP-1, acoplados a KLH, y utilizados como inmunógenos. En otra realización, se hacen péptidos o proteínas de fusión bacteriana que abarcan la secuencia única generada mediante corte y empalme alternativo en los variantes. Posteriormente se seleccionan los hibridomas que reconozcan el antígeno

específico de variante respectivo y que reconozcan además la proteína de variante completa expresada en las células. Tal selección utiliza los inmunoensayos descritos anteriormente tales como manchado occidental, inmunoprecipitación, y citometría de flujo.

En una realización, la invención proporciona anticuerpos monoclonales designados X92.1.30.1.1(1) (a.k.a. M2/92.30) y X120.545.1.1 (a.k.a. M2.120.545). Se identificaron M2/92.30 y M2/120.545 y se muestra que reaccionan y se unen con la superficie celular de STEAP-1 (ver, Figuras 15 y 18). La Figura 16 muestra que el MAb anti-STEAP-1 M2/92.30 se une a la superficie celular endógena de STEAP-1 expresada en células de xenoinjerto de cáncer de vejiga y próstata. Adicionalmente, M2/92.30 reacciona y se une con STEAP-1 murino tal como se muestra en la Figura 17.

Los anticuerpos designados X92.1.30.1.1(1) (a.k.a. M2/92.30) y X120.545.1.1 (a.k.a. M2.120.545) se enviaron (vía Federal Express) a la American Type Culture Collection (ATCC) (Colección de Cultivos Tipo Americana), P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 en Febrero-6- 2004 y recibieron los números de Acceso PTA-5802 y PTA-5803 respectivamente.

Para clonar los anticuerpos M2/X92.30 y M2/X120.545 se utilizaron los siguientes protocolos. Se lisaron las células de hibridoma con reactivo de Trizol (Life Technologies, Gibco BRL). Se purificó y cuantificó el ARN total. Se generaron los cADNs de primera cadena a partir del ARN total con iniciador oligo (dT) 12-18 utilizando el sistema Gibco-BRL Superscript Preamplification. Se clonaron los productos de la PCR dentro del vector pCRScript (Stratagene, La Jolla). Se secuenciaron diversos clones y se determinaron las regiones de cadena pesada variable ("VH") y ligera variable ("VL"). Las secuencias de ácido nucléico y aminoácidos de las regiones de cadena pesada y ligera variables de M2/X92.30 y M2/X120.545 se listan en la Figura 19(a)-19(d) y la Figura 20(a)-(e).

Ejemplo 12: Caracterización de Anticuerpos de STEAP-1

A. Enlace a Superficie Celular

Se puede establecer la reactividad de los anticuerpos de STEAP-1 con una proteína relacionada con STEAP-1 mediante un número de medios bien conocidos, que incluyen los análisis de mancha occidental, inmunoprecipitación,

ELISA, y FACS utilizando, cuando sea apropiado, proteínas relacionadas con STEAP-1, células que expresan STEAP-1 o extractos de las mismas. Tal como se muestra en la Figura 15 el análisis FACS de células recombinantes 3T3 y Rat-1 que expresan establemente bien sea STEAP-1 o un control teñido con MAb M2/92.30 anti-STEAP (10 µg/ml) y MAb unido a superficie celular se detectó con un reactivo secundario conjugado de cabra anti-ratón IgG-PE. Las células teñidas se sometieron posteriormente a análisis FACS. Tal como se indicó mediante el desplazamiento de fluorescencia de las células Rat1-STEAP1 y 3T3-STEAP1 comparadas con las células de control respectivo, el M2/92.30 se enlaza específicamente al STEAP1 de superficie celular.

Adicionalmente, cuando las células de cáncer de vejiga UGB1 y las células de cáncer de próstata LAPC9 se tiñeron con 10 µg/ml de bien sea MAb M2/92.30 o con un MAb anti-KLH de control se detectó MAb 92.30 unido a superficie con Ab secundario conjugado de cabra-anti-ratón IgG-PE. Las células teñidas se sometieron posteriormente a análisis FACS. Estos resultados demostraron que el antiSTEAP1 MAb M2/92.30 enlaza específicamente superficie celular endógena de STEAP1 expresada en células de xenoinjerto de cáncer de vejiga y próstata (Figura 21).

También se mostró que el STEAP-1 M2/92.30 se une a la proteína STEAP-1 murina (ver Figura 17). En este experimento se transfectaron transitoriamente células 293T con bien sea pCADN3.1 que codifica el cADN STEAP1 murino o con un vector vacío. 48 horas más tarde, las células se cosecharon y tiñeron con anti-STEAP1 MAb M2/92.30 (10 µg/ml) y se detectó MAb 92.30 unido a superficie celular con un reactivo secundario conjugado de cabra anti-ratón IgG-PE. Las células se sometieron posteriormente a análisis FACS. Se mostró que STEAP-1 M2/92.30 enlaza específicamente a células 293T STEAP-1 expresadas.

También se mostró que STEAP-1 M2/120.545 enlaza específicamente a STEAP-1 (ver Figura 18). Se tiñeron células 3T3-neo (Panel A, histogramas llenados) y 3T3-STEAP1 (Panel A, histogramas no llenados) y células Rat1-neo (Panel B, histogramas llenados) y Rat1-STEAP (Panel B, histogramas no llenados) con MAb M2/120.545 (10 µg/ml) y se detectó MAb unido a superficie con Ab secundario conjugado cabra anti-ratón IgG-PE. Las células se sometieron posteriormente a análisis FACS. Tal como se indicó mediante el desplazamiento de la fluorescencia de las células 3T3-STEAP1 y Rat1-STEAP1 comparadas con sus respectivos neo controles, el MAb M2/120.545 enlaza

específicamente STEAP1 de superficie celular. En el panel C, se tiñeron células LNCaP con bien sea MAb M2/120.545 o un control MAb anti-KLH y se sometieron a análisis FACS tal como anteriormente. En el panel D, Microscopía de fluorescencia de las células LNCaP teñidas con M2/120.545 mostró fluorescencia de superficie celular brillante.

Se determinaron además la reactividad y especificidad de M2/92.30 y M2/120.545 por medio de inmunoprecipitación. La Figura 25 muestra que las células 3T3-STEAP1 y 3T3-neo se lisaron en solución amortiguadora RIPA (Tris-Cl 25mM pH 7.4; NaCl 150 mM, EDTA 0.5mM, Triton X-100 1%, ácido deoxicólico 0.5%, SDS 0.1 %, y coctel de inhibidor de proteasa). Los lisados celulares se preaclararon con perlas de proteína G sefarosa y se incubaron posteriormente con 5 µg de bien sea MAb M2/92.30 o M2/120.545 durante 2 horas a temperatura ambiente. Se adicionaron perlas de proteína G y la mezcla se incubó adicionalmente durante 1 hora. Se lavaron los complejos inmunes y se solubilizaron en muestra de solución amortiguadora SDS-PAGE. Las muestras solubilizadas se sometieron posteriormente a SDS-PAGE y análisis de mancha occidental utilizando un pAb anti-STEAP de conejo. Los lisados celulares completos de las células 293T transfectadas con STEAP1 también corrieron como un control positivo. Se observó una banda inmunoreactiva de ~37 kD únicamente en muestras derivadas a partir de células 3T3-STEAP1 indicativo de inmunoprecipitación específica de STEAP1 por ambos MAbs M2/92.30 y M2/120.545.

B. Internalización de Anticuerpo de STEAP-1

La inmunoterapia basada en la liberación de toxinas hacia objetivos celulares específicos utilizando anticuerpos monoclonales es considerada una modalidad en la terapia de malignidades. El principio general es la liberación de toxinas o fármacos antineoplásicos a células de cáncer con moléculas que se unen a antígenos o receptores que son bien sea únicamente expresados o sobre-expresados sobre las células objetivo en relación con los tejidos normales.

Las inmunotoxinas consisten de ligandos selectivos celulares (usualmente anticuerpos monoclonales o citocinas) unidos covalentemente a las toxinas. La interacción del anticuerpo o ligando con receptores de superficie celular desencadena la internalización. En compartimentos intracelulares vesiculares definidos, la molécula de toxina escapa hacia el citosol, donde

altera catalíticamente funciones celulares críticas conduciendo a la muerte celular. Ver, Frankel AE., Increased Sophistication of Inmunotoxins, *Clinicaal cancer research* 8: 942-944, (2002) y Allen TM, Ligand-Targeted Therapeutics in Anti-cancer Therapy. *Nature Reviews.* 2: 750-760, (2002).

La saporina es una proteína inactivante del ribosoma (RIP) que cataliza la depurinación *In vitro* de un residuo específico de adenina en ARNs ribosomales grandes. EndoY, *et. al.*, Mechanism of Action of the Toxin Lectin Ricin on Eukaryotic Cells; The Site and Characteristics of the Modification in 28S RNA Caused by the Toxin, *J. Biol. Chem.* 262,5908-5912, (1987). Usualmente no puede entrar a las células a menos que se compleje hacia una molécula portadora apropiada. La conjugación covalente de saporina a anticuerpos monoclonales que reconocen antígenos de tumor produce inmunotoxinas que poseen tanto selectividad celular por cáncer y son internalizadas. Ver, Flavell, DJ, Sapoin Inmunotoxins, *Curr. Top. Microbiol. Inmunol.* 234: 51-61, (1998) y Flavell DJ, *et. al.*, Therapy of Human T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia with a Combination of Anti-CD7 and Anti-CD38-Saporin Inmunotoxins Is Significantly Better than Therapy with Each Individual Inmunotoxins. *Br. J. Cáncer* 84: 571-578, (2001). Estas moléculas han entrado recientemente a ensayos de fase clínica I para leucemia y mieloma múltiple. Foon KA. Monoclonal Antibody Therapies for Lymphomas. *CáncerJ.* 6: 273-278, (2000).

La internalización de STEAP-1 M2/92.30 se muestra en la Figura 22. En este experimento, se tiñeron células PC3-STEAP1 a 4 grados C con MAb M2/120.545 (10 µg/ml), se lavaron, posteriormente se incubaron con Ab secundario conjugado cabra anti-ratón IgG-PE. Se llevó una mitad de las células hasta 37 grados C durante 30 minutos y la otra mitad permaneció a 4 grados C. Las células de cada tratamiento se sometieron posteriormente a microscopía fluorescente. Las células que permanecieron a 4 grados C mostraron una tinción brillante sobre la circunferencia de la superficie celular. Las células que se llevaron hasta 37 grados C mostraron pérdida de la tinción sobre la circunferencia celular y la aparición de fluorescencia puntuada y agregada es indicativa de encapsulamiento e internalización.

La Internalización de STEAP-1 por STEAP1 MAb M2/120.545 se muestra en la Figura 23. Las células de PC3-STEAP1 se tiñeron a 4C con MAb M2/120.545 (10 µg/ml), se lavaron, posteriormente se incubaron con Ab secundario conjugado cabra anti-ratón IgG-PE. Una mitad de las células se

llevó hasta 37C durante 30 minutos y la otra mitad se mantuvo a 4C. Las células de cada tratamiento se sometieron posteriormente a microscopía fluorescente. Las células que permanecieron a 4C mostraron fluorescencia de la superficie celular "tipo anillo" brillante. Las células que se llevaron hasta 37C mostraron pérdida de la fluorescencia de superficie celular "tipo anillo" y la aparición de fluorescencia puntuada y agregada es indicativa de encapsulamiento e internalización.

Un criterio para la selección de los candidatos a anticuerpo apropiados para liberación de inmunotoxina emplea la muerte con un anticuerpo secundario conjugado con una molécula de fármaco o toxina. El anticuerpo secundario conjugado se monta sobre el anticuerpo primario permitiendo la evaluación del anticuerpo primario para internalizar y llevar a compartimentos intracelulares apropiados. Una vez se internaliza el conjugado, la saporina se separa del agente de acceso e inactiva los ribosomas para eliminar las células objetivo. Kohls MD y Lappi DA. MAb-ZAP: A Tool for Evaluating Antibody Efficacy for Use in an Inmunotoxin. *Bio Techniques*. 28(1): 162-165 (2000).

Para seleccionar el candidato a anticuerpo apropiado utilizando el acercamiento anterior, una inmunotoxina secundaria, se utilizaron conjugados anti-ratón IgG - saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA) para demostrar que el Steap-1 M2/120.545 murino entra a las células objetivo vía expresión de Steap-1 sobre la superficie celular de célula LNCaP. Se utilizaron los siguientes protocolos. Se plaquearon células LNCap a 5000 células/90 µl /agujero en placa de 96 agujeros y se incubaron durante la noche. Se hicieron segundos conjugados de inmunotoxina (anti-ratón IgG-saporina y anti-cabra IgG-saporina) y anti-ratón IgG en medio celular que contiene la concentración final en 100 ng/ml. Se adicionaron 10 µl a cada agujero. Se adicionó el anticuerpo primario en la concentración de 1-1000 ng/ml. Las placas se incubaron 72 horas y se determinó la viabilidad por medio del ensayo de MTT. Los resultados en la Figura 24 muestran que las células LNCaP se murieron en la presencia de anti-ratón IgG-saporina. No se detectaron efectos con tanto el anticuerpo secundario solo (anti-ratón IgG) o conjugados de anticuerpo secundario no específico (anti-cabra IgG saporina). No se observó toxicidad con el anticuerpo primario solo (M2/120.545) probado hasta 1 µg/ml.

Ejemplo 13: Ensayos de enlace de HLA Clase I y Clase II

Se desarrollaron los ensayos de enlace de HLA clase I y clase II utilizando moléculas de HLA purificadas de acuerdo con los protocolos revelados (por ejemplo, las publicaciones PCT WO 94/20127 y WO 94/03205; Sidney *et al.*, *Current Protocols in Inmunology* 18.3.1 (1998); Sidney, *et al.*, *J. Inmunol.* 154: 247 (1995); Sette, *et al.*, *Mol. Inmunol.* 31: 813 (1994)). Brevemente, se incubaron moléculas purificadas de MHC (5 hasta 500 nM) con varios inhibidores de péptido no marcados y 1-10 nM de péptidos de sondeo ^{125}I-radiomarcados tal como se ha descrito. Después de la incubación, se separaron los complejos de MHC-péptido del péptido libre por medio de filtración en gel y se determinó la fracción de péptido enlazado. Típicamente, en experimentos preliminares, se tituló cada preparación de MHC en la presencia de cantidades fijas de péptidos radiomarcados para determinar la concentración de moléculas de HLA necesarias para enlazar del 10- 20% de la radioactividad total. Todos los ensayos de enlace directo e inhibición posteriors se desarrollaron utilizando estas concentraciones de HLA.

Dado que bajo estas condiciones [etiqueta]<[HLA] e $IC_{50}\geq$ [HLA], los valores de IC_{50} medidos son aproximaciones razonables de los valores de K_D verdaderos. Los inhibidores de péptido se evalúan típicamente a concentraciones en el rango de 120 µg/ml hasta 1.2 ng/ml, y se evalúan en dos a cuatro experimentos completamente independientes. Para permitir la comparación de los datos obtenidos en diferentes experimentos, se calculó una figura de enlace relativo para cada péptido dividiendo la IC_{50} de un control positivo para inhibición por la IC_{50} para cada péptido evaluado (típicamente versiones no marcadas del péptido de sondeo radiomarcado). Para propósitos de bases de datos, y comparaciones inter-experimento, se compilaron los valores de enlace relativo. Estos valores pueden convertirse posteriormente nuevamente en valores IC_{50} nM dividiendo la IC_{50} nM de los controles positivos para inhibición por el enlace relativo del péptido de interés. Este método de compilación de datos es exacto y consistente para comparación de péptidos que han sido probados en días diferentes, o con diferentes lotes de MHC purificado.

Los ensayos de enlace tal como se expusieron anteriormente pueden utilizarse para analizar supermotivo de HLA y/o péptidos que portan motivo de HLA (ver la Tabla IV).

Ejemplo 14: Construcción de Plásmidos de ADN "Minigen" Multi-Epítopo

Este ejemplo discute la construcción de un plásmido de expresión de minigen. Los plásmidos de minigen pueden, por su puesto, contener varias configuraciones de células B, epítopos CTL y/o HTL o análogos de epítopo tal como se han descrito aquí.

Un plásmido de expresión de minigen incluye típicamente múltiples epítopos de péptido de CTL y HTL. En el presente ejemplo, los epítopos de péptido que portan el supermotivo HLA-A2,-A3, -B7 y los epítopos de péptido que portan el motivo -A24 y HLA-A1 se utilizan en conjunto con epítopos que portan el supermotivo DR y/o epítopos DR3. Se seleccionan el supermotivo HLA de clase I o los epítopos de péptido que portan motivo derivados de STEAP-1, de tal forma que estén representados multiples supermotivos/motivos para asegurar amplio cubrimiento de la población. Similarmente, se seleccionan los epítopos HLA de clase II a partir de STEAP-1 para proporcionar amplio cubrimiento de población, esto es se seleccionan tanto los epítopos que portan supermotivo HLA DR-1-4-7 y epítopos que portan motivo HLA DR-3 para inclusión en el constructo del minigen. Los epítopos CTL y HTL seleccionados son posteriormente incorporados dentro de un minigen para expresión en un vector de expresión.

Tal constructo puede incluir adicionalmente secuencias que dirigen a los epítopos HTL hacia el retículo endoplasmático. Por ejemplo, la proteína Ii puede fusionarse a uno o más epítopos HTL tal como se describe en el estado de la técnica, en donde la secuencia CLIP de la proteína Ii se remueve y reemplaza con una secuencia de epítopo HLA de clase II de tal forma que el epítopo HLA de clase II se dirige hacia el retículo endoplasmático, donde el epítopo se enlaza a moléculas HLA de clase II.

Este ejemplo ilustra los métodos a ser utilizados para construcción de un plásmido de expresión que porta minigen. Otros vectores de expresión que pueden utilizarse para composiciones de minigen están disponibles y son conocidos por aquellos versados en la materia.

El plásmido de ADN de minigen de este ejemplo contiene una secuencia de consenso Kozak y una secuencia de consenso de señal de cadena ligera Ig kappa murina seguida por epítopos CTL y/o HTL seleccionados en concordancia con los principios aquí revelados. La secuencia codifica un marco

de lectura abierto unido a la etiqueta de epítopo de anticuerpo Myc e His codificada por el vector pcADN 3.1 Myc-His.

Se sintetizaron y purificaron por HPLC oligonucleótidos de superposición que pueden, por ejemplo, promediar aproximadamente 70 nucleótidos de longitud con superposición de 15 nucleótidos. Los oligonucleótidos codifican los epítopos de péptido seleccionados así como también los nucleótidos conectores apropiados, secuencia Kozak, y secuencia de señal. El minigen multiepítopo final se conforma por extensión de los oligonucleótidos de superposición en tres grupos de reacciones utilizando PCR. Se utilizó una máquina Perkin/Elmer 9600 PCR y se desarrolló un total de 30 ciclos utilizando las siguientes condiciones: 95° C durante 15 sec, temperatura de fijación (5° por debajo de la Tm calculada más baja de cada par iniciador) durante 30 sec, y 72° C durante 1 min.

Por ejemplo, se preparó un minigen tal como sigue. Para una primera reacción de PCR, 5 µg de cada uno de los dos oligonucleótidos se fijan y extiende: en un ejemplo utilizando ocho oligonucleótidos, esto es, cuatro pares de iniciadores, los oligonucleótidos 1+2, 3+4, 5+6, y 7+8 se combinan en 100 µl de reacciones que contienen solución amortiguadora de polimerasa *Pfu* (1x= KCL 10 mM, $(NH4)_2SO_4$ 10 mM, Tris-cloruro 20 mM, pH 8.75, $MgSO_4$ 2 mM, Triton X-100 0.1%, BSA 100 µg/ml), 0.25 mM de cada dNTP, y 2.5 U de polimerasa *Pfu*. Los productos dímero completos se purificaron en gel, y se mezclaron, fijaron y extendieron durante 10 ciclos dos reacciones que contienen el producto de 1+2 y 3+4, y el producto de 5+6 y 7+8. La mitad de las dos reacciones se mezcló posteriormente, y se llevaron a cabo 5 ciclos de fijación y extensión antes de se adicionaran iniciadores de flanqueo para amplificar el producto completo. El producto completo se purificó en gel y se clonó en pCR-blunt (Invitrogen) y se seleccionaron los clones individuales mediante secuenciamiento.

Ejemplo 15: El Constructo de Plásmido y el Grado al cual Induce Inmunogenoicidad.

El grado al cual un constructo de plásmido, por ejemplo un plásmido construído de acuerdo con el ejemplo previo, es capaz de inducir inmunogenoicidad se confirma *in vitro* mediante la determinación de la presentación de epítopo mediante APC después de la transducción o

transfección de APC con un constructo de ácido nucléico que expresa epítopo. Tal estudio determina "antigenicidad" y permite el uso de APC humano. El ensayo determina la capacidad del epítopo para ser presentado por el APC en un contexto que es reconocido por una célula T cuantificando la densidad de complejos epítopo-HLA de clase I sobre la superficie celular. La cuantitación puede desarrollarse midiendo directamente la cantidad de péptido eluido del APC (ver, por ejemplo, Sijts *et al., J. Inmunol.* 156:683-692,1996; Demotz *et al., Nature* 342:682-684,1989); o puede estimarse el número de complejos péptido-HLA de clase I mediante la medición de la cantidad de lisis o liberación de linfocina inducida por células objetivo enfermas o transfectadas, y determinando posteriormente la concentración de péptido necesaria para obtener niveles equivalentes de lisis o liberación de linfocina (ver, por ejemplo, Kageyama *et al., J. Inmunol.*154:567-576, 1995).

Alternativamente, se confirmó la inmunogenicidad a través de inyecciones *in vivo* en ratones y el posterior aseguramiento *in vitro* de actividad CTL y HTL, los cuales se analizaron utilizando ensayos de citotoxicidad y proliferación, respectivamente, tal como se detalla por ejemplo, en Alexander *et al., Immunity* 1:751-761,1994.

Por ejemplo, para confirmar la capacidad de un constructo de minigen de ADN que contiene al menos un péptido de supermotivo HLA-A2 para inducir CTLs *in vivo*, ratones transgénicos HLA-A2.1/K^b, por ejemplo, se inmunizan intramuscularmente con 100 µg de cADN desnudo. Como un medio para comparar el nivel de CTLs inducida mediante inmunización de cADN, también se inmunizó un grupo de animales de control con una composición de péptido real que comprende múltiples epítopos sintetizados como un polipéptido sencillo de tal forma que puede ser codificada por el minigen.

Se estimularon dos veces esplenocitos de animales inmunizados con cada una de las composiciones respectiva (epítopos de péptido codificados en el minigen o el péptido poliepitópico), ensayados posteriormente para actividad citotóxica de péptido específico en un ensayo de liberación de ^{51}Cr. Los resultados indican la magnitud de la respuesta CTL dirigida contra el epítopo A2-restringido, indicando por lo tanto la inmunogenoicidad *in vivo* de la vacuna de minigen y la vacuna poliepitópica.

Por lo tanto, se encontró que el minigen provoca la respuesta inmune dirigida hacia los epítopos de péptido del supermotivo HLA-A2 tal como lo hace

la vacuna poliepitópica. También se desarrolló un análisis similar utilizando otros modelos de ratón transgénico HLA-A3 y HLA-B7 para asegurar la inducción de CTL mediante los epítopos motivo o supermotivo HLA-A3 y HLA-B7, por el cual también se encontró que el minigen provoca respuestas inmunes apropiadas dirigidas hacia los epítopos proporcionados.

Para confirmar la capacidad de un minigen codificante de epítopo clase II para inducir HTLs *in vivo*, se inmunizaron intramuscularmente con 100 µg de ADN de plásmido, ratones transgénicos DR, o para aquellos epítopos que reaccionan en cruce con la molécula MHC apropiada de ratón, ratones I-Ab-restringidos, por ejemplo. Como un medio de comparación del nivel de HTLs inducido mediante inmunización de ADN, un grupo de animales de control también se inmunizó con una composición de péptido real emulsificada en adyuvante de Freund completo. Se purificaron las células CD4+ T, esto es HTLs, de esplenocitos de animales inmunizados y se estimularon con cada una de las composiciones respectivas (péptidos codificados en el minigen). Se midió la respuesta HTL utilizando un ensayo de proliferación de incorporación de ^{3}H-timidina, (ver, por ejemplo, Alexander *et al.* Immunity 1:751-761, 1994). Los resultados indican la magnitud de la respuesta HTL, demostrando se este modo la inmunogenoicidad *in vivo* del minigen.

Los minigenes de ADN, construídos tal como se ha descrito en el ejemplo previo, también pueden confirmarse como un vacuna en combinación con agente reforzante utilizando un protocolo de iniciador de refuerzo. El agente reforzante puede consistir de proteína recombinante (por ejemplo, Barnett *et al., Aids Res. and Human Retroviruses* 14, Suplemento 3:S299-S309, 1998) o vaccinia recombinantes, por ejemplo, que expresan un minigen o ADN que codifica la proteína completa de interés (ver, por ejemplo, Hanke *et al, Vaccine* 16: 439- 445,1998; Sedegah *et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA* 95:7648-53, 1998; Hanke y McMichael, *Inmunol. Letters* 66:177- 181, 1999; y Robinson *et al., Nature Med.* 5:526-34, 1999).

Por ejemplo, se evaluó inicialmente la eficacia del minigen de ADN utilizado en un protocolo de sensibilización-refuerzo en ratones transgénicos. En este ejemplo, se inmunizaron IM ratones transgénicos A2.1/K^{b} con 100 µg de un minigen de ADN que codifica los péptidos inmunogénicos incluyendo al menos un péptido que porta supermotivo HLA-A2. Después de un periodo de incubación (en el rango de 3-9 semanas), los ratones se reforzaron IP con 10^{7} pfu/ratón de un virus vaccinia recombinante que expresa la misma secuencia

codificada por el minigen de ADN. Se inmunizaron ratones de control con 100 µg de ADN o vaccinia recombinante sin la secuencia de minigen, o con ADN que codifica el minigen, pero sin el refuerzo de vaccinia. Después de un periodo de incubación adicional de dos semanas, los esplenocitos de los ratones se ensayaron inmediatamente para actividad de péptido específico en un ensayo ELISPOT. Adicionalmente, los esplenocitos se estimularon *in vitro* con los epítopos de péptido A2-restingido codificados en el minigen y vaccinia recombinante, ensayados posteriormente para actividad de péptido específico en una IFN ELISA alfa, beta y/o gama.

Se encontró que el minigen utilizado en un protocolo de sensibilización-refuerzo provoca respuestas inmunes mayores hacia los péptidos de supermotivo HLA-A2 que con ADN solo. Tal análisis puede ser desarollado también utilizando modelos de ratón transgénico HLA-A11 o HLA-B7 para asegurar la inducción de CTL mediante epítopos de motivo o supermotivo HLA-A3 o HLA-B7. El uso de protocolos de sensibilización-refuerzo en humanos está descrito más abajo en el ejemplo titulado "Inducción de Respuestas de CTL Utilizando un Protocolo de Sensibilización-Refuerzo."

Ejemplo 16: Composiciones de Vacuna Polepitópica a partir de Múltiples Antígenos

Se utilizaron los epítopos de péptido de STEAP-1 de la presente invención en conjunto con epítopos de otros antígenos objetivo asociados a tumor, para crear una composición de vacuna que es útil para la prevención o tratamiento de cáncer que expresa STEAP-1 y tales otros antígenos. Por ejemplo, una composición de vacuna puede ser proporcionada como un polipéptido sencillo que incorpora múltiples epítopos a partir de STEAP-1 así como también antígenos asociados a tumor que a menudo se expresan con un cáncer objetico asociado con expresión de STEAP-1, o puede administrarse como una composición que comprende un coctel de uno o más epítopos discretos. Alternativamente, la vacuna puede administrarse como un constructo de minigen o como células dendríticas las cuales han sido cargadas con los epítopos de péptido *in vitro*.

Ejemplo 17: Uso de péptidos para evaluar una respuesta inmune

Pueden utilizarse péptidos de la invención para analizar una respuesta inmune por la presencia de anticuerpos específicos, CTL o HTL dirigidos a STEAP-1. Tal análisis puede desarrollarse de la manera descrita por Ogg *et al., Science* 279:2103-2106,1998. En este Ejemplo, se utilizaron péptidos de acuerdo con la invención como un reactivo para propósitos de diagnóstico o pronóstico, no como un inmunógeno.

En este ejemplo se utilizaron complejos tetraméricos de antígeno de leucocito humano altamente sensibles ("tetrámeros") para un análisis de sección cruzada de, por ejemplo, frecuencias de CTL STEAP-1 HLA-A*0201-específico a partir de individuos HLA A*0201-positivos en diferentes etapas de enfermedad o después de inmunización que comprende un péptido de STEAP-1 que contiene un motivo A*0201. Los complejos tetraméricos se sintetizaron tal como se describe (Musey *et al., N. Engl. J. Med.* 337:1267,1997). Brevemente, se sintetizaron cadena pesada purificada de HLA (A*0201 en este ejemplo) y β2-microglobulina por medio de un sistema de expresión procariótico. Se modificó la cadena pesada mediante eliminación de la cola citosólica de transmembrana y adición COOH-terminal de una secuencia que contiene un sitio de biotinilación enzimática BirA. La cadena pesada, β2-microglobulina, y el péptido se redoblan mediante dilución. Se aisló el prodcuto redoblado de 45-kD por medio de cromatografía líquida de proteína rápida y posteriormente se biotiniló mediante BirA en la presencia de biotina (Sigma, St. Louis, Missouri), adenosin 5' trifosfato y magnesio. Se adicionó conjugado de estreptavidina-ficoeritrina en una proporción molar 1:4, y el producto tetramérico se concentró hasta 1 mg/ml. El producto resultante es referido como un tetrámero-ficoeritrina.

Para el análisis de muestras de sangre de paciente, se centrifugaron aproximadamente un millón de PBMCs a 300g durante 5 minutos y se resuspendieron en 50 µl de solución salina amortiguada de fosfato fría. Se desarrolló un análisis tri-color con el tetrámero-ficoeritrina, junto con anti-CD8-Tricolor, y anti-CD38. Se incubaron los PBMCs con tetrámero y anticuerpos en hielo durante 30 a 60 min y se lavaron posteriormente dos veces antes de fijación con formaldehído. Se aplicaron entradas para contener >99.98% de las muestras de control. Los controles para los tetrámeros incluyen tanto individuos A*0201-negativos y donores no enfermos A*0201-positivos. El porcentaje de células teñidas con el tetrámero se determinó posteriormente mediante citometría de flujo. Los resultados indican el número de células en la muestra de PBMC que contiene CTLs epítopo-restringido, indicando de este modo

fácilmente el grado de respuesta inmune al epítopo de STEAP-1, y por lo tanto el estatus de exposición a STEAP-1, o exposición a una vacuna que provoca una respuesta protectora terapéutica.

Ejemplo 18: Inducción de Respuestas Inmunes Utilizando un Protocolo de Sensibilización-Refuerzo

Un protocolo de sensibilización-refuerzo similar en su principio subyacente al utilizado para confirmar la eficacia de una vacuna de ADN en ratones transgénicos, tal como el descrito anteriormente en el ejemplo titulado "El Constructo de Plásmido y el Grado al cual Induce Inmunogenoicidad," también puede utilizarse para la administración de la vacuna a humanos. Tal régimen de vacuna puede incluir una administración inicial de, por ejemplo, ADN desnudo seguido por un refuerzo utilizando virus recombinante que codifica la vacuna, o proteína/polipéptido recombinante o una mezcla de péptido administrada en un adyuvante.

Por ejemplo, la inmunización inicial puede desarrollarse utilizando un vector de expresión, tal como el construido en el ejemplo titulado "Construcción de Plásmidos de ADN "Minigen" Multi-Epítopo" en la forma de ácido nucléico desnudo administrado IM (o SC o ID) en las cantidades de 0.5-5 mg en múltiples sitios. También puede administrarse el ácido nucléico (0.1 hasta µ1000 g) utilizando un arma de gen. Después de un periodo de incubación de 3-4 semanas, se administró posteriormente una dosis reforzador. El reforzador puede ser un virus de viruela de las aves de corral recombinante administrado en una dosis de $5\text{-}10^7$ hasta $5x10^9$ pfu. También puede utilizarse para el reforzador un virus recombinante alternativo, tal como un MVA, canaripox, adenovirus, o un virus adeno asociado, o puede administrarse la proteína poliepitópica o una mezcla de los péptidos. Para la evaluación de la eficacia de la vacuna, se obtuvieron muestras de sangre de paciente antes de la inmunización así como también a intervalos después de la administración de la vacuna inicial y dosis de reforzador de la vacuna. Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de sangre heparinizada fresca mediante centrifugación con gradiente de densidad Ficoll-Hypaque, se alicuotó en medio de congelamientos y se almacenaron congeladas. Se ensayaron las muestras para actividad CTL y HTL.

El análisis de los resultados indica que se generó una magnitud de respuesta suficiente para alcanzar una inmunidad terapéutica o protectora conta STEAP-1.

Ejemplo 19: Polinucleótidos complementarios

Se utilizaron secuencias complementarias a las secuencias codificantes de STEAP-1, o cualquier parte de las mismas, para detectar, disminuir, o inhibir la expresión del STEAP-1 que ocurre naturalmente. Si bien se ha descrito el uso de oligonucleótidos que comprenden desde aproximadamente 15 hasta 30 pares de bases, se utiliza esencialmente el mismo procedimiento con fragmentos de secuencia más pequeños o más grandes. Se diseñaron los oligonucleótidos apropiados utilizando, por ejemplo, software OLIGO 4.06 (National Biosciences) y la secuencia codificante de STEAP-1. Para inhibir la transcripción, se diseñó un oligonucleótido complementario a partir de la secuencia única mayor 5' y se utilizó para prevenir el enlace del promotor a la secuencia codificante. Para inhibir la traducción, se diseñó un oligonucleótido complementario para prevenir el enlace ribosomal a un transcripto codificante de STEAP-1.

Ejemplo 20: Purificación de STEAP-1 que occurre Naturalmente o Recombinante Utilizando Anticuerpos Específicos de STEAP-1

Se purificó sustancialmente el STEAP-1 que occurre naturalmente o recombinante mediante cromatografía de inmunoafinidad utilizando anticuerpos específicos para STEAP-1. Se construyó una columna de inmunoafinidad acoplando covalentemente anticuerpo anti-STEAP-1 a una resina cromatográfica activada, tal como SEPHAROSA CNBr-activa (Amersham Pharmacia Biotech). Después del acoplamiento la resina se bloqueó y lavó, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Se pasó medio que contiene STEAP-1 sobre la columna de inmunoafinidad, y la columna se lavó bajo condiciones que permiten la absorbancia preferencial de STEAP-1 (por ejemplo, soluciones amortiguadoras de fuerza iónica alta en presencia de detergente). Se eluyó la columna bajo condiciones que interrumpen el enlace anticuerpo/STEAP-1 (por ejemplo, una solución amortiguadora de pH 2 a pH 3, o una concentración alta de un caotropo, tal como la urea o el ion tiocianato), y se recolectó GCR. P.

Ejemplo 21: Identificación de Moléculas que Interactúan con STEAP-1

Se marcó STEAP-1, o fragmentos biológicamente activos del mismo, con reactivo Bolton-Hunter 121 1. (ver, por ejemplo, Bolton *et al.* (1973) Biochem. J. 133: 529.) Se incubaron las moléculas candidato previamente organizadas en los agujeros de una placa multi-agujero con el STEAP-1 marcado, se lavaron, y se ensayó cualquier agujero con complejo STEAP-1 marcado. Se emplearon los datos obtenidos utilizando diferentes concentraciones de STEAP-1 para calcular valores para el número, afinidad, y asociación de STEAP-1 con las moléculas candidato.

Ejemplo 22: Ensayo *In Vivo* para Promoción de crecimiento de Tumor de STEAP-1

Se evaluó el efecto de la Proteína STEAP-1 sobre el crecimiento de tumor celular *in vivo* mediante la evaluación del desarrollo del tumor y crecimiento de las células que expresan o carecen de STEAP-1. Por ejemplo, se inyectaron subcutáneamente ratones SCID en cada flanco con 1 x 10^6 de bien sea 3T3, o líneas celulares de cáncer próstata (por ejemplo células PC3) que contienen un vector vacío tkNeo o STEAP-1. Pueden utilizarse al menos dos estrategias puede: (1) Expresión de STEAP-1 constitutiva bajo regulación de un promotor tal como un promotor constitutivo obtenido a partir de genomas de virus tales como virus de poliorna, virus de vierual de aves de corral (UK 2,211,504 publicada el 5 de Julio de 1989), adenovirus (tal como el Adenovirus 2), virus de papiloma bovino, virus de sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis-B y Virus Simian 40 (SV40), o a partir de promotores mamíferos heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedera, y (2) Expresión regulada bajo el control de un sistema de vector inducible, tal como ecdisona, tetraciclina, etc. , con la condición de que tales promotores sean compatibles con los sistemas de célula hospedera. Se monitoreó posteriormente el volumen del tumor calibrando la medida en la aparición de tumores palpables y se siguió durante el tiempo para determinar si las células que expresan STEAP-1 crecen

a una velocidad más rápida y si los tumores producidos por las células que expresan STEAP-1 demuestran características de agresividad alterada (por ejemplo metástasis realzada, vascularización, respuesta reducida a fármacos quimoterapéuticos).

Adicionalmente, se pueden implantar los ratones 1 x 10^5 de las mismas células ortotópicamente para determinar si STEAP-1 tiene un efecto sobre el crecimiento local e la próstata, y si STEAP-1 afecta la capacidad de las células para hacer metástasis, específicamente hacia los nudos linfáticos, y el hueso (Miki T et al, Oncol Res. 2001;12:209; Fu X et al, Int J Cancer. 1991, 49:938). Puede evaluarse el efecto de STEAP sobre la formación y crecimiento de tumor óseo mediante la inyección de células de tumor de próstata intratibialmente.

El ensayo también es útil para determinar efecto inhibidor STEAP-1 de composiciones terapéuticas candidatas, tales como por ejemplo, intracuerpos de STEAP-1, moléculas no codificantes de STEAP-1 y ribozomas.

Ejemplo 23: Inhibición de Tumores *In Vivo* mediada por Anticuerpo Monoclonal de STEAP-1

La expresión significativa de STEAP-1 en tejidos cáncer y localización superficial, junto con su expresión restrictiva en tejidos normal hace de STEAP-1 un buen objetivo para terapia de anticuerpo. Similarmente, STEAP-1 es un objetivo para inmunoterapia basda en células T. Por lo tanto, se evaluó la eficacia terapéutica de MAbs anti-STEAP-1 en modelos de ratón de xenoinjerto de cáncer de próstata humana utilizando líneas celulares recombinantes tales como PC3-STEAP-1, y 3T3-STEAP-1 (ver, por ejemplo, Kaighn, M.E., *et al.*, Invest Urol, 1979. 17 (1): 16-23), así como también modelos de xenoinjerto de próstata humana tales como LAPC 9AD (Saffran et al PNAS1999, 10:1073-1078).

Se estudió la eficacia de anticuerpo sobre crecimiento de tumor y formación de metástasis, por ejemplo, en modelos de xenoinjerto de cáncer de próstata ortotópico de ratón. Los anticuerpos pueden ser no conjugados, tal como se discutió en este Ejemplo, o pueden conjugarse a una modalidad terapéutica, tal como se ha apreciado en el estado de la técnica. Los MAbs anti-STEAP-1 inhiben la formación de ambos xenoinjertos de pulmón y próstata. Los MAbs anti-STEAP-1 también retardan el crecimiento de tumores ortotópicos

establecido y prolongaron la supervivencia de ratones portadores de tumor. Estos resultados indican la utilidad de MAbs anti-STEAP-1 en el tratamiento de etapas locales y avanzadas de cáncer de próstata. (ver, por ejemplo, Saffran, D., et al., PNAS 10: 1073-1078 o la URL de la Red Mundial pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.051624698).

La administración de MAbs anti-STEAP-1 condujo al retardo del crecimiento de tumor ortotópico establecido y la inhibición de metástasis hacia sitios distantes, resultando en una prolongación significativa en la supervivencia de ratones portadores de tumor. Estos estudios indican que STEAP-1 es un objetivo atractivo para inmunoterapia y demuestra el potencial terapéutico de los MAbs anti-STEAP-1 para el tratamiento de cáncer de próstata local y metástico. Este ejemplo demostró que los anticuerpos monoclonales de STEAP-1 no conjugados son efectivos para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de tumor de próstata humana crecidos en ratones SCID; de conformidad con lo anterior una combinación de tales anticuerpos monoclonales eficaces también es efectiva.

Inhibición de Tumor utilizando MAbs STEAP-1 no conjugado múltiples

Materiales y Métodos

Anticuerpos monoclonales de STEAP-1:

Se crearon anticuerpos monoclonales contra STEAP-1 tal como se describió en el ejemplo titulado "Generación de Anticuerpos monoclonales de STEAP-1 (MAbs)." Los anticuerpos se caracterizaron por medio de ELISA, mancha occidental, FACS, e inmunoprecipitación por su capacidad para enlazar STEAP-1. Los datos de mapeo de epítopo para los MAbs de anti-STEAP-1, tal como se determinaron por medio de ELISA y análisis occidental, reconocen epítopos sobre la proteína de STEAP-1. Se desarrolló análisis inmunohistoquímico de tejidos de cáncer de próstata y células con estos anticuerpos.

Los anticuerpos monoclonales se purificaron a partir de sobrenadantes de cultivo de tejido de ascitis o hibridoma mediante cromatografía de proteína-G sefarosa, se dializaron contra PBS, se filtraron esterilizados, y se almacenaron a -20° C. Se desarrollaron las determinaciones de proteína mediante un ensayo de Bradford (Bio-Rad, Hercules, CA). Se preparó un anticuerpo monoclonal

terapéutico o un coctel que comprende una mezcla de anticuerpos monoclonales individuales y se utilizó para el tratamiento de ratones que reciben inyecciones subcutáneas u ortotópicas de xenoinjertos de tumor UM-UC3 y CaLu1.

Líneas celulares y Xenoinjertos

Se mantuvieron las líneas celulares de cáncer de próstata, PC3 y línea celular LNCaP así como también la línea de fibroblasto NIH 3T3 (American Type Culture Collection) en RPMI y DMEM respectivamente, complementadas con L-glutamina y FBS 10%.

Se generaron poblaciones celulares PC3-STEAP-1 y 3T3-STEAP-1 mediante transferencia de gen retroviral tal como se describe en Hubert, R. S., et al., Proc Natl Acad SciUSA, 1999. 96(25): 14523.

Se pasó el xenoinjerto LAPC-9, el cual expresa un receptor andrógeno de tipo nativo y produce un antígeno específico de próstata (PSA), en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (SCID)-ICR machos de 6 a 8 semanas de edad (Taconic Farms) mediante implante trocar s.c. (Craft, N., et al., Nat Med. 1999, 5:280). Se prepararon suspensiones de célula sencilla de células de tumor LAPC-9 tal como se describió en Craft, et al.

Modelos de Xenoinjerto de Ratón.

Se generaron tumores subcutáneos (s. c.) mediante inyección de 1 x 10^6 células de cáncer mezcladas en una dilución 1:1 con Matrigel (Collaborative Research) en el flanco derecho de ratones SCID machos. Para probar la eficacia del anticuerpo en la formación de tumor, i.e. las inyecciones de anticuerpo comenzaron en el mismo día que las inyecciones tumor-célula. Como un control, los ratones se inyectan con tanto IgG (ICN) de ratón purificado o PBS; o un anticuerpo monoclonal purificado que reconoce un antígeno irrelevante no expresado en células humanas. En estudios preliminares, no se encontró diferencia entre ratón IgG o PBS en crecimiento de tumor. Se determinan los tamaños de tumor mediante medidas de calibre, y volumen de tumor se calcula como longitud x profundidad x altura. Se sacrificaron los ratones con tumores subcutáneos mayores de 1.5 cm de diámetro.

Se realizaron inyecciones ortotópicas bajo anestesia utilizando cetamina/xilazina. Para estudio ortotópicos de próstata, se hace una incisión a través del abdomen para exponer la próstata y se inyectan células de tumor LAPC o PC3 (5×10^5) mezcladas con Matrigel dentro de la cápsula de próstata en un volumen de 10- µl. Para monitorear el crecimiento de tumor, se palparon los ratones y se recolectó sangre en una base semanal para medir los niveles de PSA. Los ratones se separan en grupos para los tratamientos apropiados, con anti- STEAP-1 o MAbs de control que se inyectan i.p.

Los MAbs de Anti-STEAP-1 Inhiben el crecimiento de STEAP-1 que expresa Tumores de Xenoinjerto de Cáncer

Se evaluó el efecto de MAbs anti-STEAP-1 sobre la formación de tumor utilizando modelos ortotópicos LNCaP y LAPC9. Comparado con el modelo de tumor s. c., el modelo ortotópico, el cual requiere inyección de células de tumor directamente en la próstata del ratón, respectivamente, resulta en un crecimiento de tumor local, desarrollo de metástasis en sitios distales, deterioro de la salud del ratón, y muerte posterior (Saffran, D., et al., PNAS supra). Las características hacen del modelo ortotópico más representativo del progreso de enfermedad humana y nos permite seguir el efecto terapéutico de MAbs en puntos finales clínicamente relevantes.

De acuerdo con lo anterior, se inyectaron células de tumor dentro de la próstata de ratón, y 2 días después, los ratones son separados en dos grupos y tratados con bien sea: a)200-500 µg, de Ab anti-STEAP-1, o b) PBS tres veces por semana durante dos a cinco semanas.

Una ventaja mayor de los modelos de cáncer ortotópico es la capacidad para estudiar el desarrollo de metástasis. La formación de metástasis en ratones que portan tumores ortotópicos establecidos se estudió mediante análisis IHC en secciones de pulmón utilizando un anticuerpo contra una proteína de superficie celular específica de tumor tal como anti-CK20 para cáncer de próstata (Lin S et al, Cancer Detect Prev. 2001;25:202).

Otra ventaja de los modelos de xenoinjerto de cáncer es la capacidad para estudiar la neovascularización y la angiogénesis. El crecimiento de tumor es partcialmente dependiente del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos. Si bien el sistema capilar y el desarrollo de la red sanguínea son de origen del hospedero, la iniciación y arquitectura de la neovasculatura está regulada por el

tumor de xenoinjerto (Davidoff AM et al, Clin Cancer Res. 2001; 7:2870; Solesvik O et al Eur J Cancer Clin Oncol. 1984, 20: 1295). Se estudió el efecto de anticuerpo y molécula pequeña sobre la neovascularización de acuerdo con los procedimientos conocidos en el estado de la técnica, tal como por medio de análisis IHC de tejidos de tumor y su microambiente circundante.

Se administran a los ratones que portan tumores ortotópicos inyecciones de 1000 µg de bien sea MAb anti-STEAP-1 o PBS durante un periodo de 4-semanas. Se permitió a los ratones en ambos grupos establecer una carga de tumor alta, para asegurar una alta frecuencia de formación de metástasis en los pulmones de ratón. Posteriormente los ratones son asesinados y sus vejigas, hígados, huesos y pulmones son analizados para la presencia de células de tumor mediante análisis IHC. Estos estudios demostraron una amplia eficacia anti-tumor de anticuerpos anti-STEAP-1 en la iniciación y progreso de cáncer de próstata en modelos xenoinjerto de ratón. Los anticuerpos de anti-STEAP-1 inhiben la formación de tumor de tumores así como también el retardo de crecimiento de tumores ya establecidos y prolongan la supervivencia de los ratones tratados. Más aún, los Mabs de anti-STEAP-1 demostraron un efecto inhibitorio dramático en la extensión del tumor de próstata local hacia sitios distales, aún en presencia de una gran carga de tumor. Por lo tanto, los MAbs de anti-STEAP-1 son eficaces en los puntos finales clínicamente relevantes principales (crecimiento de tumor), prolongación de supervivencia, y salud.

Efecto de los MAbs de STEAP-1 en el crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Humano en ratones

Se utiliaron ratones ICR-SCID machos, de 5-6 semanas de edad (Charles River Laboratory, Wilmington, MA. Los ratones se mantuvieron en un ambiente controlado utilizando los protocolos expuestos en el *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. Se utilizó un tumor cáncer de próstata humano dependiente de andrógeno LAPC-9AD para establecer modelos de xenoinjerto. Tumores almacenados y mantenidos regularmente en ratones SCID se disecaron estérilmente, se picaron, y digirieron utilizando Pronasa (Calbiochem, San Diego, CA). Se incubaron las suspensiones celulares generadas durante la noche a 37 grados C para obtener una suspensión celular sencilla homogénea.

Se evaluaron STEAP-1 M2/92.30 y M2/120.545 en dos dosis diferentes de 100 µg y 500 µg. Se utilizaron PBS y MAb anti-KLH como controles. El

estudio cohorte consistió de 6 grupos con 10 ratones en cada grupo. Los MAbs se dosificaron IP dos veces a la semana para un total de 12 dosis, comenzando el mismo día de la inyección de tumor celular.

Se monitoreó el tamaño de tumor a través de medidas de calibre dos veces por semana. Se tomaron la dimensión más larga (L) y la dimensión perpendicular a ella (W) para calcular el volumen del tumor utilizando la fórmula: $W^2 \times L/2$. Se midió la concentración de suero PSA en el día 40 del tratamiento para cada animal utilizando un kit de ELISA comercial. Se utilizaron la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney para evaluar las diferencias de crecimiento de tumor y el nivel de PSA entre los grupos. Todas las pruebas tuvieron dos aspectos con α=0.05.

Los resultados del experimento expuestos en la Figura 26 y Figura 27 muestran que STEAP-1 M2/92.30 y M2/120.545 retardan significativamente el crecimiento de xenoinjerto de próstata humana en una manera dependiente de dosis.

Ejemplo 24: Uso Terapéutico y Diagnóstico de Anticuerpos de Anti-STEAP-1 en Humanos.

Se utilizaron anticuerpos monoclonales de anti-STEAP-1 segura y efectivamente para propósitos diagnósticos, profilácticos, pronósticos y/o terapéuticos en humanos. Los análisis de mancha occidental e inmunohistoquímica de tejidos de cáncer y xenoinjertos de cáncer con MAb de anti-STEAP-1 mostraron una tinción extensiva fuerte en carcinoma pero significativamente inferior o niveles indetectables en tejidos normales. La detección de STEAP-1 en carcinoma y en enfermedad metástica demuestra la utilidad de MAb como un indicador diagnóstico y/o pronóstico. Por lo tanto los anticuerpos de anti-STEAP-1 se utilizan en aplicaciones diagnósticas tales como Inmunohistoquímica de especimenes de biopsia de riñón para detectar cáncer a partir de pacientes sospechosos.

Tal como se determinó mediante citometría de flujo, el MAb de anti-STEAP-1 se enlaza específicamente a células de carcinoma. Por lo tanto, se utilizan los anticuerpos de anti-STEAP-1 en el diagnóstico de aplicaciones de imagen de cuerpo entero, tales como radioinmunoescintigrafía y radioinmunoterapia, (ver, por ejemplo, Potamianos S., et. al. Anticancer Res 20

(2A):925-948 (2000)) para la detección de cánceres localizados y metásticos que exhiben la expresión de STEAP-1. El vertimiento o liberación de un dominio extracelular de STEAP-1 dentro del entorno extracelular, tal como áquel visto para fosfodiesterasa alcalina B10 (Meerson, N. R., Hepatology 27:563-568 (1998)), permite la detección diagnóstica de STEAP-1 mediante anticuerpos de anti-STEAP-1 en suero y/o muestras de orina de pacientes sospechosos.

Se utilizan los anticuerpos de anti-STEAP-1 que enlazan específicamente STEAP-1 en aplicaciones terapéuticas para el tratamiento de cánceres que expresan STEAP-1. Se utilizan anticuerpos de anti-STEAP-1 como una modalidad no conjugada y como una forma conjugada en la cual los anticuerpos están unidos a una de varias modalidades terapéuticas o de imagen bien conocidas en el estado de la técnica, tales como profármacos, enzimas o radioisótopos. En estudios preclínicos, se evaluaron anticuerpos de anti-STEAP-1 no conjugados y conjugados para eficacia de prevención de tumor e inhibición de crecimiento en los modelos de xenoinjerto de cáncer de ratón SCID, por ejemplo, modelos de cáncer de riñón AGS-K3 y AGS-K6, (ver, por ejemplo, el ejemplo titulado " Inhibición de Tumores de Vejiga y Pulmón *In Vivo* mediada por Anticuerpo Monoclonal de STEAP-1"). Se utilizan tanto anticuerpos de anti-STEAP-1 conjugados y no conjugados como una modalidad terapéutica en ensayos clínicos humanos bien sea solos o en combinación con otros tratamientos tal como los descritos en los siguientes Ejemplos.

Ejemplo 25: Ensayos Clínicos Humanos para el Tratamiento y Diagnóstico de Carcinomas Humanos a través del uso de Anticuerpos de Anti-STEAP-1 Humano *in vivo*

Se utilizan anticuerpos de acuerdo con la presente invención que reconocen un epítopo sobre STEAP-1, y se utilizan en el tratamiento de ciertos tumores tales como aquellos listados en la Tabla I. Con base en un número de factores, que incluyen niveles de expresión de STEAP-1, tumores tales como aquellos listados en la Tabla I son indicaciones actualmente preferidas. En conección con cada una de estas indicaciones, se persiguieron exitosamente tres aproximaciones clínicas.

I.) Terapia adjuntiva: en terapia adjuntiva, los pacientes se tratan con anticuerpos de anti-STEAP-1 en combinación con un agente quimoterapéutico o antineoplásico y/o terapia de radiación. Los objetivos de cáncer primario, tales

como aquellos listados en la Tabla I, son tratados bajo protocolos estándar mediante la adición de anticuerpos de anti-STEAP-1 a terapia de primera y segunda línea estándar. Los diseños de protocolo dirigen la eficacia tal como se evaluó mediante reducción en la masa de tumor así como también la capacidad para reducir las dosis usuales de quimoterapia estándar. Estas reducciones en la dosificación permiten terapia adicional y/o prolongada reduciendo la toxicidad relacionada a dosis del agente quimoterapéutico. Se utilizan los anticuerpos de anti-STEAP-1 en diversos ensayos clínicos adjuntivos en combinación con los agentes quimoterapéuticos o antineoplásicos adriamicina (carcinoma de próstata avanzado), cisplatino (carcinomas avanzados de cabeza y cuello y pulmón), taxol (cáncer de seno), y doxorubicina (preclínico).

II.) Monoterapia: En conexión con el uso de anticuerpos de anti-STEAP-1 en monoterapia de tumores, los anticuerpos se administran a pacientes sin un agente quimoterapéutico o antineoplásico. En una realización, la monoterapia se conduce clínicamente en pacientes con cáncer en etapa terminal con enfermedad metástica extensiva. Los pacientes muestran alguna estabilización de la enfermedad. Los ensayos demostraron un efecto en pacientes refractarios con tumores cancerosos.

III.) Agente de Imagen: a través de unir un radionúclido (por ejemplo, yodo o itrio (I^{131}, Y^{90}) a anticuerpos anti-STEAP-1, se utilizan los anticuerpos radioetiquetados como un agente de diagnóstico y/o imagen. En tal papel, los anticuerpos marcados localizan para tanto tumores sólidos, así como también, lesiones metásticos de células que expresan STEAP-1. En conexión con el uso de anticuerpos de anti-STEAP-1 como agentes de imagen, se utilizan los anticuerpos como un adjunto para el tratamiento quirúrgico de tumores sólidos, como bien sea una selección pre-quirúrgica así como también un recordatorio pos-operativo para determinar qué tumor permanece y/o retorna. En una realización, se utilizó un anticuerpo (^{111}In)-STEAP-1 como un agente de imagen un ensayo clínico humano de Fase I en pacientes que tienen un carcinoma que expresa STEAP-1 (por analogía ver, por ejemplo, Divgi *et al. J. Natl. Cancer Inst.* 83: 97-104(1991)). Se siguieron los pacientes con una cámara gama anterior y posterior estándar. Los resultados indican que se identificaron las lesiones primarias y las lesiones metastásicas.

<u>Dosis y Ruta de Administración</u>

Tal como se aprecia por aquellos normalmente versados en la materia, las consideraciones de dosificación pueden determinarse a través de comparación con los productos análogos que existen en la clínica. Por lo tanto, los anticuerpos de anti-STEAP-1 pueden administrarse con dosis en el rango de 5 hasta 400 mg/m^2, con las dosis inferiores utilizadas, por ejemplo, en conexión con los estudios de seguridad. La afinidad de los anticuerpos de anti-STEAP-1 relativa a la afinidad de un anticuerpo conocido por su objetivo es un parámetro utilizado por aquellos versados en la materia para determinar regímenes de dosis análoga. Adicionalmente; los anticuerpos de anti-STEAP-1 que son anticuerpos humanos completamente, comparados con el anticuerpo quimérico, tienen una depuración más lenta; de acuerdo con lo anterior, dosificación en pacientes con tales anticuerpos de anti-STEAP-1 completamente humanos puede ser inferior, quizás en el rango de 50 hasta 300 mg/m^2, y sigue siendo eficaz. La dosificación en mg/m^2, en oposición a la medida convencional de dosis en mg/kg, es una medida basada en el área superficial y es una medida de dosificación conveniente que se diseña para incluir pacientes de todas las tallas desde infantes hasta adultos.

Tres criterios de liberación distintos son útiles para liberación de anticuerpos de anti-STEAP-1. La liberación intravenosa convencional es una técnica de liberación estándar para muchos tumores. Sin embargo, en conexión con los tumores en la cavidad peritoneal, tales como los tumores de los ovarios, ducto biliar, otros ductos, y similares, la administración intraperitoneal puede ser favorable para la obtención de altas dosis de anticuerpo en el tumor y también para minimizar la depuración del anticuerpo. De una manera similar, ciertos tumores sólidos poseen una vasculatura que es apropiada para perfusión regiónal. La perfusión regiónal permite una alta dosis de anticuerpo en el sitio de un tumor y minimiza la depuración de corto término del anticuerpo.

Plan de Desarrollo Clínico (CDP)

Descripción: el CDP sigue y desarrolla tratamientos de anticuerpos de anti-STEAP-1 en conexión con la terapia adjuntiva, monoterapia, y como un agente de imagen. Los ensayos demuestran inicialmente seguridad y desapués de ello confirmaron la eficacia en dosis repetidas. Los ensayos son de etiqueta abierta comparando la quimioterapia estándar con la terapia estándar más anticuerpos anti-STEAP-1. Tal como será apreciado, un criterio que puede utiliazarse en conexión con la inscripción de pacientes son los niveles de

expresión de STEAP-1 en sus tumores tal como se determina mediante una biopsia.

Como con cualquier terapéutica basada en infusión de proteína o anticuerpo, las preocupaciones de seguridad se relacionan sobre todo con (i) el síndrome de liberación de citocina, esto es, hipotensión, fiebre, estremecimiento, escalofríos; (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica al material (esto es, desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente hacia el anticuerpo terapéutico, o respuesta HAHA); y, (iii) toxicidad para las células normales que expresan STEAP-1. Las pruebas y recordatorios estándar se utilizan para monitorear cada una de estas preocupaciones de seguridad. Se encontró que los anticuerpos de anti-STEAP-1 son seguros para la administración humana.

Ejemplo 26: Ensayo Clínico Humano: Monoterapia con Anticuerpo Anti-STEAP-1 Humano

Los anticuerpos de anti-STEAP-1 son seguros en conexión con el ensayo adjuntivo anteriormente discutido, un ensayo clínico humano en Fase II confirma la eficacia y dosificación óptima para monoterapia. Se realizó tal ensayo, y exige los mismos análisis de seguridad y respuesta, que el ensayo adjuntivo descrito anteriormente siendo la excepción que los pacientes no reciben quimoterapia concomitantemente con el recibo de dosis de anticuerpos anti-STEAP-1.

Ejemplo 27: Ensayo Clínico Humano: Imagen Diagnóstica con Anticuerpo de Anti-STEAP-1

Una vez más, como la terapia adjuntiva discutida anteriormente es segura dentro de los criterios de seguridad discutidos anteriormente, se condujo a un ensayo clínico humano concerniente al uso de anticuerpos de anti-STEAP-1 como un agente de imagen diagnóstica. Se diseñó el protocolo de una manera substancialmente similar a aquella descrita en el estado de la técnica, tal como en Divgi et *al. J. Natl. Cancer Inst.* 83: 97-104 (1991). Se encontró que los anticuerpos son tanto seguros y eficaces cuando se utilizan como una modalidad diagnóstica.

Ejemplo 28: Ensayo Clínico Humano de Terapia Adjuntiva con Anticuerpo de Anti-STEAP-1 Humano y terapia Quimoterapéutica, radiación, y/o ablación de hormona.

Se inició un ensayo clínico humano de Fase I para evaluar la seguridad de seis dosis intravenosas de un anticuerpo de anti-STEAP-1 humano en conexión con el tratamiento de un tumor sólido, por ejemplo, un cáncer de un tejido listado en la Tabla I. En el estudio, se evaluó la seguridad de dosis sencillas de anticuerpos de anti-STEAP-1 cuando se utilizaron como una terapia adjuntiva para un agente antineoplásico o quimoterapéutico o de ablación de hormona tal como se definió aquí, tales como, sin limitación: cisplatino, topotecan, doxorubicina, adriamicina, taxol, Lupron, Zoladex, Eulexin, Casodex, Anandron o similares. El diseño de ensayo incluye la liberación de seis dosis sencillas de un an anticuerpo de anti-STEAP-1 con dosificación de anticuerpo escalando de aproximadamente 25 mg/m^2 hasta aproximadamente 275 mg/m^2 durante el curso del tratamiento de acuerdo con el siguiente horario:

	Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28	Día 35
Dosis MAb	25 mg/m^2	75 mg/m^2	125 mg/m^2	175 mg/m^2	225 mg/m^2	275 mg/m^2
Quimoterapia (dosis estándar)	+	+	+	+	+	+

Los pacientes se siguieron cercanamente durante una semana después de cada administración de anticuerpo y quimoterapia. En particular, se evaluaron los pacientes para las preocupaciones de seguridad mencionadas anteriormente: (i) síndrome de liberación de citocina, esto es, hipotensión, fiebre, estremecimiento, escalofríos; (ii) el desarrollo de una respuesta inmunogénica al material (esto es, desarrollo de anticuerpos humanos por el paciente hacia el anticuerpo terapéutico, o respuesta HAHA); y, (iii) toxicidad para las células normales que expresan STEAP-1. Las pruebas y recordatorios estándar se utilizan para monitorear cada una de estas preocupaciones de seguridad. También se evaluaron los pacientes para respuesta clínica, y particularmente reducción en la masa de tumor tal como se evidenció mediante MRI u otra imagen.

Los anticuerpos de anti-STEAP-1 demostraron ser seguros y eficaces, los ensayos de Fase II confirman la eficacia y refinan la dosificación óptima.

Ejemplo 29: Identificación y Confirmación de Señal potencial de rutas de transducción

Se ha reportado que muchas proteínas mamíferas interactúan con moléculas de señalización e interactúan en la regulación de rutas de señalización. (J Neurochem. 2001; 76: 217-223). En particular se ha asociado la fibronectina con la cascada de señalización MAPK que controla la mitogénesis celular (Jiang F, Jia Y, Cohen I. Blood. 2002, 99:3579). Adicionalmente, la proteína STEAP-1 contiene diversos sitios de fosforilación (ver Tabla XXI) que indican una asociación con cascadas de señalización específicas. Utilizando técnicas de inmunoprecipitación y mancha occidental, se identificaron proteínas que se asocian con STEAP-1 y median eventos de señalización. Pueden regularse diversas rutas conocidas por ejercer un papel en biología del cáncer mediante STEAP-1, incluyendo rutas de fosfolípido tales como P13K, AKT, etc, rutas de adhesión y migración, que incluyen FAK, Rho, Rac-1, □-catenina, etc, así como también cascadas mitogénicas/supervivencia tales como ERK, p38, etc (Cell Growth Differ. 2000,11: 279; J Biol Chem. 1999, 274: 801; Oncogene. 2000,19:3003, J. Cell Biol. 1997, 138:913.)). Con el fin de determinar si la expresión de STEAP-1 es suficiente para regular rutas de señalización específica de otra forma no activas en células PC3 restantes, se investigó el efecto de estos genes sobre la activación de la cascada MAPK p38 en la línea celular de cáncer de próstata PC3. La activación de la p38 quinasa es dependiente de su fosforilación sobre los residuos de tirosina y serina. Puede distinguirse fosforilado p38 del estado nofosforilato por medio de un MAb de Fosfo-p38. Se utilizó este Ab fosfo-específico para estudiar el estado de fosforilación de p38 en líneas celulares PC3 modificadas.

Se tranfectaron células PC3 con gen de resistencia neomicina solas o con STEAP-1 en un vector pSRα. Las células crecieron durante la noche en FBS 0.5%, posteriormente se estimularon con FBS 10% durante 5 minutos con o sin inhibitor PD98058 MEK 10 µg/ml.

Los lisados celulares se resolvieron mediante SDS-PAGE 12.5% y manchado occidental con anti-fosfo-ERK (Cell Signaling) y antiERK (Zymed). Se transfectaron células NIH-3T3 con gen de resistencia neomicina solas o con

STEAP-1 en vector pSRα. Las células se trataron como anteriormente pero sin el inhibidor MEK. Adicionalmente, se trataron células NIH-3T3-Neo con salicilato de Na 10mg/ml.

La expresión de STEAP-1 induce a la fosforilación de ERK-1 y ERK-2 en suero y se inhibió mediante el inhibidor de quinasa MEK PD98058 ascendente.

En otro grupo de experimentos, se examinó la suficiencia de expresión de STEAP-1 en la línea celular de cáncer de próstata PC3 para activar la ruta mitogénica MAPK, especialmente la cascada ERK. La activación de ERK es dependiente de su fosforilación sobre los residuos de tirosina y serina. Puede distinguirse la ERK fosforilado del estado no-fosforilado mediante un MAb de fosfo-ERK. Se utilizó este Ab fosfo-específico para estudiar el estado de fosforilación de ERK en líneas celulares PC3 modificadas. Se utilizaron las células PC3, que expresan una forma activada de Ras, como un control positivo.

Los resultados muestran que mientras la expresión del neo gen de control no tuvo efecto sobre la fosforilación de ERK, la expresión de STEAP-1 en células PC3 es suficiente para inducir un incremento en la fosforilación ERK (Figura 28). Estos resultados se verificaron utilizando manchado occidental anti-ERK y confirmaron la activación de la ruta ERK por STEAP-1.

Dado que el FBS contiene diversos componentes que pueden contribuir con la activación ERK mediada por receptor, examinamos el efecto de STEAP-1 en niveles bajos y optimos de FBS. Las células de PC3 que expresan neo o STEAP-1 crecieron en bien sea FBS 0.1 % o 10% durante la noche. Se analizaron las células mediante un manchado occidental anti-Fosfo-ERK. Este experimento mostró que el STEAP-1 induce la fosforilación de ERK en FBS 0.1 %, y confirma que la expresión de STEAP-1 es suficiente para inducir la activación de la cascada de señalización ERK en ausencia de estímulos adicionales.

Para confirmar que STEAP-1 activa directamente o indirectamente rutas de transducción de señal conocidas en células, se llevaron a cabo ensayos de indicador transcripcional basado en luciferasa (luc) en células que expresan genes individuales. Estos indicadores transcripcionales contienen sitios de consenso de enlace para factores transcripción conocidos que quedan en dirección 3′ de rutas de transducción de señal bien caracterizadas. A

continuación se listan los indicadores y ejemplos de estos factores de transcripción asociados, rutas de transducción de señal, y estímulos de activación.

1. NFkB-luc, NFkB/Rel; Ik-quinasa/SAPK; crecimiento/apóptosis/estrés
2. SRE-luc, SRF/TCF/ELK1; MAPK/SAPK; crecimiento/diferenciación
3. AP-1-luc, FOS/JUN; MAPK/SAPK/PKC; crecimiento/apóptosis/estrés
4. ARE-luc, receptor andrógeno; esteroides/MAPK; crecimiento/diferenciación/apóptosis
5. p53-luc, p53; SAPK; crecimiento/diferenciación/apóptosis
6. CRE-luc, CREB/ATF2; PKA/p38; crecimiento/apóptosis/estrés
7. TCF-luc, TCF/Lef; □-catenina, adhesión/invasión

Pueden ensayarse los efectos mediados por gen en células que muestran expresión de mARN. Pueden introducirse los plásmidos de iniciador de luciferasa mediante transfección mediada por lípido (TFX-50, Promega). Se midió la actividad de luciferasa, como indicador de actividad transcripcional relativa, por medio de la incubación de extractos celulares con sustrato de luciferina y se monitoreó la luminescencia de la reacción en un luminómetro.

Se mapearon las rutas de señalización activadas por STEAP-1 y se utilizaron para la identificación y validación de objetivos terapéuticos. Cuando el STEAP-1 está involucrado en señalización celular, se utiliza como objetivo para propósitos de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 30: Implicación de STEAP-1 en el transporte de molécula pequeña y la comunicación célula-célula.

La comunicación célula-célula es esencial en el mantenimiento de la integridad de órgano y homeostasis, los cuales se desregularizan durante la formación y progresión de tumor. Las comunicaciones intercelulares pueden medirse utilizando dos tipos de ensayos (J. Biol. Chem. 2000, 275:25207). En el primer ensayo, se incubaron células cargadas con un tinte fluorescente en presencia de células recipientes no marcadas y se examinaron las poblaciones celulares bajo microscopía fluorescente. Este ensayo cualitativo mide el

intercambio de tinte entre células adyacentes. En el segundo sistema de ensayo, se trataron poblaciones celulares donoras y recipientes tal como anteriormente y se desarrollaron las medidas cuantitativas de la población celular recipiente mediante análisis FACS. Utilizando estos dos sistemas de ensayo, se compararon las células que expresan STEAP-1 con controles que no expresan STEAP- 1, y se encontró que el STEAP-1 mejora las comunicaciones celulares. La Figura 29 demuestra que STEAP-1 media la transferencia de la molécula pequeña canceina entre células adyacentes, y por lo tanto regula la comunicación célula-célula en células de cáncer de próstata. En este experimento, se marcaron células PC3 recipientes con dextrano- Rojo Texas y las células PC3 donor se marcaro con calceina AM (verde). Se co-cultivaron las células donora (verde) y recipiente (rojas) a 37 °C y se analizaron mediante microscopía para la co-localización de rojo Texas y calceina. Los resultados demostraron que mientras las células de control PC3 (expresión de proteína STEAP-1 no detectable) exhibieron pequeña transferencia de calceina, la expresión de STEAP-1 permite la transferencia de moléculas pequeñas entre células, por lo que las células recipiente inicialmente rojas toman un color pardusco, y co-localizan las moléculas rojas y verdes. Se utilizan las moléculas pequeñas y/o anticuerpos que modulan la comunicación célula-célula mediada por STEAP-1 como terapéuticos para cánceres que expresan STEAP-1. La Figura 30 demuestra que la expresión de STEAP-1 es necesaria en ambas tanto en las poblaciones donoras y recipientes para que la transferencia de moléculas pequeñas tenga lugar. En este experimento, se transfectaron células PC3 con gen de resistencia de neomicina solas o con STEAP-1 en vector pSRα. Se marcaron las células recipiente con 1 mg/ml de dextrano-Rojo Texas y las células donoras se marcaron con 2.5 µg/ml de calceina AM. Se co-cultivaron las células donoras (verde) y recipiente (rojas) a 37 °C durante 18-24 horas y se analizaron mediante microscopía para la co-localización de tintes fluorescentes. Páneles superiores: microscopía de luz; páneles inferiores: fluorescencia UV. Páneles izquierdos: células PC3-Neo fueron tanto donoras y recipientes. Páneles centrales: PC3- Neo fueron células donoras y PC3-STEAP-1 fueron recipientes. Páneles derechos: células PC3-STEAP-1 fueron tanto donoras y recipientes. Solo cuando se expresó STEAP-1 en tanto donoras y recipientes se detectó comunicación célula-célula.

Los resultados muestran que el co-cultivo de células PC3 y PC3 de control falla en mediar la transferencia de calceina. Similarmente, la co-incubación de PC3 de control y PC3-STEAP-1 no permite la transferencia de calceina. Sin embargo, co-cultivar células PC3-STEAP-1 donoras y PC3-

STEAP-1 recipientes media la transferencia de molécula pequeña tal como se representó mediante la co-localizacón de pigmentos verde y rojos en las mismas células. Tomados juntos, los datos mostrados en las figuras 29 y 30 demuestran que STEAP-1 media la transferencia de molécula pequeña y regula la comunicación célula-célula mediante la formación de canales de comunicación inter-celulares que son similares en función a las uniones de brecha.

Adicionalmente, se confirmó el efecto STEAP-1 M2/120.545 en la unión de brecha (ver, Figura 31). En este experimento, se transfectaron células PC3 con gen de resistencia de neomicina solas o con STEAP-1 en vector pSRα. Se marcaron las células recipiente con 1 mg/ml de dextrano-Rojo Texas y las células donoras se marcaron con 2.5 µg/ml de calceína AM. Se co-cultivaron las células donoras (verde) y recipiente (rojas) a 37 °C durante 18-24 horas y se analizaron mediante microscopía para la co-localización de tintes fluorescentes. En todos los experimentos, se utilizaron las mismas células como donoras y aceptoras. Las células se incubaron con la cantidad indicada de MAb de STEAP-1/120.545 durante 10 minutos antes de plaquear y se mantuvo MAb en el cultivo durante 24 horas antes del análisis. El STEAP1/120.545 redujo la unión de brecha mediada por STEAP-1 en una manera dependiente de dosis. Los resultados muestran que STEAP- 1/120.545 reduce la unión de brecha mediada por STEAP-1 en una forma dependiente de dosis.

Por lo tanto, debido a que STEAP-1 funciona en la comunicación célula-célula y en el transporte de molécula pequeña, se utiliza como un objetivo o marcador para propósitos de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 31: Interferencia por ARN (ARNI)

Se implementó la tecnología de interferencia por ARN (ARNi) a una variedad de ensayos celulares relevantes para oncología. La ARNI es un mecanismo de silenciamiento de gen post-transcripcional activado mediante ARN de doble cadena (dsARN). La ARNi induce degradación de mARN específico que conduce a cambios en la expresión de proteína y posteriormente en la función del gen. En las células de mamíferos, estos dsARNs llamados ARN de interferencia corta (siARN) tienen la composición correcta para activar la ruta de ARNI objetivo para degradación, específicamente algunos mARNs.

Ver, Elbashir S.M., *et. al.*, Duplexes of 21-nucleotide ARNs Mediate RNA Interference in Cultured Mammalian Cells, Nature 411(6836):494-8 (2001). Por lo tanto, la tecnología de ARNi se utiliza exitosamente en células mamíferas para silenciar genes objetivo.

La pérdida del control de proliferación celular es un sello de las células cancerosas; por lo tanto, la determinación del papel de STEAP-1 en ensayos de supervivencia/proliferación celular es relevante. De acuerdo con lo anterior, se utilizó ARNi para investigar la función del antígeno STEAP-1. Para generar siARN para STEAP-1, se utilizaron algoritmos que predicen los oligonucleótidos que exhiben los parámetros moleculares críticos (contenido G:C, temperatura de fusión, etc.) y tienen la capacidad para reducir significativamente los niveles de expresión de la Proteína STEAP-1 cuando es introducida dentro de las células. De conformidad con lo anterior, una secuencia objetivo para el siARN de STEAP-1 es: 5' AAGCTCATTCTAGCGGGAAAT 3' (SEQ ID NO: 81). De acuerdo con este ejemplo, se utilizan composiciones de siARN STEAP-1 que comprenden siARN (ARN de interferencia corta, de cadena doble) que corresponde a la secuencia ORF de ácido nucléico de la proteína STEAP-1 o subsecuencias del mismo. Por lo tanto, subsecuencias de siARN utilizadas de esta manera son generalmente de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 o más de 35 nucleótidos de ARN contiguos en longitud. Estas secuencias siARN son complementarias y no-complementarias a al menos una porción de la secuencia codificante mARN. En una realización preferida, las subsecuencias son de 19-25 nucleótidos de longitud, más preferiblemente de 21- 23 nucleótidos de longitud. En realizaciones preferidas, estos siARN logran la precipitación de antígeno STEAP-1 en células que expresan la proteína y tienen efectos funcionales tal como se describe más abajo.

Se evaluó el siARN seleccionado (oligo STEAP-1.b) en numerosas líneas celulares en el ensayo MTS de supervivencia/proliferación (que mide la actividad metabólica celular). Los ensayos colorimétricos basados en tetrazolio (i.e., MTS) detectaron células viables exclusivamente, dado que las células vivientes son metabólicamente activas y por lo tanto pueden reducir las sales de tetrazolio a compuestos de formazan coloreados; sin embargo, las células muertas no lo hacen. Más aún, este oligo STEAP-1.b alcanzó la precipitación del antígeno STEAP-1 en células que expresan la proteína y tiene efectos funcionales tal como se describe a continuación utilizando los siguientes protocolos.

Transfecciones de siARN mamífero: el día antes de la transfección de siARN, se plaquearon las diferentes líneas celulares en medio (RPMI 1640 con FBS 10% antibióticos w/o) a $2x10^3$ células/agujero en 80 µl (formato de placa de 96 agujeros) para el ensayo de supervivencia/MTS. En paralelo con el oligo siARN STEAP-1 específico, se incluyeron las siguientes secuencias en cada experimento como controles: a) células transfectadas Mock con Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) y solución amortiguadora de fijación (sin siARN); b) siARN Luciferasa-4 específico (secuencia objetivo: 5'-AAGGGACGAAGACGAACACUUCTT-3') (SEQ ID NO: 82) ; y, c) siARN Eg5 específico (secuencia objetivo: 5'-AACTGAAGACCTGAAGACAATAA-3') (SEQ ID NO: 83). Se utilizaron SiARNs a una concentración final de 10nM y 1 µg/ml Lipofectamina 2000.

El procedimiento fue como sigue: los siARNs se diluyeron primero en OPTIMEM (medio de transfección libre de suero, Invitrogen) a 0.1uM µM (10 veces concentrado) y se incubaron 5-10 min RT. Se diluyó Lipofectamina 2000 a 10 µg/ml (10 veces concentrado) para el número total de transfecciones y se incubó 5-10 minutos a temperatura ambiente (RT). Se mezclaron cantidades apropiadas de Lipofectamina 2000 concentrada 10 veces diluida 1:1 con siARN 10 veces concentrado diluido y se incubaron a RT durante 20-30" (solución de transfección 5 veces concentrada). Se adicionaron 20 µls de solución de transfección 5 veces concentrada a las muestras respectivas y se incubaron a 37 °C durante 96 horas antes del análisis.

Ensayo MTS: el ensayo MTS es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación, citotoxicidad o quimosensibilidad basados en un compuesto de tetrazolio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio, sal inerte; MTS (b)] y un reactivo de acoplamiento de electrones (etosulfato de fenazina; PES). Se desarrollaron los ensayos mediante la adición de una pequeña cantidad de la Solución Reactivo directamente a los agujeros de cultivo, incubando durante 1-4 horas y registrando posteriormente la absorbancia a 490nm con un lector de placa de 96 agujeros. La cantidad de producto formazan coloreado tal como es medido por la cantidad de absorbancia a 490nm es directamente proporcional a la actividad mitocondrial y/o el número de célula vivientes en el cultivo.

Con el fin de dirigir la función de STEAP-1 en células, se silenció STEAP-1 transfectando las líneas celulares que expresan STEAP-1 endógenamente. Tal como se muestra en Figura 32, las fosforilaciones de ERK-1 y ERK-2 fueron ambas inducidas por suero 10%, y se inhibieron por MAb M2/92.30 y siARN para STEAP-1. En este experimento se transfectaron células PC3, con gen de resistencia a neomicina solas o con STEAP-1 y MAb en vector pSHα. Para precipitación de ARNi, se transfectaron establemente células PCE-STEAP-1 con un vector pPUR-U6-27-STEAP-1 que contiene siARN para STEAP-1. Las células ayunaron en FBS 0.1 % durante 18 horas a 37° C, se colocaron sobre hielo durante 10 minutos sin o con 10 µg/ml de MAb M2/92.30, se llevó a RT durante 3 minutos posteriormente se estimuló con FBS 10% durante 5 minutos. Las células se lisaron en solución amotiguadora RIPA, se resolvieron los lisados celulares completos mediante SDS-PAGE 12.5% y se detectaron proteínas a partir de Manchado occidental. Se detectó Fosfo-ERK con antisuero de conejo (Cell Signaling) y se detectó ERK con anti-ERK de conejo (Zymed). Se detectó STEAP-1 con anti-STEAP-1 de ovejas y se detectó actina con MAb de anti-actina (Santa Cruz).

Adicionalmente, tal como se muestra en la Figura 33, el ARNi STEAP-1 específico expresado establemente en células PC3-STEAP-1 reduce la comunicación célula-célula inducida por STEAP-1. En este experimento se transfectaron células PC3, con gen de resistencia a neomicina solas o con STEAP-1 y MAb en vector pSRα. Para precipitación de ARNi, se transfectaron establemente células PCE-STEAP-1 con un vector pPUR-U6-27-STEAP-1 que contiene siARN para STEAP-1 o un vector vacío. Se marcaron las células recipiente con 1 mg/ml dextrano-Rojo Texas y las células donora se marcaron con 2.5 µg/ml de calceina AM. Se co-cultivaron las células donora (verdes) y recipientes (rojas) a °37 C durante 18-24 horas y se analizaron mediante microcopía para la co-localización de tintes fluorescentes. En todos los experimentos, se utilizaron las mismas células como donoras y aceptoras.

Otra realización de la invención es un método para analizar proliferación celular relacionada con STEAP-1 es la medida de síntesis de ADN como un marcador para proliferación. Se utilizan precursores de ADN marcado (esto es ^{3}H-Timidina) y se cuantificó su incorporación al ADN. La incorporación del precursor marcado dentro del ADN es directamente proporcional a la cantidad de división celular que ocurre en el cultivo. Otro método empleado para medir la proliferación celular es la realización de ensayos clonogénicos. En estos ensayos, se plaqueó un número definido de células sobre la matriz apropiada y

se contó el número de colonias formadas después de un periodo de crecimiento seguido por tratamiento de siARN.

En la validación de objetivo de cáncer de STEAP-1, se consideraron la complementación del análisis de supervivencia/proliferación celular con apóptosis y estudios de perfilamiento del ciclo celular. El sello bioquímico del proceso apoptótico es la fragmentación del ADN genómico, un evento irreversible que conduce la célula a morir. Un método para observar el ADN fragmentado en células es la detección inmunológica de fragmentos de ADN histona acomplejados mediante un inmunoensayo (esto es la detección de muerte celular mediante ELISA) el cual mide el enriquecimiento de fragmentos de ADN histona acomplejados (mono- y oligo-nucleosomas) en el citoplasma de células apoptóticas. Este ensayo no requiere pre-marcado de las células y puede detectar degradación de ADN en células que no proliferan in *vitro* (esto es células de tumor aisladas frescas).

Las moléculas efectoras más importantes para desencadenar la muerte celular apoptótico son las caspasas. Las caspasas son proteasas que cuando se activan escinden numerosos substratos en el sitio carboxi-terminal de un residuo aspartato que media etapas muy tempranas de la apóptosis después de la activación. Todas las caspasas se sintetizan como pro-enzimas y la activación involucra escisión en los residuos aspartato. En particular, la caspasa 3 parece tener un papel central en la iniciación de eventos celulares de apóptosis. Los ensayos para la determinación de activación de caspasa 3 detectan eventos tempranos de apóptosis. Después de los tratamientos de ARNi, la detección de Mancha occidental de la presencia de caspasa 3 activa o la escición de productos (esto es PARP) encontrada en células apoptóticas soporta adicionalmente una inducción activa de apóptosis. Debido a que los mecanismos celulares que resultan en la apóptosis son complejos, cada uno tiene sus ventajas y limitaciones. La consideración de otros criterios/puntos finales tales como morfología celular, condensación de cromatina, burbujeo de membrana, cuerpos apoptóticos ayudan a soportar adicionalmente la muerte celular como apoptótica. Dado que no todos los objetivos de gen que regulan el crecimiento celular son anti-apoptóticos, se midió el contenido de ADN de células permeabilizadas para obtener el perfil de contenido de ADN o el perfil de ciclo celular. Los núcleos de células apoptóticas contiene menos ADN debido al escape hacia el citoplasma (población sub-G1). Adicionalmente, el uso de teñidos de ADN (esto es, ioduro de propidio) también diferencia entre las diferentes fases del ciclo celular en la población celular debido a la presencia de

cantidades diferentes de ADN en G0/G1, S y G2/M. En estos estudios pueden cuantificarse las subpoblaciones.

Para el gen de STEAP-1, los estudios de ARNi facilitan la comprensión de la contribución del producto gen en rutas de cáncer. Tales moléculas de ARNi activo tienen uso en ensayos de identificación para seleccionar MAbs que son terapéuticos anti-tumor activos. Adicionalmente, se administra siARN como terapéuticos paara a pacientes con cáncer para reducir el crecimiento maligno de diferentes tipos de cáncer, incluyendo aquellos listados en la Tabla 1. Cuando el STEAP-1 juega un papel en la supervivencia celular, proliferación celular, tumorigénesis, o apóptosis, se utiliza como un objetivo para propósitos de diagnóstico, pronóstico, preventivos y/o terapéuticos.

Ejemplo 32: Modulación de la función de STEAP-1.

El transporte de iones juega un papel importante regulando la permeabilidad intracelular del celular, el tráfico molecular y la transducción de señal (Minke B. Cell Mol Neurobiol. 2001, 21:629; Golovina et al, Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2001, 280:H746) estas son funciones que son especialmente relevantes para la condición neoplásica. La comunicación célula-célula regula la homeostasis, la proliferación celular y la muerte celular (Evans WH, Martin PE. Mol Membr Biol. 200219:121; Carruba G, et al, Ann N Y Acad Sci. 2002, 963:156) estas funciones también son especialmente relevantes para la condición neoplásica.

Utilizando líneas celulares de control y líneas celulares que expresan STEAP-1 se identificaron los inhibidores de la función STEAP-1. Por ejemplo, pueden incubarse células PC3 y PC3-STEAP-1 en presencia y ausencia inhibidores de MAb o molécula pequeña. El efecto de estos inhibidores de MAb o molécula pequeña se investiga utilizando los ensayos de flujo de iones, comunicación celular, proliferación y señalización descritos anteriormente.

Puede modularse la transducción de señal y salida biológica mediada por transportadores a través de varios mecanismos, incluyendo inhibición de enlace receptor y ligando, antagonistas de ion, interacciones de proteína, regulación de ion y transporte de molécula pequeña, etc (Tang W et al, Front Biosci 2002, 7:1583). Utilizando líneas celulares de control y líneas celulares que expresan STEAP-1, se identificaron moduladores (inhibidores o reforzadores) de la

función de STEAP-1. Por ejemplo, se incubaron células PC3 y PC3-STEAP-1 en presencia y ausencia de moduladores de MAb o molécula pequeña. En vista de las funciones de STEAP-1 aquí reveladas, los moduladores que son bloqueadores del canal de iones utilizados en el contexto de la presente invención incluyen compuestos tales como amlodipina, azulena, dihidropiridinas, tianinas, nifedina, verapamil y sus derivados (Tanaka Y, Shigenobu K. Cardiovasc Drug Rev. 2001, 19:297; Djuric D, Mitrovic V, Jakovljevic V.Arzneimittelforschung. 2002,52:365; Kourie JI, Wood HB. Prog Biophys Mol Biol. 2000;73:91); y, los moduladores que son inhibidores de la comunicación celular utilizados en el contexto de la presente invención incluyen compuestos tales como ácido beta-gliciretínico, retinoides, TPA (Krutovskikh VA et al, Oncogene. 2002, 21:1989; Rudkin et al, J Surg Res. 2002,103: 183; Ruch J et al, J Cell Biochem. 2001, 83:163). De acuerdo con lo anterior, se investigaron el (los) efecto(s) de inhibidores de MAb o molécula pequeña utilizando los ensayos de flujo de ion, comunicación celular, proliferación y señalización descritos en los Ejemplos anteriores.

Cuando MAb y moléculas pequeñas modulan, por ejemplo, inhiben, la función de transporte y tumorogénica de STEAP-1, son utilizados para propósitos preventivos, pronósticos, diagnósticos y/o terapéuticos.

A lo largo de esta solicitud, se referenciaron varios contenidos de datos de sitios web, publicaciones, solicitudes de patente y patentes (los sitios web se referencian por sus direcciones Uniform Resource Locator, o URL, en la Red Mundial.). Las revelaciones de cada una de estas referencias se incorporan por lo tanto como referencia aquí en su totalidad.

La presente invención no está limitada en alcance por las realizaciones aquí reveladas, las cuales se preveen como ilustraciones sencillas de aspectos individuales de la invención, y cualquiera que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance del invención. Varias modificaciones a los modelos y métodos de la invención, adicionalmente a aquellos aquí descritos, serán aparentes para aquellos versados en la materia a partir de la descripción y enseñanzas presedentes, y similarmente son previstos para quedar dentro del alcance de la invención. Tales modificaciones u otras realizaciones pueden predecirse sin apartarse del verdadero alcance y espíritu de la invención.

TABLAS:

TABLA 1: Tejidos que expresan STEAP-1 cuando son malignos:

Próstata
Vejiga
Riñón
Colon
Pulmón
Páncreas
Ovario
Seno
Estómago
Recto
Linfoma

TABLA II: Abreviaturas de Aminoácidos

LETRA SENCILLA	TRES LETRAS	NOMBRE COMPLETO
F	Phe	fenilalanina
L	Leu	leucina
S	Ser	serina
Y	Tyr	tirosina
C	Cys	cisteína
W	Trp	triptofano
P	Pro	prolina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
R	Arg	arginina
I	Ile	isoleucina
M	Met	metionina
T	Thr	treonina
N	Asn	asparagina
K	Lys	lisina
V	Val	valina
A	Ala	alanina
D	Asp	ácido aspártico
E	Glu	ácido glutámico
G	Gly	glicina

TABLA III (a): Matriz de Sustitución de Aminoácido

Adaptado del Software GCG 9.0 BLOSUM62 matriz de sustitución de aminoácido (matriz sustitución en bloque). Entre mayor sea el valor, se encuentra una sustitución más similar en proteínas naturales relacionadas. (Ver Red Mundial URL ikp.unibe.ch/manual/blosum62.html)

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

TABLA III(b)

Residuo original	Sustitución conservativa
Ala (A)	Gly; Ser; Val
Arg (R)	Lys
Asn (N)	Gln; His
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn, His
Glu (E)	Asp
Gly (G)	Ala; Pro
His (H)	Asn; Gln
Ile (I)	Leu; Val
Leu (L)	Ile; Val
Lys (K)	Arg; Gln; Glu
Met (M)	Leu; Tyr; Ile; Val
Phe (F)	Met; Leu; Tyr
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe
Val (V)	Ile; Leu; Ala

TABLA IV:

HLA de Clase I/II Motivos/Supermotivos

TABLA IV (A): HLA de Clase I Supermotivos/Motivos

Supermotivo	Posición 2 (ancla primaria)	Posición 3 (ancla primaria)	Posición C terminal (ancla primaria)
A1	TI*LVMS*		FWY
A2	LIVM*ATQ*		IV*MATL*
A3	VSMA*TLI*		RK
A24	YF*WIVLMT*		FI*YWLM*
B7	P		VILF*MWYA*
B27	RHK		FYL*WMIVA*
B44	E*D*		FWYLIMVA
B58	ATS		FWY*LIVMA*
B62	QL*IVMP*		FWY*MIVLA*
MOTIVOS			
A1	TSM		Y
A1		DEAS	Y
A2.1	LM*VQIAT*		V*LIMAT*
A3	LMVISATF*CGD*		KYR*HFA*
A11	VTMLISAGN*CDF*		K*RYH*
A24	YFW*M*		FLIW
A*3101	MVT*ALIS*		R*K*
A*3301	MVALF*IST*		RK
A*6801	AVT*MSLI*		RK
B*0702	P		LMF*WYAIV*
B*3501	P		LMFWY*IVA*
B51	P		LIVF*WYAM*
B*5301	P		IMFWY*ALV*
B*5401	P		ATIV*LMFWY*

Los residuos resaltados son preferidos, los residuos en itálica son menos preferidos: se considera un péptido que porta motivo si tiene anclas primarias en cada posición de ancla primaria para un motivo o supermotivo tal como se especificó en la tabla anterior.

TABLA IV (B): HLA de Clase II Supermotivo

1	6	9
W, F, Y, V, .I, L	A, V, I, L, P, C, S, T	A, V, I, L, C, S, T, M, Y

TABLA IV (C): Motivos de HLA de Clase II

Motivos			1° Ancla 1	2	3	4	5	1° Ancla 6	7	8	9
DR4		preferido	FMY*LIVW*	M	T		I	VST*PALIM*	MH		MH
		deletéreo				W			R		WDE
DR1		preferido	MF*LIVWY*			PAMQ		VMAT*SPLIC*	M		AVM
		deletéreo		C	CH	FD	CWD		GDE	D	
DR7		preferido	MF*LIVWY*	M	W	A		IVMSA*CTPL*	M		IV
		deletéreo		C		G			GRD	N	G
DR3		MOTIVOS	1° Ancla 1	2	3	1° Ancla 4	5	1° Ancla 6			
Motivo preferido	a		LIVMFY			D					
Motivo preferido	b		LIVMFAY			DNQEST		KRH			
Supermotivo DR			MF*LIVWY*					VMSTA*CPLI*			

Los residuos en itálica indican residuos menos preferidos o "tolerados"

TABLA IV (D): Supermotivos de HLA de Clase I

SUPER-MOTIVOS	POSICIÓN:	1	2	3	4	5	6	7	8	C-terminal
A1			1° Ancla 1 TIL*VMS*							1° Ancla 1 FWY
A2			1° Ancla 1 LIVM*ATQ*							1° Ancla 1 LIVMAT
A3	Preferido		1° Ancla 1 VSMA*TLI*	YFW (4/5)			YFW (3/5)	YFW (4/5)	P (4/5)	1° Ancla 1 RK
	deletéreo	DE (3/5); P (5/5)		DE (4/5)						
A24			1° Ancla 1 *YFWIVLMT*							1° Ancla 1 FIY*WLM*
B7	Preferido	FWY (5/5) LIVM (3/5)	1° Ancla 1 P	FWY (4/5)					FWY (3/5)	1° Ancla 1 VILF*MWYA*
	deletéreo	DE (3/5); P (5/5); G (4/5); A (3/5); QN (3/5)				DE (3/5)	G (4/5)	QN (4/5)	DE (4/5)	
B27			1° Ancla 1 RHK							1° Ancla 1 FYL*WMIVA*
B44			1° Ancla 1 *ED*							1° Ancla 1 FWYLIMVA
B58			1° Ancla 1 ATS							1° Ancla 1 FWY*LIVMA*
B62			1° Ancla 1 QL*IVMP*							1° Ancla 1 FWY*MIVLA*

Los residuos en itálica indican residuos menos preferidos o "tolerados"

TABLA IV (E): Motivos de HLA de Clase I

	POSICION	1	2	3	4	5	6	7	8	9 o C-Terminal	C-Terminal
A1 9-mero	preferido	GFWY	1° Ancla STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	1° Ancla Y	
	deletéreo	DE		RHKLIMP	A	G	A				
A1 9-mero	preferido	GRHK	ASTCLIVM	1° Ancla DEAS	GSTC		ASTC	LIVM	DE	1° Ancla Y	
	deletéreo	A	RHKDEPYWF		DE	PQN	RHK	PG	GP		
A1 10-mero	preferido	YFW	1° Ancla STM	DEAQN	A	YFWQN		PASTC	GDE	P	1° Ancla Y
	deletéreo	GP		RHKGLIVM	DE	RHK	QNA	RHKYFW	RHK	A	
A1 10-mero	preferido	FYW	STCCLIVM	1° Ancla DEAS	A	YFW		PG	G	YFW	1° Ancla Y
	deletéreo	RHK	RHKDEPYFW			P	G		PRHK	QN	
A2.1 9-mero	preferido	YFW	1° Ancla LM*IVQAT*	YFW	STC	YFW		A	P	1° Ancla *VLIMAT*	
	deletéreo	DEP		DERKH			RHK	DERKH			
	POSICION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-Terminal
A2.1 10-mero	preferido	AYWF	1° Ancla LM*IVQAT*	LVIM	G		G		FYWLVIM		1° Ancla *VLIMAT*
	deletéreo	DEP		DE	RHKA	P		RHK	DERKH	RKH	
A3	preferido	RHK	1° Ancla LMVISATFCGD	YFW	PRHKYF	A	YFW		P	1° Ancla KYR*HFA*	
	deletéreo	DEP		DE	W						
A11	preferido	A	1° Ancla VTLMISAGNC*DF*	YFW	YFW	A	YFW	YFW	P	1° Ancla *KRYH*	
	deletéreo	DEP						A	G		
A24 9-mero	preferido	YFWRHK	1° Ancla YFW*M*		STC			YFW	YFW	1° Ancla FLIW	
	deletéreo	DEG		DE	G	QNP	DERHK	G	AQN		
A24 10-mero	preferido		1° Ancla YFW*M*		P	YFWP		P			1° Ancla FLIW
	deletéreo			GDE	QN	RHK	DE	A	QN	DEA	
A3101	preferido	RHK	1° Ancla MVT*ALIS*	YFW	P		YFW	YFW	AP	1° Ancla *RK*	
	deletéreo	DEP		DE		ADE	DE	DE	DE		
A3101	preferido		1° Ancla MVALF*IST*	YFW				AYFW		1° Ancla RK	
	deletéreo	GP		DE							
A6801	preferido	YWFSTC	1° Ancla AVT*MSLI*			YFWLIVM		YFW	P	1° Ancla RK	
	deletéreo	GP		DEG		RHK			A		
B0702	preferido	RHKFWY	1° Ancla P	RHK		RHK	RHK	RHK	PA	1° Ancla LMF*WY* *AIV*	
	deletéreo	DEQNP		DEP	DE	DE	GDE	QN	DE		

	POSICION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	C-Terminal
										o C-Terminal	
A1 9-mero	preferido	GFWY	1° Ancla STM	DEA	YFW		P	DEQN	YFW	1° Ancla Y	
	deletéreo	DE		RHKLIMP	A	G	A				
A1 9-mero	preferido	GRHK	ASTCLIVM	1° Ancla DEAS	GSTC		ASTC	LIVM	DE	1° Ancla Y	
	deletéreo	A	RHKDEPYWF		DE	PQN	RHK	PG	GP		
B3501	preferido	FWYLIVM	1° Ancla P	FWY				FWY		1° Ancla LMFWYIVA	
	deletéreo	AGP				G	G				
B51	preferido	LIVMFWF	1° Ancla P	FWY	STC	YFW		G	FWY	1° Ancla LIVFWYAM	
	deletéreo	AGPDERHKSTC				DE	G	DEQN	GDE		
B5301	preferido	LIVMFWY	1° Ancla P	FWY	STC	FWY		LIVMFWY	FWY	1° Ancla IMFWYALV	
	deletéreo	AGPQN					G	RHKQN	DE		
B5401	preferido	FWY	1° Ancla P	FWYLIVM		LIVM		ALIVM	FWYAP	1° Ancla ATIVLMFWY	
	deletéreo	GPQNDE		GDESTC		RHKDE	DE	QNDGE	DE		

TABLA IV (F):

Resumen de los supertipos HLA								
Frecuencias fenotípicas totales de supertipos HLA en diferente poblaciones étnicas								
Especificidad			Frecuencia fenotípica					
Supertipo	Posición 2	C-Terminal	Caucásico	Negro N.A.	Japonés	Chino	Hispánico	Promedio
B7	P	AILMVFWY	43.2	55.1	57.1	43.0	49.3	49.5
A3	AILMVST	RK	37.5	42.1	45.8	52.7	43.1	44.2
A2	AILMVT	AILMVT	45.8	39.0	42.4	45.9	43.0	42.2
A24	YF (YWLM)	FI (YWLM)	23.9	38.9	58.8	40.1	38.3	40.0
B44	E (D)	FWYLIMVA	43.0	21.1	42.9	39.1	39.0	37.0
A1	TI (LVMS)	FWY	47.1	16.1	21.8	14.7	26.3	25.2
B27	RHK	FYL (WMI)	28.4	26.1	13.3	13.9	35.3	23.4
B62	QL (IVMP)	FWY (MIV)	12.6	4.8	36.5	25.4	11.1	18.1
B58	ATS	FWY (LIV)	10.0	25.1	1.6	9.0	5.9	10.3

TABLA IV (G):

Cubrimiento de población calculada proporcionado por diferentes combinaciones de supertipo HLA						
Supertipos HLA	Frecuencia fenotípica					
	Caucásico	Negros N.A.	Japonés	Chino	Hispánico	Promedio
	83.0	86.1	87.5	88.4	86.3	86.2
A3, A3 Y B7	99.5	98.1	100.0	99.5	99.4	99.3
A2, A3, B7, A24, B44 Y A1	99.9	99.6	100.0	99.8	99.9	99.8
A2, A3, B7, A24, B44, A1, B27, B62 Y B58						
Los motivos indican los residuos que definen especificidades de supertipo. Los motivos incorporan residuos determinados con base en los datos publicados reconocidos por múltiple aleios dentro del supertipo. Los residuos entre paréntesis son residuos adicionales también pedichos paera ser tolerados por múltiples aleios dentro del supertipo.						

Tabla IV(h): Motivos que se Encuentran Frecuentemente			
Nombre	% Identidad promedio	Descripción	Función Potencial
zf-C2H2	34%	Dedo de zinc, tipo C2H2	Proteína de enlace a ácido nucleico funciona como factor de transcripción, probable localización nuclear
citocromo_b_N	68%	Citocromo b (N-terminal)/b6/petB	oxidasa unida a membrana, genera superóxido
Ig	19%	dominio de inmunoglobulina	los dominios son de cien aminoácidos de largo e incluyen una unión disulfuro intradominio conservada
WD40	18%	Dominio WD, repetición G-beta	repeticiones en tándem de aproximadamente 40 residuos, cada uno contiene un motivo Trp-Asp. Función en transducción de señal e interacción de proteína
PDZ	23%	Dominio PDZ	puede funcionar en la señalización objetivo de moléculas para sitios sub-membranosos
LRR	28%	Repetición Rica en Leucina	motivos de secuncia corta involucrados en interacciones proteína-proteína
quinasaP	23%	Dominio de proteína quinasa	núcleo catalítico conservado común a tanto proteína quinasas serina/treonina y tirosina que contienen un sitio de enlace de ATP y un sitio catalítico
PH	16%	Dominio PH	homología pleckstrin involucrada en señalización intracelular o como constituyentes del citoesqueleto
EGF	34%	Dominio tipo EGF	aminoácido de largo 30-40 encontrado en el dominio extracelular de proteínas unidas a membrana o en proteínas secretadas
Rvt	49%	Transcriptasa inversa (polimerasa de ARN dependiente de ADN)	
Ank	25%	Repetición Ank	proteína citoplasmática, asocia proteínas de membarna integrales al citoesqueleto
Oxidored_q1	32%	NADH-ubiquinona/plastoquinona (complejo I), varias cadenas	asociado a membrana. Involucrado en translocaciones de protones a través de la membrana
Efmano	24%	Mano EF	dominio enlazante de calcio, consiste de un asa de 12 residuos flanqueada en ambos lados por un dominio de hélice alfa de 12 residuos
Rvp	79%	Proteasa aspartil retroviral	ácido o aspartil proteasa, centradas en un residuo aspartil catalítico
Colágeno	42%	Repetición triple hélice de colágeno (20 copias)	proteínas estructurales extracelulares involucradas en la formación del tejido conectivo. La secuencia consiste del G-X-Y y las cadenas de polipéptidos forman una triple hélice
Fn3	20%	Dominio fibronectina tipo III	Localizado en la región de receptores enlace extracelular de ligando-enlace y es de aproximadamente 200 residuos de aminoácido de longitud con dos pares de cisteínas involucradas en enlaces disulfuro
7tm_1	19%	Receptor de transmembrana 7 (familia rodopsina)	siete regiones transmembrana hidrofóbicas, con el N-terminal localiado extracelularmente mientras que el C-terminal es citoplásmico. Señal a través de proteínas G

~~246~~
266

Tabla IV(I): Ejemplos de Isótopos Médicos:

Isótopo	Descripción de uso
Actinio-225 (AC-225)	Ver Torio-229 (Th-229)
Actinio-227 (AC-227)	Padre de Radio-223 (Ra-223) el cual es un emisor alfa utilizado para tratar metástasis en el esqueleto resultantes del cáncer (esto es, cánceres de seno y próstata), y radioinmunoterapia de cáncer
Bismuto-212 (Bi-212)	Ver Torio-228 (Th-228)
Bismuto-213 (Bi-213)	Ver Torio-229 (Th-229)
Cadmio-109 (Cd-109)	Detección de cáncer
Cobalto-60 (Co-60)	Fuente de radiación para radioterapia de cáncer, para irradiadores de alimentos, y para esterilización de suministros médicos
Cobre-64 (Cu-64)	Un emisor de positrones utilizado para terapia de cáncer e imagen SPECT
Cobre-67 (Cu-67)	Emisor beta/gama utilizado en radioinmunoterapia de cáncer y estudios de diagnóstico (esto es, cánceres de seno y colon, y linfoma)
Disprosio-166 (Dy-166)	Radioinmunoterapia de cáncer
Erbio-169 (Er-169)	Tratamiento de artritis reumatoide, particularmente para las articulaciones pequeñas asociadas con dedos de la mano y dedos del pie
Europio-152 (Eu-152)	Fuente de radiación para irradiación de alimentos y para esterilización de suministros médicos
Europio-154 (Eu-154)	Fuente de radiación para irradiación de alimentos y para esterilización de suministros médicos
Gadolinio-153 (Gd-153)	Detección de osteoporosis y dispositivos de aseguramiento de la calidad médica nuclear
Oro-198 (Au-198)	Implante y terapia intracavidad de cánceres de ovario, próstata, y cerebro
Holmio-166 (Ho-166)	Tratamiento de mieloma múltiple en terapia objetivo esquelética, radioinmunoterapia de cáncer, ablación de la médula ósea, y tratamiento de artritis reumatoide
Yodo-125 (I-125)	Detección de osteoporosis, imagen diagnóstica, trazador de fármacos, tratamiento de cáncer de cerebro, radiomarcado, imagen de tumor, mapeado de receptores en el cerebro, terapia de radiación intersticial, braquioterapia para el tratamiento de cáncer de próstata, determinación de la velocidad de filtración glomerular (GFR), determinación del volumen de plasma, detección de trombosis de vena profunda de las piernas
Yodo-131 (I-131)	Evaluación de la función tiroide, detección de enfermedad tiroide, tratamiento de cáncer de tiroide así como también otras enfermedades no-malignas de tiroide (esto es, enfermadedad de Graves, bocio, e hipertioidismo), tratamiento de leucemia, linfoma, y otras formas de cáncer (por ejemplo, cáncer de seno) utilizando radioinmunoterapia
Iridio-192 (Ir-192)	Braquioterapia, tratamiento de tumor de cerebro y médula espinal, tratamiento de arterias bloqueadas (esto es, arterioesclerosis y restenosis), e implantes para tumores de seno y próstata
Lutecio-177 (Lu-177)	Radioinmunoterapia de cáncer y tratamiento de arterias bloqueadas (esto es, arterioesclerosis y restenosis)
Molibdeno-99 (Mo-99)	Padre del Tecnecio-99m (Tc-99m) que se emplea para imagen de cerebro, hígado, pulmones, corazón, y otros órganos. Actualmente, el Tc-99m es el radioisótopo más ampliamente utilizado empleado para imagen de diagnóstico de varios cánceres y enfermedades que involucran el cerebro, corazón, hígado, pulmones; también

	se utilizan en la detección de trombosis de vena profunda en las piernas
Osmio-194 (Os-194)	Radioinmunoterapia de cáncer
Paladio-103 (Pd-103)	Tratamiento de cáncer de próstata
Platino-195m (Pt-195m)	Estudios sobre biodistribución y metabolismo de cisplatino, un fármaco quimioterapéutico
Fósforo-32 (P-32)	Tratamiento de policitemia rubra vera (enfermedad de glóbulos rojos) y leucemia, diagnóstico/tratamiento de cáncer de hueso; tratamiento de cáncer de colon, pancreático, e hígado; radiomarcado de ácidos nucléicos para investigación in vitro, diagnóstico de tumores superficiales, tratamiento de arterias bloqueadas (esto es, arterioesclerosis y restenosis), y terapia intracavidad
Fósforo-33 (P-33)	Tratamiento de leucemia, diagnóstico/tratamiento de enfermedad ósea, radiomarcado, y tratamiento de arterias bloqueadas (esto es, arterioesclerosis y restenosis)
Radio-223 (Ra-223)	Ver Actinio-227 (Ac-227)
Renio-186 (Re-186)	Alivio del dolor por cáncer de huesos, tratamiento de artritis reumatoide, y diagnóstico y tratamiento de cánceres de linfoma y hueso, seno, colon, e hígado utilizando radioinmunoterapia
Renio-188 (Re-188)	Diagnóstico y tratamiento de cáncer utilizando radioinmunoterapia, alivio del dolor de cáncer de hueso, tratamiento de artritis reumatoide, y tratamiento de cáncer de próstata
Rodio-105 (Rh-105)	Radioinmunoterapia de cáncer
Samario-145 (Sm-145)	Tratamiento de cáncer ocular
Samario-153 (Sm-153)	Radioinmunoterapia de cáncer y alivio de dolor por cáncer de hueso
Scandio-47 (Sc-47)	Radioinmunoterapia de cáncer y alivio de dolor por cáncer de hueso
Selenio-75 (Se-75)	Radiotrazador utilizado en estudios de cerebro, imagen de la corteza adrenal mediante escintigrafía gama, localizaciones laterales de tumores que secretan esteroides, exploración pancreática, detección de glándulas para tiroides hiperactivas, medida de la velocidad de la pérdida de ácido biliar a partir del conjunto endógeno
Estroncio-85 (Sr-85)	Detección de cáncer de huesos y exploraciones de cerebro
Estroncio -89 (Sr-89)	Alivio de dolor por cáncer de hueso, tratamiento de mieloma múltiple, y terapia osteoblástica
Tecnecio-99m (Tc-99m)	Ver Molibdeno-99 (Mo-99)
Torio-228 (Th-228)	Padre de Bismuto-212 (Bi-212) el cual es un emisor alfa utilizado en radioinmunoterapia de cáncer
Torio-229 (Th-229)	Padre de Actinio-225 (Ac-225) y abuelo de Bismuto-213 (Bi-213) los cuales son emisores alfa utilizados en radioinmunoterapia de cáncer
Talio-170 (Tm-170)	Fuente gama para irradiadores sanguíneos, fuente de energía para dispositivos médicos implantados
Estaño-117m (Sn-117m)	Inmunoterapia de cáncer y alivio de dolor por cáncer de hueso
Tungsteno-188 (W-188)	Padre de Renio-188 (Re-188) el cual se utiliza para diagnósticos/tratamiento de cáncer, alivio de dolor por cáncer de hueso, tratamiento de artritis reumatoide, y tratamiento de arterias bloqueadas (esto es, arterioesclerosis y restenosis)
Xenón-127 (Xe-127)	Neuroimagen de enfermedades del cerebro, estudios SPECT de alta resolución, pruebas de función pulmonar, y

	estudios de flujo sanguíneo cerebral
Yterbio-175 (Yb-175)	Radioinmunoterapia de cancer
Itrio-90 (Y-90)	Microsemillas obtenidas a partir de la irradiación de Itrio-89 (Y-89) para tratamiento de cáncer de hígado
Itrio-91 (Y-91)	Un sello de emisión gama para Itrio-90 (Y-90) el cual se utiliza para radioinmunoterapia de cáncer (esto es, cánceres de linfoma, seno, colon, riñón, pulmón, ovario, próstata, pancreático, e hígado inoperable)

Tablas V-XVIII: Expuestas en la solicitud de Patente de Estados Unidos número 10/236,878; presentada 06-Septiembre-2002, los contenidos específicos están completamente incorporados aquí por referencia.

Tabla XIX: Motivos que se encuentran Frecuentemente

Nombre	% Identidad promedio	Descripción	Función Potencial
zf-C2H2	34%	Dedo de zinc, tipo C2H2	Proteína de enlace a ácido nucleico funciona como factor de transcripción, probable localización nuclear
citocromo_b_N	68%	Citocromo b (N-terminal)/b6/petB	oxidasa unida a membrana, genera superóxido
Ig	19%	dominio de inmunoglobulina	los dominios son de cien aminoácidos de largo e incluyen una unión disulfuro intradominico conservada
WD40	18%	Dominio WD, repetición G-beta	repeticiones en tándem de aproximadamente 40 residuos, cada uno contiene un motivo Trp-Asp. Función en transducción de señal e interacción de proteína
PDZ	23%	Dominio PDZ	puede funcionar en la señalización objetivo de moléculas para sitios sub-membranosos
LRR	28%	Repetición Rica en Leucina	motivos de secuncia corta involucrados en interacciones proteína-proteína
quinasaP	23%	Dominio de proteína quinasa	núcleo catalítico conservado común a tanto proteína quinasas serina/treonina y tirosina que contienen un sitio de enlace de ATP y un sitio catalítico
PH	16%	Dominio PH	homología pleckstrin involucrada en señalización intracelular o como constituyentes del citoesqueleto
EGF	34%	Dominio tipo EGF	aminoácido de largo 30-40 encontrado en el dominio extracelular de proteínas unidas a membrana o en proteínas secretadas

Tabla XIX, continuación: motivos que se encuentran frecuentemente

Nombre	% Identidad promedio	Descripción	Función Potencial
Rvt	49%	Transcriptasa inversa (polimerasa de ARN dependiente de ADN)	
Ank	25%	Repetición Ank	proteína citoplasmática, asocia proteínas de membrana integrales al citoesqueleto
Oxidored_q1	32%	NADH-ubiquinona/plastoquinona (complejo I), varias cadenas	asociado a membrana. Involucrado en translocaciones de protones a través de la membrana
Efmano	24%	Mano EF	dominio enlazante de calcio, consiste de un asa de 12 residuos flanqueada en ambos lados por un dominio de hélice alfa de 12 residuos
Rvp	79%	Proteasa aspartil retroviral	ácido o aspartil proteasa, centradas en un residuo aspartil catalítico

Colágeno	42%	Repetición triple hélice de colágeno (20 copias)	proteínas estructurales extracelulares involucradas en la formación del tejido conectivo. La secuencia consiste del G-X-Y y las cadenas de polipéptidos forman una triple hélice
Fn3	20%	Dominio fibronectina tipo III	Localizado en la región de receptores enlace extracelular de ligando-enlace y es de aproximadamente 200 residuos de aminoácido de longitud con dos pares de cisteínas involucradas en enlaces disulfuro
7tm_1	19%	Receptor de transmembrana 7 (familia rodopsina)	siete regiones transmembrana hidrofóbicas, con el N-terminal localiado extracelularmente mientras que el C-terminal es citoplásmico. Señal a través de proteínas G

Tabla XX: Motivos y Modificaciones Post-transduccionales de STEAP-1:

Sitio de N-glicosilación

143 -146 NGTK (SEQ ID NO: 84)

331 - 334 NKTE (SEQ ID NO: 85)

Sitio de fosforilación C proteína quinasa

3 - 5 SrK

160 -162 TrK

187 -189 SyR

246 - 248 TwR

Sitio de fosforilación de caseína quinasa II

3 - 6 SrkD (SEQ ID NO: 86)

8 -11 TnqE (SEQ ID NO: 87)

240 - 243 SvsD (SEQ ID NO: 88)

246 - 249 TwrE (SEQ ID NO: 89)

Sitio de fosforilación de tirosina quinasa

19 - 27 RRNLEEDDY (SEQ ID NO: 90)

Sitio de N-miristoilación

133 -138 GVIAAI (SEQ ID NO: 91)

265 - 270 GTIHAL (SEQ ID NO: 92)

Secuencia de objetivo nuclear bipartito

4 - 20 RKDITNQEELWKMKPRR (SEQ ID NO: 93)

Tabla XXI: Características de Proteína de STEAP-1

	Programa Bioinformático	URL (Localizado en la Red Mundial en)	Resultado

ORF	ORF Zinder		1193 bp
Longitud de proteína			339 aa
Región transmembrana	TM Pred	(.ch.embnet.org/)	6 TM en aa 73-91, 120-141, 163-181, 218-236, 253-274, 286-304
	HMMTop	(.enzim.hu/hmmtop/)	6 TM en aa 73-90, 117-139, 164-182, 220-238, 257-274, 291-309
	Sosui	(.genome.ad.jp/SOSui/)	6 TM en aa 70-92, 114-136, 163-184, 219-241, 255-273, 292-313
	TMHMM	(.cbs.dtu.dk/services/TMHMM)	6 TM en aa 73-95, 117-139, 164-182, 218-240, 252-274, 289-311
Señal de péptido	Señal P	(.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)	Escinción potencial entre aa 136 y 137
pI	Herramienta pI/MW	(.expasy.ch/tools/)	9.2 pI
Peso molecular	Herramienta pI/MW	(.expasy.ch/tools/)	39.6 kD
Localización	PSORT	http://psort.nibb.ac.jp/	60% membrana de plasma, 40% golgi, 30%. retículo endoplásmico
	PSORT II	http://psort.nibb.ac.jp/	66% retículo endoplásmico, 11 % mitocondria, 11 % membrana de plasma
Motivos	Pfam	(.sanger.ac.uk/Pfam/)	ninguno
	Impresiones	(.biochem.ucl.ac.uk/)	Transformación del distintivo ras de proteína P21, distintivo de repetición de fibronectina tipo III
	Bloques	(.blocks.fhcrc.org/)	Repetición medio-A-TPR, distintivo de proteína de membrana de bomba de arsénico, repetición de proteína M

Tablas XXII - LI: Expuestas en la solicitud de Patente de Estados Unidos número 10/236,878; presentada 06-Septiembre-2002, los contenidos específicos están completamente incorporados aquí por referencia.

Tabla LII: Búsqueda de Péptidos

Variante 1 de STEAP 1:

nonámeros, decámeros y 15-meros: aa 1-339 (SEQ ID NO: 94)

```
MESRKDITNQ EELWKMKPRR NLEEDDYLHK DTGETSMLKR PVLLHLHQTA HADEFDCPSE      60
LQHTQELFPQ WHLPIKIAAI IASLTFLYTL LREVIHPLAT SHQQYFYKIP ILVINKVLPM      120
VSITLLALVY LPGVIAAIVQ LHNGTKYKKF PHWLDKWMLT RKQFGLLSFF FAVLHAIYSL      180
SYPMRRSYRY KLLNWAYQQV QQNKEDAWIE HDVWRMEIYV SLGIVGLAIL ALLAVTSIPS      240
VSDSLTWREF HYIQSKLGIV SLLLGTIHAL IFAWNKWIDI KQFVWYTPPT FMIAVFLPIV      300
VLIFKSILFL PCLRKKILKI RHGWEDVTKI NKTEICSQL                             339
```

Variante 2:

9-meros aa 247-258 (SEQ ID NO: 95)

WREFHYIQVNNI

10-meros aa 246-258 (SEQ ID NO: 96)
TWREFHYIQVNNI
15-meros aa 241-258 (SEQ ID NO: 97)
VSDSLTWREFHYIQVNNI

Variante 3:
9-meros aa 247- (SEQ ID NO: 98)
WREFHYIQIIHKKSDVPESLWDPCLTRFKGLNLIQS
10-meros aa 246- (SEQ ID NO: 99)
TWREFHYIQIIHKKSDVPESLWDPCLTRFKGLNLIQS
15-meros aa 241-(SEQ ID NO: 100)
VSDSLTWREFHYIQIIHKKSDVPESLWDPCLTRFKGLNLIQS

Variante 4:
9-meros aa 160-176 (SEQ ID NO: 101)
RKQFGLLSLFFAVLHAI
10-meros aa 159-177 (SEQ ID NO: 102)
TRKQFGLLSLFFAVLHAIY
15-meros aa 154-182 (SEQ ID NO: 103)
DKWMLTRKQFGLLSLFFAVLHAIYSLSYP

Tabla LIII: Composición de Exón de variante 1 de STEAP-1 (8P1D4)

Número de Exón	Comienzo	Fin
1	1	34
2	35	149
3	150	662
4	663	827
5	828	1176

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo o fragmento del mismo que comprende un sitio de enlace de antígeno que se enlaza específicamente a la proteína STEAP-1 (SEQ ID NO:).

2. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

3. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es designado X92.1.30.1.1 (1) y se le asignó un número de Acceso A.T.C.C. No.: PTA-5802.

4. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es designado X120.545.1.1 y se le asignó un número de Acceso A.T.C.C. No.: PTA-5803.

5. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 2, en donde el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humanizado.

6. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el fragmento es un fragmento Fab, $F(ab')_2$, Fv o Sfv.

7. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humano.

8. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el sitio de enlace de antígeno es un dominio de enlace de antígeno murino.

9. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, que se produce recombinantemente.

10. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 9, en donde la proteína recombinante comprende la región de enlace a antígeno.

11. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo está acoplado a un marcador detectable, una toxina, o un agente terapéutico.

12. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 11, en donde el marcador detectable es un radioisótopo, un quelante de metal, una enzima, un compuesto fluorescente, un compuesto bioluminescente o un compuesto quimioluminescente.

13. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 12, en donde el radioisótopo comprende ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{211}At, ^{125}I, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{213}Bi, ^{32}P, o Lu.

14. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 11, en donde la toxina comprende ricina, cadena A de ricina, doxorubicina, daunorubicina, un maitansinoide, taxol, bromuro de etidio, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colcicina, dihidroxi antracin diona, actinomicina, toxina de difteria, exotoxina de Pseudomonas (PE) A, PE40, abrina, cadena A de abrina, cadena A de modecina, alfa-sarcina, gelonina, mitogelina, retstrictocina, fenomicina, enomicina, curicina, crotina, calicheamicina, inhibidor de *sapaonaria officinalis*, glucocorticoide, auristatina, auromicina, itrio, bismuto, combrestatina, duocarmicinas, dolostatina, cc1065, o un cisplatino.

15. El anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1, en donde el sitio de enlace a antígeno se enlaza específicamente a un epítopo dentro de los amino ácidos de una proteína que tiene la secuencia de amino ácido de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, o SEQ ID NO: 35.

16. Un hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal de la reivindicación 2.

17. Un vector que comprende un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la reivindicación 2.

18. El vector de la reivindicación 17 que es de cadena sencilla, que comprende dominios variables de cadenas pesadas y ligeras.

19. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o fragmento de la reivindicación 1 en una forma de dosis de unidad humana.

20. Un ensayo para detectar la presencia de una proteína STEAP-1 en una muestra biológica, que comprende contactar la muestra con un anticuerpo de la reivindicación 1, y detectar el enlace de la proteína STEAP-1 (SEQ ID NO:) en la muestra.

21. Una composición que comprende siARN de STEAP-1 (ARN decatenario) que corresponde al ácido nucleico que codifica una proteína que tiene la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, o SEQ ID NO: 35.
o una subsecuencia de la misma, en donde la subsecuencia es de 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 nucleótidos de ARN contiguos de longitud y contiene las secuencias que son complementarias y no complementarias a al menos una porción de la secuencia que codifica mARN.

Figura 1: Secuencia STEAP-1 SSH de 436 nucleótidos (SEQ ID NO: 1)

```
  1 GTACAGCAAA AANGAAACTG AGAAGCCCAA ACTGCTTTCT TGTTAACATC CACTTATCCA
 61 ACCAATGTGG AAACTTCTTA TACTTGGTTC CATTATGAAG TTGGACAATT GCTGCTATCA
121 CACCTGGCAG GTAAACCAAT GCCAAGAAAG TGATGGAAAC CATTGGCAAG ACTTTGTTCA
181 TGACCAGGAT TGGAATTTTA TAAAAATATT GTTGATGGGA AGTTGCTAAA GGGTGAATTA
241 CTTCCCTCAG AAGAGTGTAA AGAAAAGTCA GAGATGCTAT AACAGCAGCT ATTTTAATTG
301 GCAAGTGCCA CTGTGGAAAG AGTTCCTGTG TGTGCTGAAG TTCTGGAAGG CAGTCAAATT
361 CATCAGCATG GGCTATTTGG TGCAAATGCA AAAGCACAGG TCTTTTTGGC ATGCTGGTCT
421 CTCCCGTGTC CTTATG
```

Figura 2

Figura 2A: El cADN (SEQ ID NO:2) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:3 de v1 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 68-1085 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ccgagactcacggtcaagctaaggtgagagtgggtggctgaagccatactatttttatag
   1      M  E  S  R  K  D  I  T  N  Q  E  E  L  W  K  M  K  P  E
  61 aattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAAACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTA
  20   R  N  L  E  E  D  D  Y  L  K  K  D  T  G  E  T  S  N  L  K
 121 GGAGAAATTTAGAAGAAGACGATTATTTGCATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAA
  40   R  P  V  L  L  K  L  K  Q  T  A  E  A  D  E  F  D  C  P  S
 181 AAAGACCTGTGCTTTTGCATTGCACCAAACAGCCCACTGCTGATGAATTTGACTGCCCTT
  60   E  L  Q  E  T  Q  S  L  F  P  Q  W  E  L  F  I  K  I  A  A
 241 CAGAACTTCAGCACACACAGGAACTCTTTCCACAGTGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTG
  80   I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T  L  L  K  E  V  I  H  P  L  A
 301 CTATTAAGCATCTCAGCTTTCGTTACACACTCTACTGAGGGAAGTAATTCACCCTTTAG
 100   T  S  E  Q  Q  Y  F  Y  K  I  P  I  L  V  I  E  K  V  L  P
 361 CAACTTCCCATCAACAGATTTTTATAAAATTCCAATCCTGGTCATCACAAAGTCTTGC
 120   N  V  S  I  T  L  L  A  L  V  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V
 421 CAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGGTTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTG
 140   Q  L  K  E  G  T  K  Y  K  K  F  P  E  W  L  D  K  W  M  L
 481 TCCAACTTCATAATGGAACCAAGTATAAGAAGTTTCCAGAATGGTTGGATAAGTGGATGT
 160   T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F  F  F  A  V  L  E  A  I  Y  S
 541 TAACAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTTTCTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATA
 180   L  S  Y  P  M  R  R  G  Y  R  Y  K  L  L  E  W  A  Y  Q  Q
 601 GTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACAGATACAAGTTGCTAAACTGGGCATATCAAC
 200   V  Q  Q  E  K  E  D  A  W  I  E  E  D  V  W  R  M  E  I  Y
 661 AGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGATTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAAGATT
 220   V  S  L  G  I  V  G  L  A  I  L  A  L  L  A  V  T  S  I  P
 721 ATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAATACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATTTATC
 240   S  V  S  D  S  L  T  W  R  E  F  E  Y  I  Q  S  K  L  G  I
 781 CATCTGTGAAGTGACTCTTTGACATGGAAGAATTCACATATTCAGAAGCAAGCTAGAAA
 260   V  S  L  L  L  G  T  I  E  A  L  I  F  A  W  E  K  W  I  D
 841 TTGTTTCCCTTCTACTGGCACAATACACGCATTGATTTTGCCTGGAATAAGTGGTAG
 280   I  K  Q  F  V  W  Y  T  P  P  T  F  E  I  A  V  F  L  P  I
 901 ATAAGAAACAATTTGTATGGTGGATACCTCCAACTTTCATGATAGCAGTTTTCCTTCCAA
 300   V  V  L  I  F  K  S  I  L  F  L  P  C  L  K  K  K  I  L  K
 961 TTGTTGTCCTGAGATTTAAAGCATACTATTGCTGCCATGCTGGGGAAAAAGATACTGA
 320   I  K  E  G  W  E  D  V  T  K  I  N  K  T  E  I  C  S  Q  L
1021 AGAATTGGACATGGTTGGGAAGACGTCACCAAAATTAACAAAACTGAAGAATGTTCCCAGT
 340   *
1081 TGTAGaattactgtttagaacaatttttgttcaatattgatatatttttatcaaccaaaatt
1141 tcaagtttgtatttgttaatgaaatgattacaaggaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Figura 2B: El cADN (SEQ ID NO:4) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:5) de v.2 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-872 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ggggcctgcaccctctgggcagcatgcgggcagccgagactccaggtccaggctaggtgaaga
   1                                           M  E  S  R  K  D  I  T  E
  61 gtgggtgggctgaagccatacctatttttatagcattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACGA
  10  Q  E  E  L  W  K  M  K  P  R  E  E  L  E  E  D  D  Y  L  E
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTGAGGAGGAATTAGAAGATGACTATTTGC
  30  K  D  T  G  E  T  S  E  L  K  E  P  V  L  L  E  L  E  Q  T
 181 ATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAGAGCCTGTGCTTTTGCATTGCACCAAA
  50  A  E  A  D  E  F  D  C  P  S  E  L  Q  E  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCCATGCTCGTGATTTGACTGCCCTCGAGACTTCAGCACACAGGAGACTCTTTC
  70  Q  W  E  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTTCCAATAAAATAGCTGCTATTATAGCAGCCCCTGACTTTCTTTACA
  90  L  L  R  E  V  I  E  P  L  A  T  S  E  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTTATAAAA
 110  P  I  L  V  I  E  K  V  L  P  E  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCAAGAAGTCTTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  E  N  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTCATAATGGAACCAAGTATAAGA
 150  F  P  E  W  L  D  K  W  M  L  T  E  K  Q  F  G  L  L  S  F
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
 170  F  F  A  V  L  E  A  I  Y  S  L  S  Y  P  K  E  E  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTGTAGTGCATGCAATTTATGCATCTGTGCTTCCCAATGAGGGGATGCTACA
 190  Y  K  L  L  E  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  W  K  E  D  A  W  I
 661 GATACAAGTTGCTAAACTGGGCATTCCAACGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGA
 210  F  E  D  V  W  R  M  E  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGGAGTGGTGTTTGGAATGGTGATTTATGTCTCTGGGATTGTGGGATTGGCAA
 230  L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  E  V  S  D  S  L  T  W  R  E
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCAATCCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGG
 250  F  E  Y  I  Q  V  M  M  I  *
 841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAATATATTAaataaccctaagaggtaaatcttctttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaattaccccataaaaaataaaaatgttttcaa
 961 agcaaaagatcttataattgttccaattaataatgtgtcttcctgttgttttccctattg
1021 cttctaattaggacaagtgtttcctagaaataaataaaaggcattaaaatattctttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaagcgattctcctgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcgcccacca
1261 accatgtccagctaattttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctggga
1381 ttacaggttgtgagccaccacgcctagcctgtctttctaatatttgaaaattgttagaca
1441 atttgctaccatctaatgtgtatattttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaaatattcttttaccatgtcaccctgaatttagtaatgccttttatgttaccaaaat
```

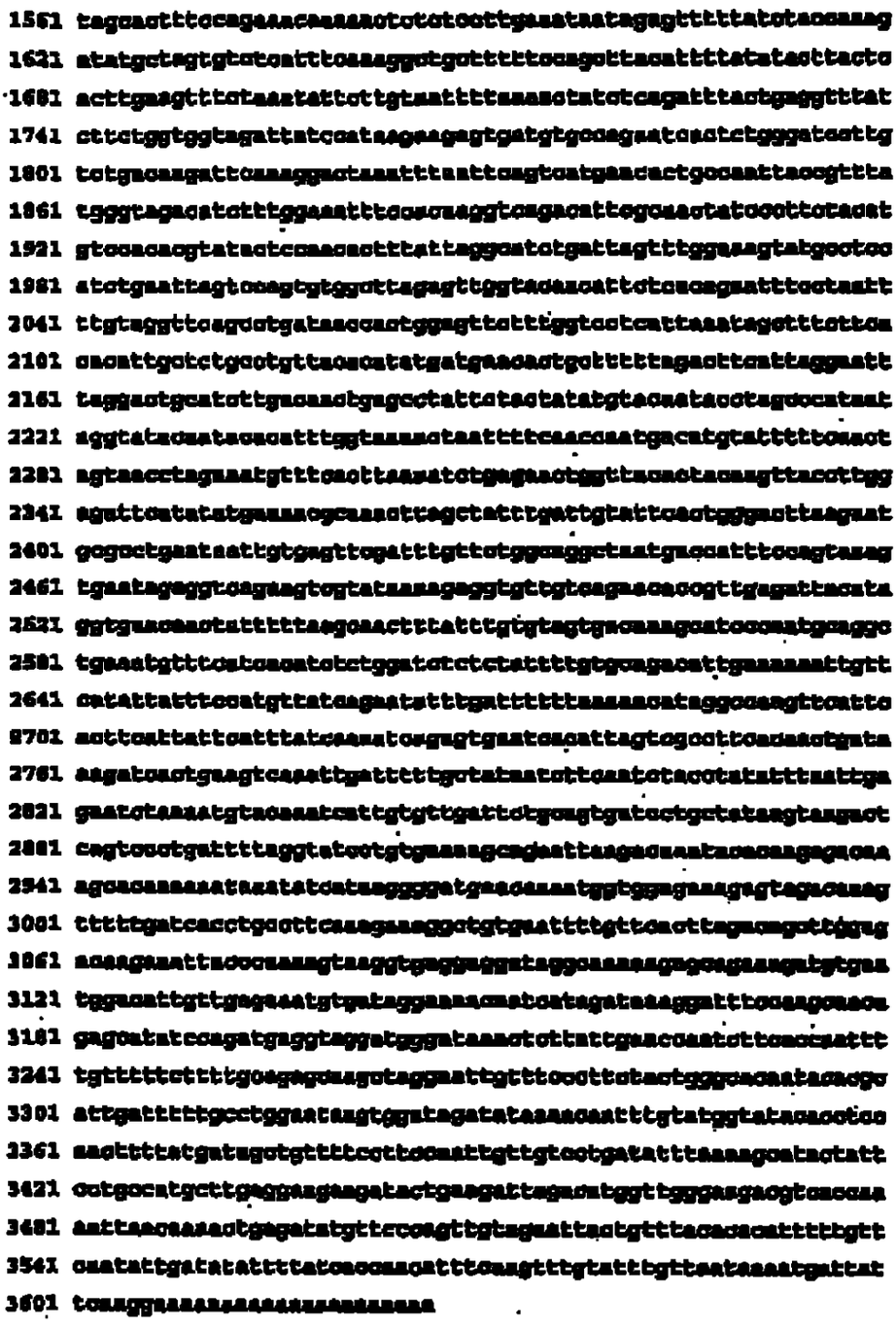
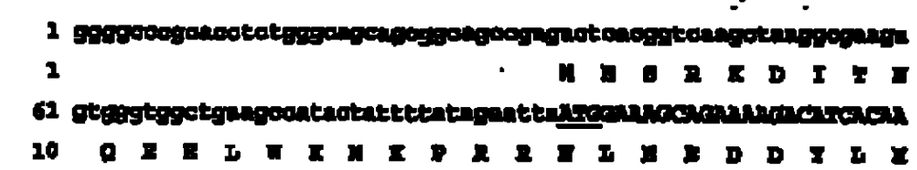


Figura 2C. El cADN (SEQ ID NO:6) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:7) de v.3 de STEAP-1 La metionina está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 96-944 incluyendo el codón de detención.



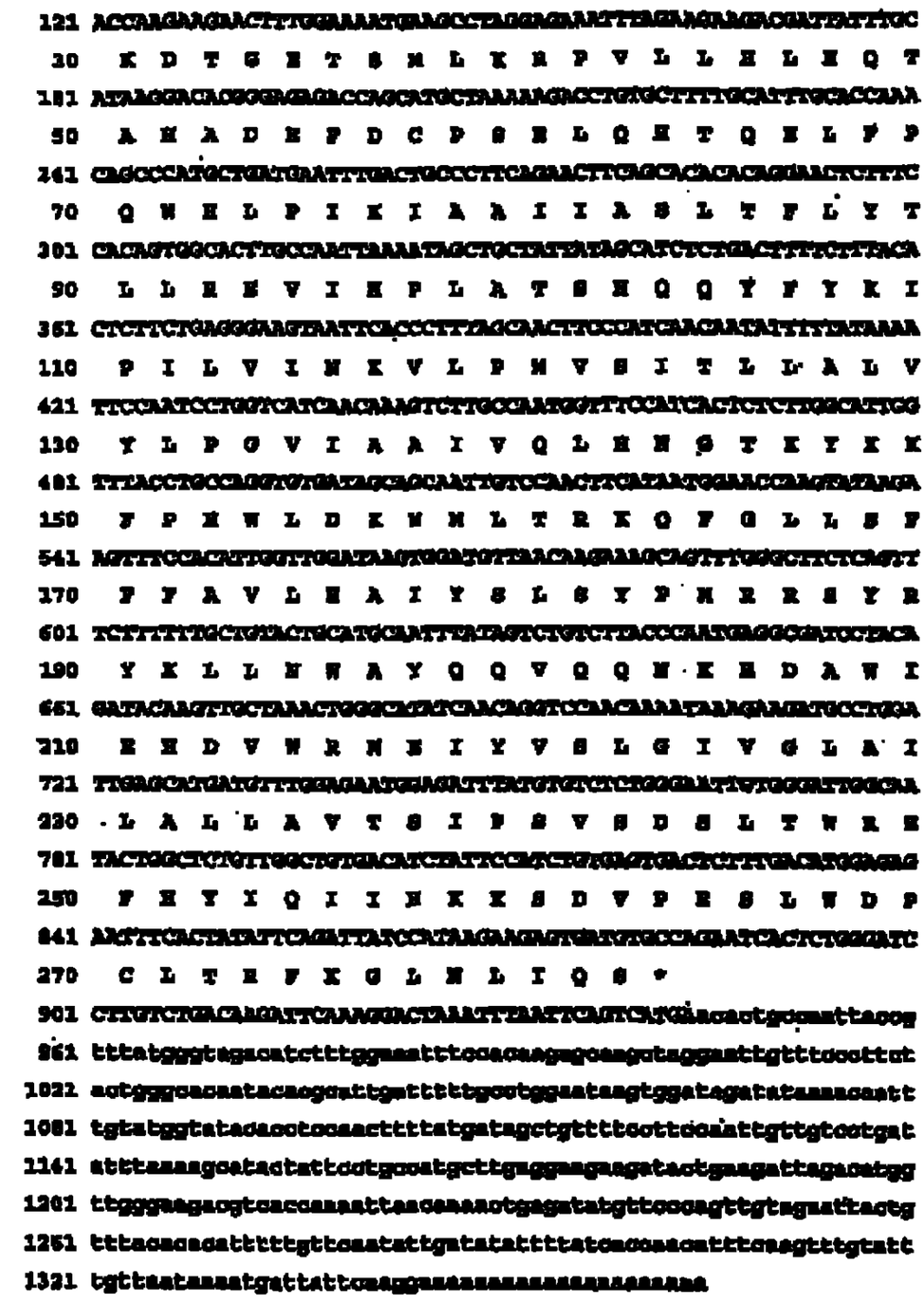
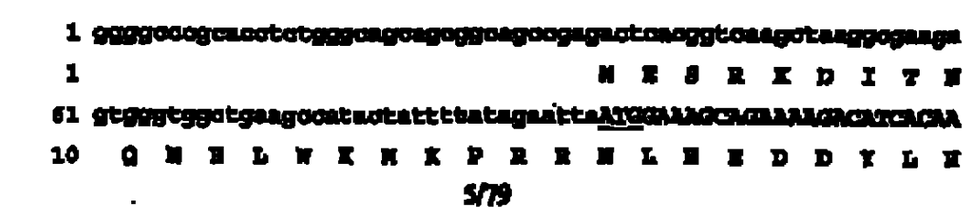


Figura 2D. El cADN (SEQ ID NO:8) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 9) de v.4. de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucleico 95-872 incluyendo el codón de detención.



```
121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTAGGAGAAATTAGAAAAAGCGATTATTGC
 30   K  D  T  G  E  T  S  K  L  K  R  P  V  L  L  H  L  H  Q  T
181 ATAAGCACACGGGAGAACCAGCATGCTAAAAAGCCTGTGCTTTGCATTGCACCAAA
 60   A  K  A  D  E  F  D  C  P  S  K  L  Q  K  T  Q  K  L  F  P
241 CAGCCCATGCTGATGAATTGACTGCCCTCAAAACTTCAAGCACACAGAAAACTCTTTC
 70   Q  W  K  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
301 CACAGTGGCACTTGCCAATAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
 90   L  L  R  M  V  I  K  P  L  A  T  S  K  Q  Q  Y  F  Y  K  I
361 CTCTTCTGAGGAAATAATTCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTTATAAAA
110   P  I  L  V  I  M  K  V  L  P  N  V  S  I  T  L  L  A  L  V
421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
130   Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  G  G  T  K  Y  K  K
481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATGAATGGAACCAAGTATAAGA
150   F  P  K  W  L  D  K  W  K  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  L
541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
170   F  F  A  V  L  H  A  I  Y  S  L  S  Y  P  M  R  R  S  Y  R
601 TGTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATAGTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
190   Y  K  L  L  N  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  K  E  D  A  W  I
661 GATACAAGTTGCTAAACTGGCATATCAACAGGTCCAACAAATAAAAGAAGATGCCTGGA
210   E  K  D  V  W  R  K  E  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
721 TTGAGCATGATGTTTGGGAATGGAGATTTATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
230   L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  E
781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCGATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
250   F  E  Y  I  Q  V  E  N  I  *
841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATATATTATAAaataacccctaagaggtaaatatttatttt
901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaattttacccaataaaaaataacaaatgtttttcaa
961 cagcaaagatattatacttgttccaattaataatgtgcctctcctgttgtttttcctattg
1021 attctaattaggaccagtgtttcctagaaataaaataaaaggcattaaaatatttttttgtt
1081 ttttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcgcgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcgcccacca
1261 ccatgtcccagctaattttttgtatttttagtagagacgggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggg
1381 ttacaggttgtgagccaccacacctcggcctgctattttctaatatttgaaaacttgttagaca
1441 atttgctaccatctaatgtgatatttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttacctgtcaacctgaatttagtaatgccttttatgttaccaaaact
1561 tagcactttccagaaacaaaaaactctctcttgaaataatagagtttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgttttccagcttacattttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaattttaaaaatatctcagatttactgaggtttat
1741 ctcctggtggtagattatccatagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatcattg
1801 tctgaccaagattcaaaggactaaattttaattcagtcatgaaccactgccaatttacagtttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccaccaaggtcagccattgccaactatcccttctacat
```

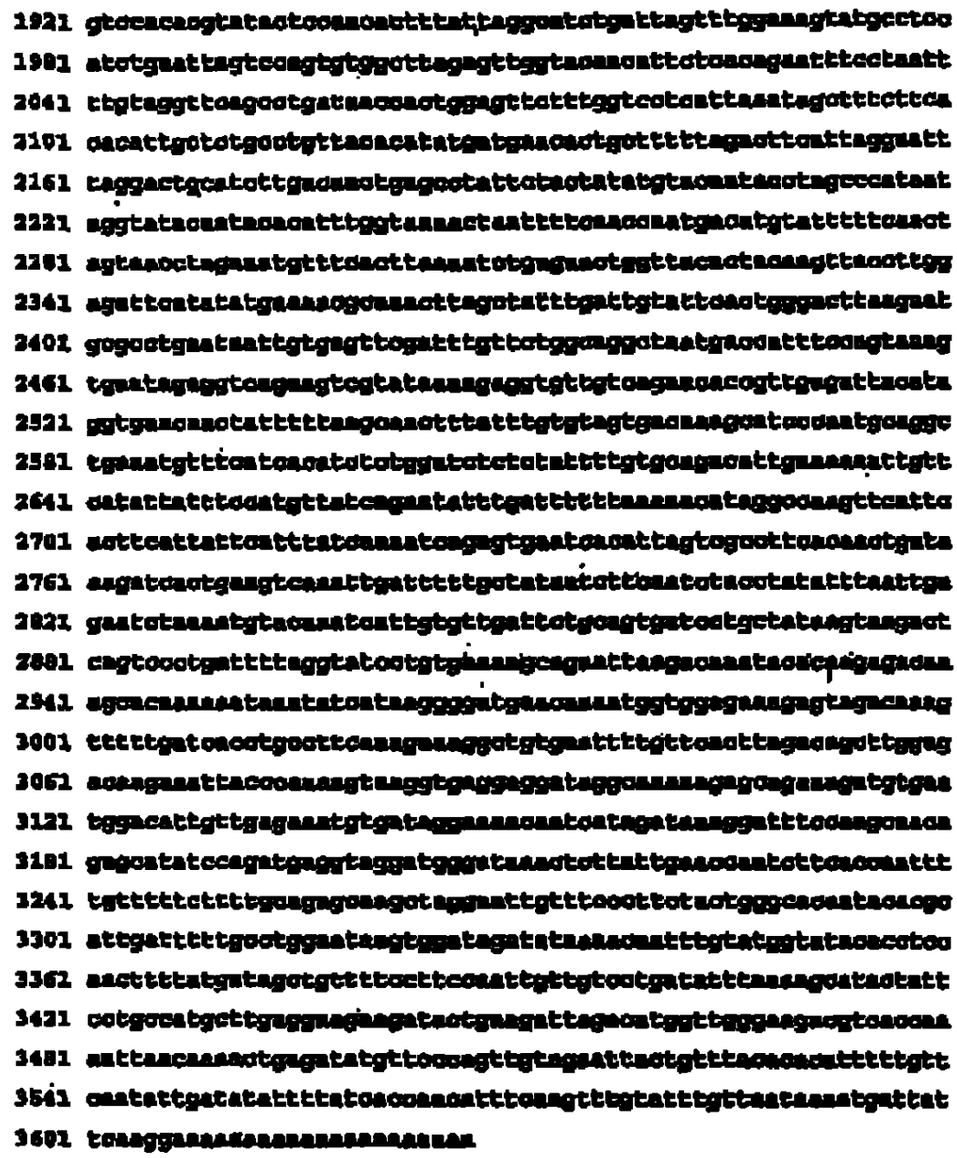
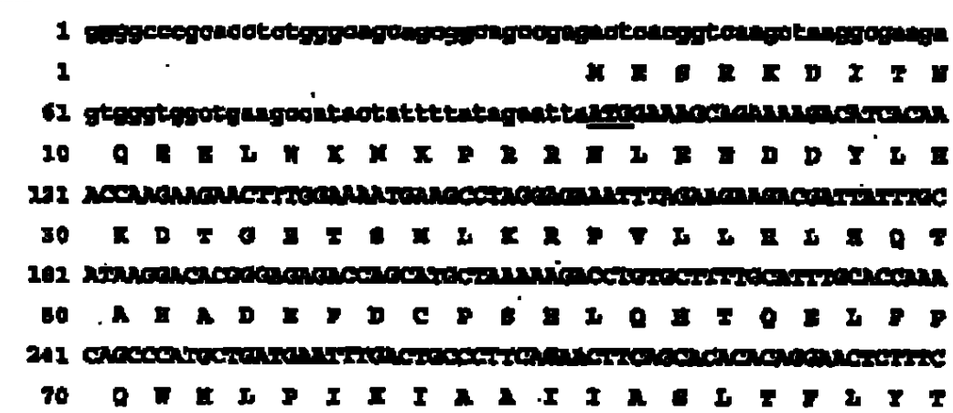


Figura 2E. El cADN (SEQ ID NO:10) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 11) de v.5. de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

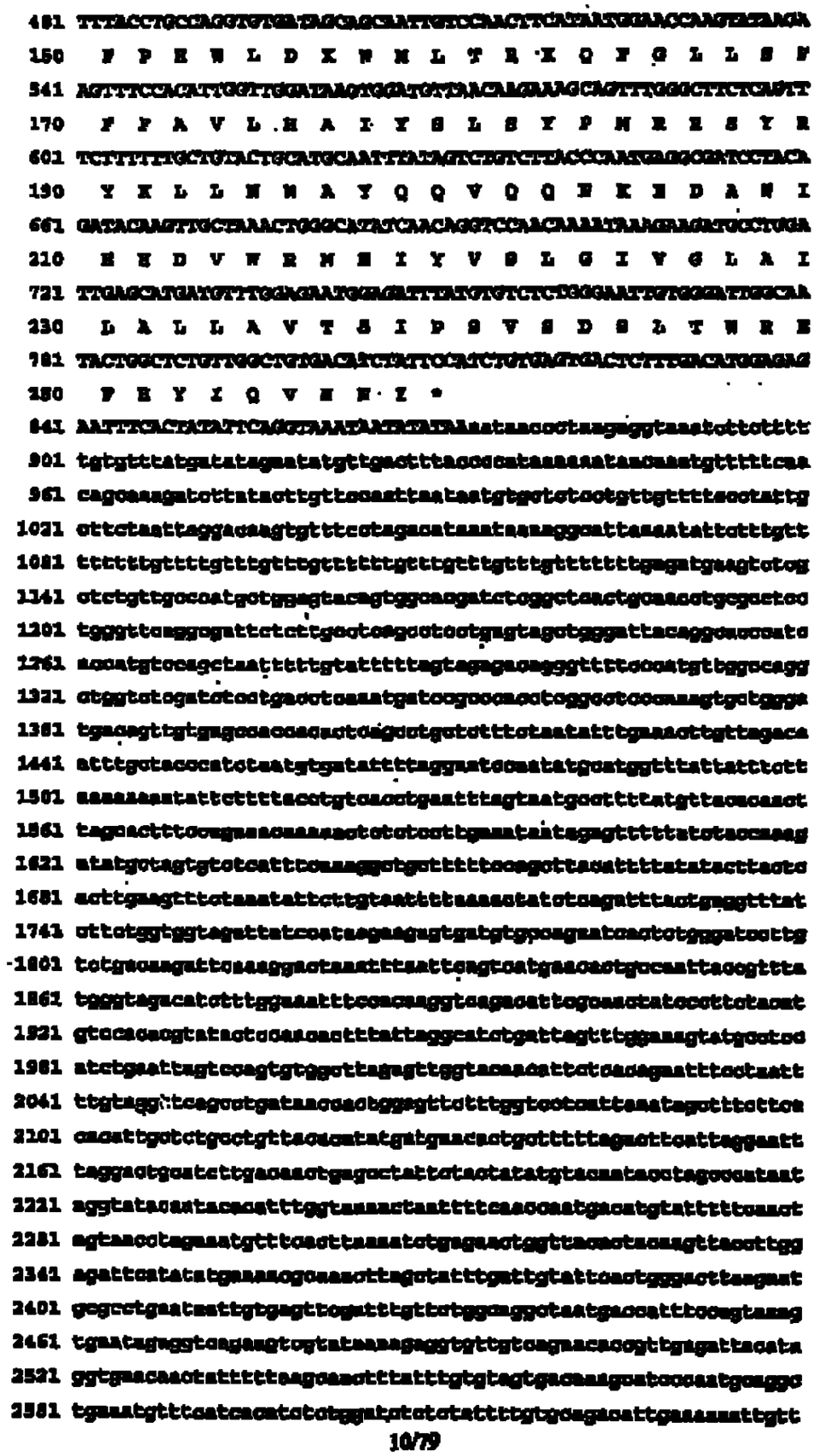


```
301 CACAGTGGCACTTGCCAATAAAATAGCTGCTCTTGAGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
 90   L  L  R  E  V  I  N  P  L  A  T  S  H  Q  Q  Y  F  Y  K  I
361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATTGACCCTTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTATAAAA
110   F  I  L  V  I  N  K  V  L  P  N  V  S  I  T  L  L  A  L  V
421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
130   Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  N  G  T  K  Y  K  K
481 TTTACCTGCCAGGGTGTAATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACAAAGTATAAA
150   F  P  K  W  L  D  K  W  N  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F
541 AGTTTCCACAATTGGTTGGATAAGTGGAATGTTAACAAGAAACAACGTTTGGGCTTCTCAGTT
170   F  F  A  V  L  R  A  I  Y  S  L  S  Y  P  N  R  R  S  Y  R
601 TCTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATAGTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
190   Y  K  L  L  N  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  N  K  N  D  A  W  I
661 GATACAAGTTGCTAACTGGGCATATCAACAGGTCCAACAAAATAAAAATGATGCTTGGA
210   N  K  D  V  W  R  M  N  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
721 TTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAGATTTATGTGTCTCCGGGATTGTGGGATTGGCAA
230   L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  N
781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCGATTCCACTCGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGA
250   F  K  Y  I  Q  V  K  N  I  *
841 AATTTCACTATTTCAGGTAAATAATATATTAaaataacccctaagaggtaaatatttttttt
901 tgtgtttatgatatagaatatgttgatttaccccatacaaaaataccaaatgtttttcaa
961 cagcaaagatatttatacttgttccaattaataatgtgctctcctgttgttttcctattg
1021 cttctaattaggacaagtgttcctctagcatiaatcaaaggcattaaaatatttttgtt
1081 ttttttttttgttgttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccaatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccatc
1261 accatgtcccagctaattttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatgttggccag
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggg
1381 tgacagttgtgagccaccacacctcagcctgtctttctaatatttgaaactgttagaca
1441 atttgctacccatctaatgtgatatttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaaatattcttttaactgtcaactgaatttagtaatgccttttatgttaccaaact
1561 tagcactttccagaaacaaaaactctctcctgaaatcatagagtttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctaatttcaaaggctgcttttccagcttacatttttatatacttacta
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccataggaggtgatgtgccagaatccatctgggatcattg
1801 tctgacaagattcaaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaattaccgttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccacaaggtcagacattgcaaactatccattctacat
1921 gtccacaggtatactccaacactttactaggcatctgattagtttggtaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtaccaccattctccacgaatttcctcaatt
2041 ttgtaggttcagcctgataaccaactggagttatttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgctctgcctgttaccaatatgatgaaaactgctttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgaccaactgagcctattctactatatgtaccatacctagcccataat
2221 aggtatacaatacacatttggtaaaactaatttttcaaccaatgacatgtattttcaaact
```

2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttacaactacaagttacctgg
2341 agattcatatatgaaaacgcaaacttagctatttgattgtattcaatgggacttaagaat
2401 gcgcctgaataattgtgagttcgatttgttctgggcagggctaatgaccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagaggtgttgtcagaacaccgttgagattaccta
2521 ggtgaacaactatttttaagcaacttttatttgtgtagtgaaaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaaatgtttcatcacatctctggatctctctatattttgtgcagacattgaaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgatttttttaaaaacataggccagttcattc
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcaacattagtcgccttcaaaactgata
2761 aagatcactgaagtcaaattgatttttgctatcatctcaatctcacctatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtcccaaatcattgtgttgatttctgcagtgatcctgctatacagtaagact
2881 cagtccctgatttttaggtatcctgtgcaaaagcagcaattaagacaaatacacaagtgacaa
2941 agcacaaaaaaaatacaatatcatcaaggggatgaacaaaatggtggaggaaagagtagacaaag
3001 ttttttgatcaacctgcctttcaaagaaaggctgtgaatttttgttcacttagacagcttggag
3061 acaagaaattacccaaaagtaaggtgaggaggataggcaaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacaatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaaccaatcttcaccaatttt
3241 tgttttttctttgtagagcaagctaggaattgtttccccttctactgggcaacaatacacgc
3301 attgatttttgcctggaataagtggatagatataaaacaatttgtatggtatacaacctcc
3361 aacttttatgatagctgttttccttccaaattgttgtcctgatatcttaaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagacatggttgggaagacgtcaccaa
3481 aattaccaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttacaacaccattttgtt
3541 caatattgatatattttatcacccaacatttcaagtttgtatttgttaataaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 2F El cADN (SEQ ID NO: 12) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 13) de v.6. de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 98-872 incluyendo el codón de detención.

1 gggccacgcacctctgggcagcagcggcagccgagactcacggtcaagctaaggcgaaga
1 M E S R K D I T Y
61 gtgggtggctgaagccatactatttataggaattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAA
10 Q E E L W K M K P E R W L E E D D Y L K
121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTGAGCGAATTTAGAAAGAAGCGCTTATTGC
30 K D T G E T S M L K R P V L L K L E Q T
181 ATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTGCATTTGCACCAAA
50 A E A D E F D C P S E L Q K T Q E L F P
241 CAGCCCATGCTGATGATTGACTGCCCTTCAGAACTTCAGGACACACAGGAACTCTTC
70 Q W E L P I K I A A I I A S L T F L Y T
301 CACATGGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTGCTATTATGCATCTCTGACTTTCTTTACA
90 L L R E V I E P L A T S E Q Q Y F.Y K I
361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATTCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAAATTTTATAAAA
110 P I L V I E K V L P M V S I T L L A L V
421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
130 Y L P G V I A A I V Q L E E G T K Y K K



```
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgatttttttaaaaaacataggccagttcattc
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcaacattagtcgccttcaaaactgata
2761 aagatcactgaagtcaaattgatttttgctatcatcttcaatctacctatatttaattgta
2821 gaatctaaaatgtacaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctataagtaagact
2881 cagtcacctgatttaggtatcctgtgaaaagcagaattaagacaaatacaacaagagacaa
2941 agcacaaaaaaataaatatcataggggatgaacaaaatggtggagaaagagtagacaaag
3001 ttttgatcaacctgacttcaaagaaaggctgtgaatttgttcacttagaagcttggag
3061 acaagaaattaccccaaagtaaggtgaggaggataggcaaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacaatcatagataaaggatttcaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaaccaatcttcaacaattt
3241 tgtttttgttttgcagagcaagctaggaattgtttcccttctactgggcaaataccagc
3301 attgatttttgcctggataagtggatagatataaaacaatttgtatggtatacacctcc
3361 aacttttatgatagctgttttccttccaattgttgtcctgatatttaaaagcatactatt
3421 catgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagacatggttgggaagcgtcaccaa
3481 aattaacaaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttacacacatttttgtt
3541 caatattgatatatttttatcaccaacatttcaagtttgtatttgttaatcaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Figura 2G. El cADN (SEQ ID NO:14) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:15) de v.7 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ggggccccgcaacctctgggcagcagcgggcagccgagactccaggtcaagctaaggcgaaga
   1                                                M  E  S  R  K  D  I  T  E
  61 gtgggtggctgaagccatactattttatagaattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAA
  10  Q  E  E  L  W  K  M  K  P  R  R  E  L  E  E  D  D  Y  L  E
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTAGCAGAAATTTACAAAAAGACGATTATTTC
  30  K  D  T  G  E  T  S  E  L  K  P  V  L  L  E  L  K  Q  T
 181 ATAAGGACAGGGAAAGACCAGCATCTCAAAAAGACCCTGTGCTTTGCATTGCACCAAA
  50  A  E  A  D  E  Y  D  C  P  S  E  L  Q  E  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCCATGCTGATAAATTGACTGCCCTTCAGAACTCAGCAACAGAGGAACTCTTTC
  70  Q  W  E  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTTGCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
  90  L  L  R  E  V  I  E  P  L  A  T  S  H  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATTCACCCCTTAGCAACTGCCATCAACAATATTTTTTATAAA
 110  P  I  L  V  I  E  K  V  L  P  M  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCACAAAGTCTTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  E  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATGAAGGAACCAAGTATAAGA
 150  F  P  E  W  L  D  K  W  K  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  Y
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGGTAAGTGGATGTCAACAAAAGCAGTTTGGGCTTCTCTCATT
 170  F  F  A  V  L  E  A  I  Y  S  L  S  Y  P  M  R  R  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATAGCTGTCTTACCGATGAGGCGATCCTACA
 190  Y  K  L  L  E  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  E  K  E  D  A  W  I
```

```
 661 GATACGAGTTGCTAAACTGGGCATATCAACAGGTCCAACAAATAAAGAAGATGCCTGGA
 210   E  H  D  V  W  K  H  S  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGAGCATGATGTTTGGAAATGGAAGATTTATTGGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
 230   L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  E
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
 250   F  K  Y  I  Q  V  K  E  I  *
 841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAATATATAAaataaccctaagaggtaaatcttcttttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaattttaccccatcaaaaaatacaaaatgtttttcaa
 961 cagcaaagatcttatacttgttccaattaataatgtgctctcctgttgttttccctattg
1021 cttctaattaggacaagtgtttcctagacataaataaaaggcattaaaatattcttttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgtttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcctgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccatc
1261 accatgtccagctaatttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggA
1381 tgacagttgtgagcccaccacctcagcctgctctttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgccacccatctaatgtgatatttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttaccgtcacctgatttagtaatgccttttatgttacacaaact
1561 tagcactttccagaaacaaaaactctctcttgaaataatagagtttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgctttccagcttacatttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaattttaaaatatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccatagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgccagattcagaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaattacggttta
1861 tgggtagacatctttgggaatttccacaaggtcagacattgcaaactatccattctacat
1921 gtccacacgtatactccaacactttattaggatctgattagtttggaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagcgtggcttagagttggtacaaacattctcacagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgataaccactggagttctttggtcctcattaaatagcttcttca
2101 cacattgctctgcctgttcacactatgatgaacactgcttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgatatttgcaacctgagcctattctactatatgtacaatacctagcccatact
2221 aggtatacaatcacacatttggtaaaactaatttcaaccaatgacatgtatttttcaact
2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttacactacaagttacctgg
2341 agattcatatatgaaaacgcaaacttagctatttgattgtattcactgggacttaagaat
2401 gcgccatgaataattgtgagttgattttgttctggcaggctaatgacaatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtatcaaaagaggtgttgtcagaacacccgttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttagcaactttattttgtgtagtgacaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatccacatctctggatctctctatttttgtgcaggacattgaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgattttttaaaaacataggccagttaatta
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatccacattagtcgcctttcacaactgata
2761 agatccatgaagtcaaattgattttgctatattatcttcaatctaactatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtacaaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctataagtaagact
2881 cagtcctgattttaggtatcctgtgaaaagcagattaagacaaatacacaagagcaa
2941 agcacaaaaaatagatatcataggggatgaacaaaatggtggagaaagagtagacaaag
```

```
3001 tttttgatcaaatgcattcaaagaaaggctgtgaatttgttcaattagacagattggag
3061 acaagaaattaccaaaagtcaggtgaggaggataggcaaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgatagggaaaacaatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacaaatcttcaccaattt
3241 tgtttttctttgcagagcaagctaggaattgtttccctctactgggcaccataccacgc
3301 attgatttttgcctggaataagtggatagatataaaacaatttgtatggtataccacctcc
3361 aacttttatgatagctgttttccttccaattgttgtcctgatatttcaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagcatggttgggaagcgtcaccaa
3481 aattaacaaaactgagatatgttcccagttgtagaatttctgtttaccaccatttttgtt
3541 caatattgatatatttatcaccaaaatttcaagtttgtatttgttaataaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Figura 2H. El cADN (SEQ ID NO:16) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 17) de v.6, de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ggggccccgcaccatctgggaagcagcggcagccgagactccacggtccaagctaaggcgaaga
   1                                       M  E  S  R  K  D  I  T  E
  61 gtgggtggctgaagccatactatttatagaattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAA
  10  Q  E  E  L  W  K  E  K  P  E  R  E  L  E  E  D  D  Y  L  E
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTGAGGAAAATTTGAAAAAGACGATTATTTGC
  30  K  D  T  G  E  T  E  E  L  K  R  P  V  L  L  E  L  E  Q  T
 181 ATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAAAGACCTGTTGCTTTTGCATTGGACCAAA
  50  A  E  A  D  E  F  D  C  P  S  E  L  Q  E  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCCCTGCTGATGAATTTGACTGCCCTTCGGAACTTCAGCACACAGAGGAACTCTTTC
  70  Q  W  E  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
  90  L  L  R  E  V  I  E  P  L  A  T  S  K  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATTCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTTATAAAA
 110  F  I  L  V  I  E  K  V  L  P  N  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  E  N  G  T  K  Y  K  K
 481 TTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTCCTATATGGAACGAGTATAAGA
 150  F  P  E  W  L  D  K  W  M  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
 170  F  F  A  V  L  E  A  I  Y  S  L  S  Y  P  N  R  R  S  Y  R
 601 TCTTTTTGCTGTACTGCATGCATTTAGAGTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
 190  Y  K  L  L  N  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  N  K  E  D  A  W  I
 661 GATACAAGTTGCTAAACTGGGCAATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGA
 210  E  N  D  V  W  R  M  K  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGGGCATAATGTTTGGAGTATGGAGATTAATGTGTCTCTGGAAATTGTGGGATTGGCAA
 230  L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  E
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGGCATCAATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
 250  F  E  Y  I  Q  V  M  N  I  *
```

```
 841 AATTTCACTAATTCAGGTAAATAATATAAaaataaccctaagaggtaaatcttctttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgacttaccccataaaaaataacaaatgttttcaa
 961 cagcaaagatcttatacttgttccaattaataatgtgatctcctgttgttttcccatttg
1021 cttctaattaggacaagtgtttcctagacatcaaataaaaggcattaaaatatttcttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgtttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctccttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccatc
1261 accatgtccagctaatttttgtatttttagtagagacgggtttcccatgttggccagg
1321 ctggtctgaatcttctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggA
1381 tgacagttgtgagccaccacactcagcctgatatttctaatatttgaaacttgttagata
1441 atttgctacccatctaatgtgatatttaggaatccaatatgcatggtttattatctctt
1501 aaaaaaaatattctttaccctgtcacctgaatttagtaatgccttttatgttcacacact
1561 tagcacttccagaaacaaaactctctcctgaaataatagagttttatctaccaaag
1621 ttatgctagtgtctatttcaaaggctgcttttccagcttacattttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaatattcttgtaatttcaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagactatccatagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgacaagattccaaggactaatttaattcagtcatgaacactgccaattacggttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccacaaggtcagacattgcaaatatcccttctcaat
1921 gtccacacgtatactccaacactttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcb
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtacaacattctcaacagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgatacccactgggttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgttctgcatgttacacatatgatgtacactgctttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgcccactgagcctattctactatatgtacaatacctagcccataat
2221 aggtatacaatacacatttggtaaacctaattttcaaccaatgcacatgtatttttcaact
2281 agtaccatgaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttcacctacaagttacctgg
2341 agattcatatatgaaaacgcaaattagctatttgattgtattcacctgggacttaagaat
2401 gagcctgataattgtgagttcgattgttctggcaggctatgacccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagaggtgttgtcagaacacagttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttaagcaacttttattgtgtagtgacaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatcaccatctctggatctctctatttgtgcagcattgaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgattttttaaaaacataggccaagttcattc
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcacattagtgccttcacaactgata
2761 agatcactgagtcaaattgatttttgctatattatcttgatctacctatatttattga
2821 gaatctaaaatgtacaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctatagtaagact
2881 cagtcccctgatttaggtatcctgtgaaaagcagaattagcacaaatacacaagagcaa
2941 agcacaaaaaatacatatctataggggatgaacaaaatggtggagaagagtagcaaaag
3001 ttttgatcacctgccttcaaagaaaggctgtgaattttgttcacttagcagcttggag
3061 acaagaaattacccaaaagtaagtgaggaggataggcaaaaagagcagaagagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgatagggaaacaatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacaaatttcacccaattt
3241 tgttttttcttttgcagagcaagctaggaattgtttcccttctactgggcacaatacacgc
3301 attgatttttgcctggaatagtggatagatataaaacaatttgtatggtatacacctcc
```

```
3361 aacttttatgatagctgttttccttccaattgttgtcctgatatttaaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagcatggttgggaagacgtcaccaa
3481 aattaacaaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttaccacacatttttgtt
3541 caatattgatatatttttatcaccaaaatttcaagtttgtatttgttaatcaaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
```

Figura 2 | El cADN (SEQ ID NO:18) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:19) de v.8 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ggggccccgcacctctgggcagcagcggccagccgagctccacggtccaagctaaggcgaaga
   1                                           M  E  S  R  K  D  I  T  N
  61 gtcggctggctgaagccatactatttttatagaattaATGGAAAGCCGCAAAAAGACATCACAA
  10  Q  E  E  L  W  K  M  K  P  E  R  N  L  E  E  D  D  Y  L  E
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTGAGGCGAATTTGGAAGACGACCTCGAATTTGC
  30  K  D  T  G  E  T  S  M  L  K  E  P  V  L  L  E  L  E  Q  T
 181 ATAAGGACACCGGCGAGACCAGCATGCTAAAAGAGCCTGTGCTTTTGGAATTGGAGCAAA
  50  A  K  A  D  E  F  D  C  P  S  E  L  Q  H  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCCATGCTGATGAATTTGACTGCCCTTCAGAACTTCAGCACACAGGAACTCTTTC
  70  Q  W  K  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTTGCCAATAAAATAGCTGCTATTACAGCATCTCTGACTTTTGTTGCA
  90  L  L  K  E  V  I  H  P  L  A  T  S  N  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTATTGAGGAAGTAATTCAGCCCTTGGCAACTTCCATCAACAATATTTTTATAAAA
 110  P  I  L  V  I  E  K  V  L  P  N  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCATCACTCTCTTGGCATTG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  N  N  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACCAAGTATAAA
 150  F  P  E  W  L  D  K  W  N  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  Y
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGCTAGATGGATTTAACAAGAAGCAATTTGGGCTTCTCAGTT
 170  F  F  A  V  L  E  A  I  Y  S  L  S  Y  P  M  R  R  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTGTACTGCAAGCAATTTATGTCTGCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
 190  Y  K  L  L  N  W  A  K  Q  Q  V  Q  Q  N  K  E  D  A  W  I
 661 GATACAAGTTGCTAACTGGGCAATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGAAGCATGCCCAGA
 210  E  H  D  V  W  R  M  E  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGGCATTTATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
 230  L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  E
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTTGCATCTATTCCAATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGG
 250  F  K  Y  I  Q  V  N  N  I  *
 841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAAATATAAaataaccctaggaggtaaatattcttttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgactttaccccatacaaaatatacaaatgtttttcaa
 961 cagcaaagatcttatacttgttccaattataatgtgatctcctgttgtttcccctattg
1021 cttctaattaggacaagtgtttcctagacatcaatataaaaggcattaaaatattctttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgttgtttgttttttgagatgtagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
```

1201 tgggttcaggcgattctctttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcgcccgctc
1261 acccatgtccagctaatttttgtatttttagtagagacgggtttcaccatgttggccaggc
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggat
1381 tgacagttgtgagccaccacacctggcctgctctttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgctacccatctaatgtgatatttaggaatccaatatgccatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttacctgtcacctgaatttagtaatgccttttatgttacacaact
1561 tagcactttccagaaacaaaaactctctccttgaaatattagagtttttatctacaaag
1621 atatttctagtgtctcatttcaaaggctgtttttccagcttacatttttatatacttact
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccatagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgacaagattcaaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaattacccgttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccacaaggtccagacattgcgcaactatcccttctaaat
1921 gtcccacacgtatactccaacactttattaggcatctgattagtttggaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtacaacattctcacagaatttcctcaatt
2041 ttgtaggttcagcctgatacccactggagttctttggtcctcattaaatagttttcttca
2101 cacattgctctgccttgttacacatatgatgaacactgctttttagaattcattaggaatt
2161 taggaatgcatcttgacaactgagcctattctactatatgtacaatacctagcccataat
2221 aggtatacaatacacaatttggtaaaactaatttcaacccatgacatgtatttttcaact
2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttcacactacaagttacctgg
2341 agtttcatatatgaaaacgcaaacctagctatttgattgtattcaatgggacttaagaat
2401 gcgcatgaataattgtgagttcgatttgttctggcaggctaatgaccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagaggtgttgtcagaacacccgttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttagcaacttctatttgtgtagtgacaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatcacatctctggatctctctatttgtgcagacattgaaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgatttttaaaaacctaggccaagttcattc
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcacattagtgccttccacactgata
2761 aagatcactgaagtcaaattgatttttgctatactcttcaatctacctatatttaattga
2821 gaatctaaatgtacaaatcacttgtgttgattctgcagtgatcctgctatagtaagaact
2881 cagtccctgattttaggtatcctgtgaaaagcagaattaagacaaatacacaagagacca
2941 agcacaaaaaatacaatatcatcaaggggatgaacaaaatggtggagaaagagtagcaaag
3001 ttttgatcacctgccttcaaagaaaggctgtgaatttgttcacttagacagcttggag
3061 acctagaattacccaaaagtaaggtgaggaggataggcaaaaagagccagaaagtgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacccatcttcacccatatt
3241 tgttttcttttgcagagccaagctaggaattgtttccctctcatgggcaccatacacgc
3301 attgatttttgcctggaataagtggatagatataaaacaatttgtatggtatacacctcc
3361 aacttttatgatagctgtttttcttccaattgttgtcctgatatttaaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgagggagagatactgaagattagacatggttgggaagacgtcaccca
3481 aattaacaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttacacccatttttgtt
3541 caatattgatatatttttatcaacaaaatttcaagtttgtatttgttattaaaatgattat
3601 tcaaggtaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 2J. El cADN (SEQ ID NO:20) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 21) de v.10 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ggggccccgcacctctgggcagcaggcggcagccgagactcacggtccaagctaaggcgaaga
   1                                       M  E  S  R  K  D  I  T  N
  61 gtgggtggctgaagccatactattttatagaattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAA
  10  Q  S  N  L  W  K  N  K  P  R  N  N  L  E  E  D  D  Y  L  K
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTAGGGGAAATTTGGAAGAAGACTATTATTGC
  30  K  D  T  G  E  T  S  M  L  K  E  P  V  L  L  E  L  E  Q  T
 181 ATAAGGACACGGGGAGGACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTTGCATTGCACGAAA
  50  A  E  A  D  E  F  D  C  P  S  E  L  Q  E  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCCATGCTGATGAATTGACTGCCCTTCAGAACTTCAGCACACAGGGAACTCTTTC
  70  Q  W  E  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTCTTTATA
  90  L  L  R  E  V  I  H  P  L  A  T  S  H  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATTCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTTATAAAA
 110  P  I  L  V  I  N  K  V  L  P  M  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTTTGGCATTGG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  N  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTAATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACCAAGTATAAGA
 150  F  P  H  W  L  D  K  W  M  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGCCTTCTCAGTT
 170  F  F  A  V  L  K  A  I  Y  S  L  S  Y  P  M  R  R  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATAGTCTGTCTACCCATTGAGGCGATCCTACA
 190  Y  K  L  L  E  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  N  K  E  D  A  W  I
 661 GATACAAGTTGCTAAACTGGGCATATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGA
 210  E  K  D  V  W  R  M  M  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAGATTTATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
 230  L  A  L  L  A  V  T  S  T  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  E
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
 250  F  N  Y  I  Q  V  E  M  I  *
 841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAATATATAAaataacctaggaggtaaatatttatttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaatttaccccatagaaaaataacaaatgtttttcaa
 961 cagcaaagatattatacttgttccaattaataatgtgctctcctgttgttttcccatattg
1021 atttataattaggacaagtgtttcctagaccataaataaaggcattaaaatatttatttgtt
1081 ttttttttttgttttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcgcgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcgcccatc
1261 accatgtccagctaattttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatcctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctggga
1381 ttacaggttgtgagccaccacacctagccggtgtctttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgctacccatctaatgtgatattttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttacctgtcaacctgaatttagtaatgccttttatgttacaccact
```

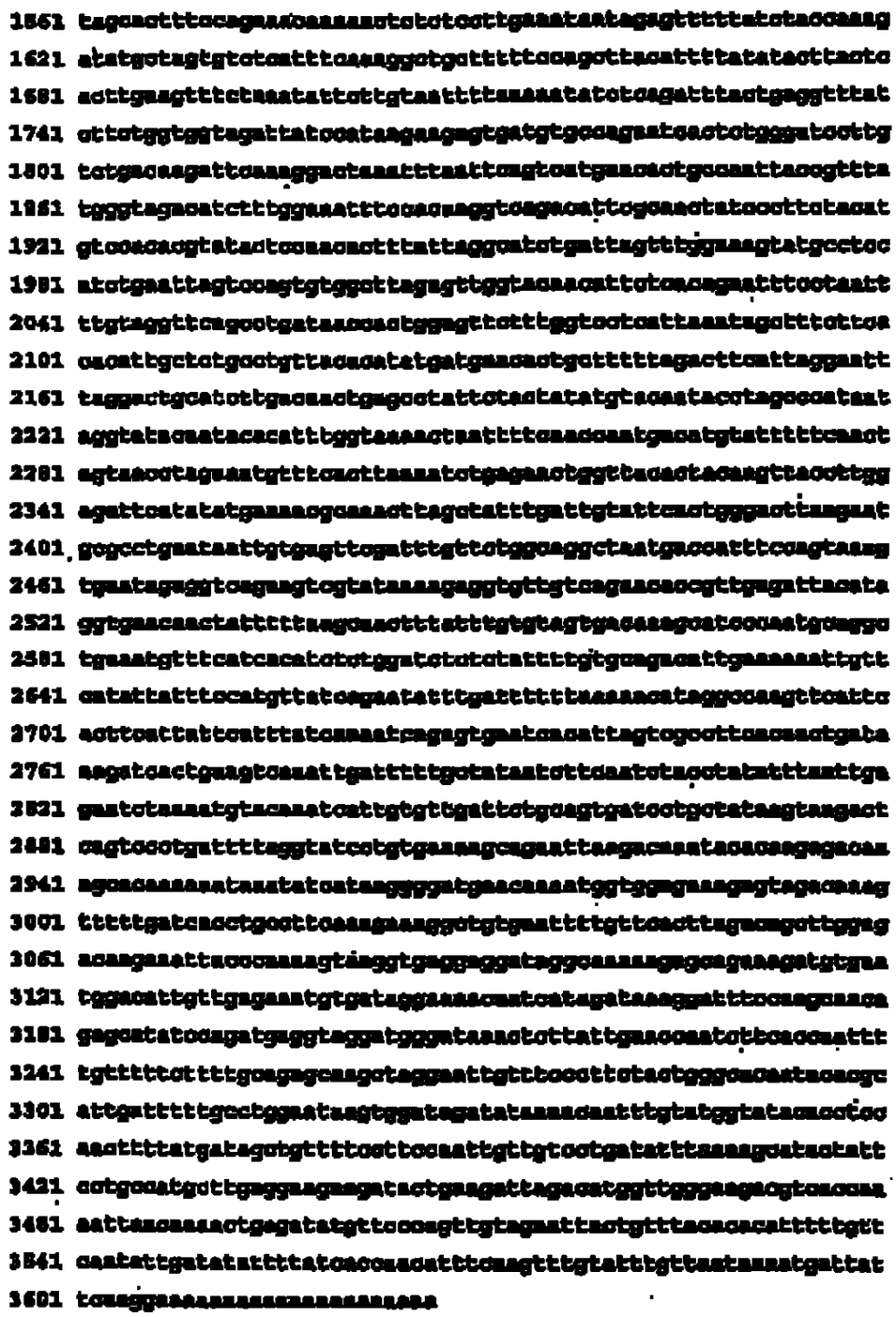
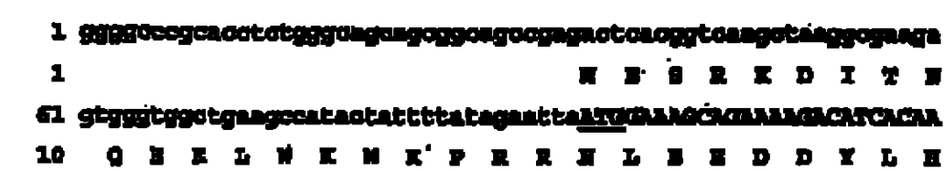


Figura 2K El cADN (SEQ ID NO:22) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:23) de v.11de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.



```
121 ACCAAGAAGAAQTTTGGAAAATGAAGCCTAGGAGAAATTAGAAAGACGATTATTGC
 30   K D T G E T S N L K P V L L E L E Q T
181 ATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTGCATTGCACCAAA
 50   A E A D E F D C P S E L Q E T Q E L F P
241 CAGCCCATGCTGATGAATTGACTGCCCTTCAGAACTTCAGCACACACAGGAACTCTTTC
 70   Q W E L P I K I A A I I A S L T F L Y T
301 CACAGTGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
 90   L L R E V I E F L A T S E Q Q Y F Y K I
361 CTCTTCTGAAGGAAGTAATTCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAACATTTTTACTAAA
110   F I L V I E K V L P E V S I T L L A L V
421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCACTGG
130   Y L F G V I A A I V Q L E E G T K Y K K
481 TTTACCTGCCAGGTGTGGTAGCAGCAATTGTCAACTTCATATGGAACCAAGTATAAGA
150   F P E W L D K W E L T R K Q F G L L S F
541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGAGTTAACAAGAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
170   F F A V L E A I Y S L S Y P E R R S Y R
601 TCTTTTTGCTGTACTCATGCAATTATATGTGTGTTACCCATGAGGCGATCCTACA
190   Y K L L E W A Y Q Q V Q Q E K E D A W I
661 GATACAAGTTGCTAAACTGGCATATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGA
210   E E D V W E E I Y V S L G I V S L A I
721 TTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAGATTATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGGTTGGCAA
230   L A L L A V T S I P S V S D S L T W E E
781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGGAG
250   F E Y I Q V E E I *
841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAATATTATAaataaccctaagaggtaaatattttttt
901 tgtgtttatgatatagaatatgttgtatttaccccataaaaaataacaaatgtttttcta
961 cagcaaagatattataattgttccaaattaataatgtgtatctaatgttgttttccctattg
1021 cttctaattaggcaagtgtttcctagacataaataaaaggcattaaaatattttttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgtttttttgagatgaagtatag
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcaagatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcaccacca
1261 accatgtcccgctaatttttgtatttttagtagagacgggtttcccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccaccttggcctcccaaagtgctggga
1381 ttgcgagttgtgagccaccacacctggcctgtatttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgctacccatctaatgtgatattttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttaactgtccacctgaatttagtaatgccattttatgttacacaact
1561 tagcaatttccagaaacaaaaactctctcttgaaataatagagttttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgttttccagcttacattttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccataggaggtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgccagattccaaggactaaatttaattcagtcatgaccactgccaattaccgtttta
1861 tgggtagccatctttggaaatttccccaaggtcagccattcgccactatccccttctacat
```

1921 gtccaacaagtatactccaacactttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtacaaacattctcacagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgataccactgggagttctttggtcctcattaaatagcttcttttca
2101 cacattgctctgcctgttacaacatatgatgaacactgcttttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgacaactgagcctattctactatatgtacaatacctagccccataat
2221 aggtatacaatacaacatttggtaaaactaattttcaaccaatgacatgtatttttcaacct
2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttacactacaagttaccttgg
2341 agattcatatatgaaaatgcaaacttagctatttgattgtattcactgggacttaagaat
2401 gcgcctgataattgtgagttcgatttgttctggcaggctaatgaccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagtggtgttgtcagaacaacgttgagattaccta
2521 ggtgaacaactatttttagcaacttttatttgtgtagtgacaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatcaaatctctggatctctctatttttgtgcagaattgaaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgatttttttaaaaacataggccaagttcattc
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcaacattagtcgccttccaaactgata
2761 aagatcactgaagtcaaattgatttttgctatatatcttcaatctacctatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtacaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctataagtaagact
2881 cagtcccctgattttaggtatcctgtgaaaagcagaattagacaaatacaacaagagacaa
2941 agcaacaaaaaatataatatcataggggatgaacaaattggtggtgaaagagtagacaaag
3001 ttttttgatcaactgcttcaaagtaaggctgtgaattttgttcacttagacagcttgggg
3061 acaagaaattacccaaaagtaaggtgcggaggtaggcaaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacaatcatagataaggatttccagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacccatcttcaccaattt
3241 tgtttttcttttgcagagcaagctaggattgtttcccttctactgggcaccaatacaagc
3301 attgatttttgcctggataagtggatagatataaaacaatttgtatggtatacacctcc
3361 aactttatgatagctgtttttcttccaattgttgtcctgatatttaaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagcatggttgggaagcgtcaccaa
3481 aattaccaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttacaacaccttttgtt
3541 caatattgatatatttttatcaccaacatttcaagtttgtatttgttaataaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 2L. El cADN (SEQ ID NO:24) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:25) de v.12 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

1 ggggccgcaacctctgggcagcagcggcagccgagactcacggtcaagctaaggcgaaga
1 M E A R K D I T E
61 gtgggtggctgaagccatactatttatagaattaATGGAAAGCAGAAAAGACATCACAA
10 Q E E L W K M K P R R M L E E D D Y L H
121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTGAGGAGAATTTAGAAGAAGACGATTATTTGC
30 K D T G E T S M L K R P V L L E L E Q T
181 AAAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTTGCATTTGCACGAAA
50 A E A D E F D C P S R L Q E T Q E L F P
241 CAGCCCATGCTGGATGAATTGAACTGCCCTTCAGAACTTCAGCACACAGCAGGAACTCTTTC
70 Q W E L P I E I A A I I A S L T F L Y T

```
 301 CACAGTGGCACTTGCCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
  90   L  L  R  S  V  I  S  F  L  A  T  S  K  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATTCACCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAAATATTTTATAAAA
 110   F  I  L  V  I  S  K  V  L  P  N  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTCTTGGCATTGG
 130   Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  H  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATCATGGAACCAAGTATAAGA
 150   F  P  S  W  L  D  K  W  M  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
 170   F  F  A  V  L  S  A  I  Y  S  L  S  Y  F  M  R  K  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTATATGCTGTCTTGCCAATGAGGCGATCCTACA
 190   Y  K  L  L  N  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  N  K  N  D  A  W  I
 661 GATACAATTTGCTAACTGGGCTATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGATGCATGGCTGGA
 210   N  E  D  V  W  R  M  N  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGAGCATGATGTTTGGTGAATGGGATTTATGTGTCTCTGGTAATTGTGGGATTGGCAA
 230   L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  S
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCAATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
 250   F  E  Y  I  Q  V  N  N  I  *
 841 AATTTGACTATATTCAGGTAAATAATATATAAaataaccctaagaggtaaatcttctttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaatttaccccatataaaaataacaaatgtttttcaa
 961 cagcaaagatcttatacttgttccaattaataatgtgctctcctgttgtttttcoctattg
1021 cttctaattaggcaagtgtttcctagacataaataaaggcattaaaatattctttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccacta
1261 ccatgtccagctaattttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctggga
1381 ttacaggttgtgagccaccacacctggcctgtctttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgctaccccatctaatgtgatattttaggaatccaaatatgccatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttaccctgtcaccatgaatttagtaatgccttttatgttacaaaact
1561 tagcaatttccaggaaccaaaaactctctcctgaaatactagagttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgcttttccagcttacatttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccatagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgacaagattcaaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaattaccgttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccacaaggtcagacattgccaactatccctttctaaat
1921 gtccacacgtatactccaacacttttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtacaaacattctcacagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgataacbactgggttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgtctctgcctgttacaacatatgatgtacactgctttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgcaacctgtgcctattctactatatgtacaatacctagcccctaat
2221 aggtatacaatacacattttggtaaaactaattttcaaccaatgacatgtatttttcaaact
```

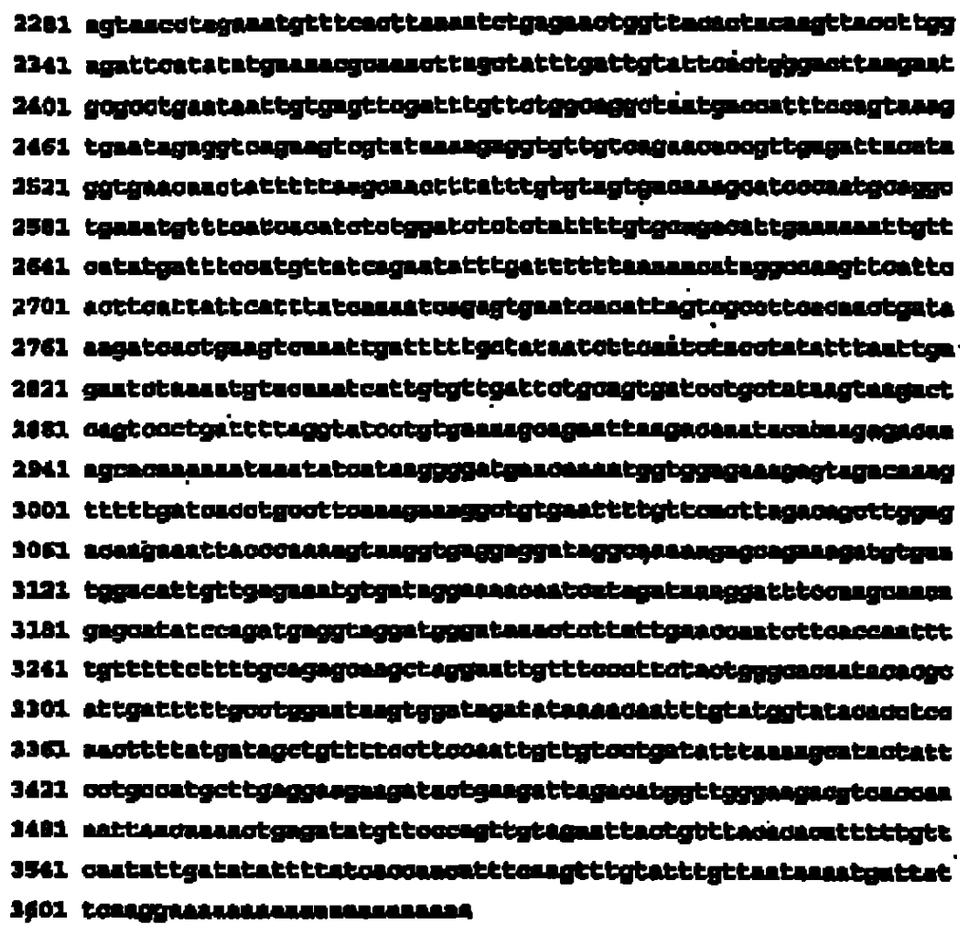
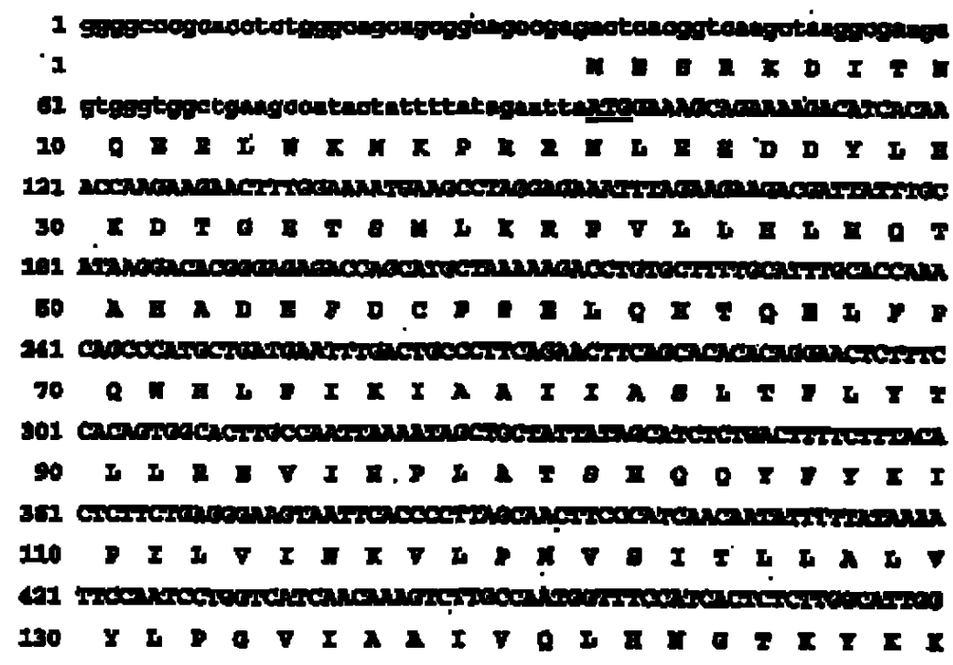


Figura 2M El cADN (SEQ ID NO:26) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:27) de v13 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.



```
481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACCAAGTATAAGA
150   F  P  E  W  L  D  K  W  M  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F
541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGACTGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
170   F  F  A  V  L  K  A  I  Y  S  L  S  Y  P  N  R  R  S  Y  R
601 TCTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATAGTCTGTTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
190   Y  K  L  L  M  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  N  K  E  D  A  W  I
661 GATACAAGTTGCTAAACTGGCATATCAACAGGTCCAACAAAATAAAGAAGATGCCTGGA
210   E  E  D  V  W  R  M  E  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
721 TTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAGATTTATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
230   L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  E
781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
250   F  K  Y  I  Q  V  W  S  I  *
841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAATATATAAaaataaaaaaaaggaggtaaatattttttt
901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaattttaaaaaaataaaaaaatgttttttaaa
961 cagcaaagatattatacttgttcaaattaataatgtgatatcatgttgttttaaatattg
1021 attctaattaggacaagtgtttaatagaaataaaaaggaattaaaatatttttttgtt
1081 tttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcacgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcgcccacca
1261 accatgtcccgctaatttttgtatttttagtagagacggggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctggga
1381 ttacaggttgtgagccaccacacctggcctgatattttctaatatttgtaaacttgttagaca
1441 atttgctaccccatctaatgtgtatattttaggaatacaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttacctgtcaacctgaatttagtaatgccttttatgttacaaaact
1561 tagcactttccaggaaacaaaaactctctcctttgaaataatagagttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgtttttccagcttacatttatatactttactca
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 attctggtggtagattatccatagaagagtgttgtgccagaatcactctgggatcattg
1801 tctgacaagattcaaaggactaatttaattcagtcatgaacactgccaattaccgttta
1861 tgggtagcatctttggaaatttccacaggtcagcattgcgaactatccctttcacat
1921 gtccacacgtatactccaacactttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtaccaacattctccagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgataccaactggagttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgctctgcctgttacaacatatgatgaacactgatttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgacaactgagcctattctactatatgtacaatacctagccctaat
2221 aggtatacaatacacatttggtaaaactaatttttcaaccaatgacatgtatttttcaact
2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttacactacaagttaccttgg
2341 agattcatatatgaaaacgcaaactagctatttgattgtattcaatgggacttaggaat
2401 gcgcctgaataattgtgagttgatttgttctggcaggctaatgacccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtgtataaaagaggtgttgtcagaacaccgttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttagcaaactttatttgtgtagtgacaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatcacatctctggatctctatttttgtgcaagacattgaaaaaattgtt
```

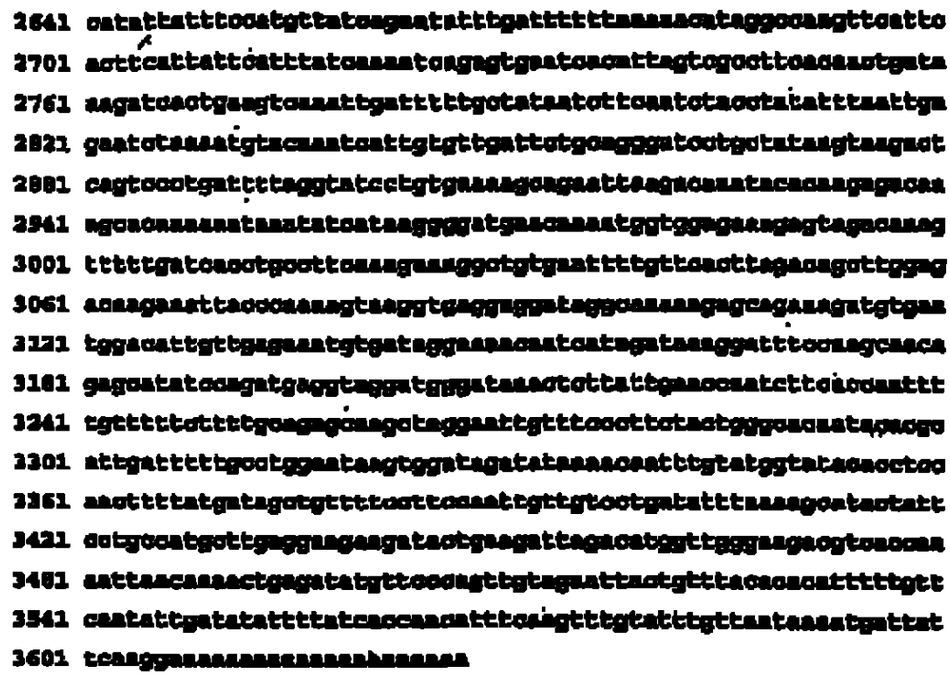
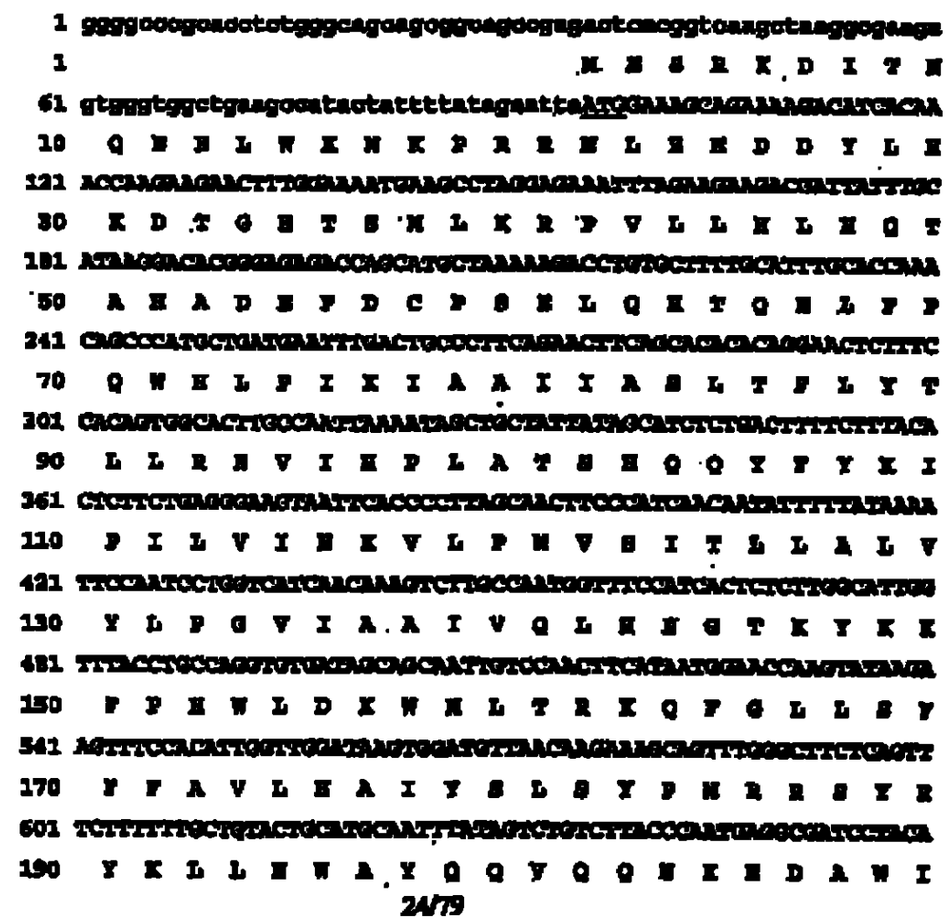


Figura 2N, El cADN (SEQ ID NO:28) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 29) de v.14 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.



661 GATACAAGTTGCTAAACTGGGCATATCAACAGGTCCAACAAACTAAAGAAGATGCCTTGA
210 E H D V W R M M I Y V S L G I V G L A I
721 TTGAGCATGATGTTTGGAGAATGGAGAATTTATGTATCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
230 L A L L A V T S I P S V S D S L T W R N
781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTGAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
250 F M Y I Q V M M I *
841 AATTTCACTATATTCAGGTAARTAATATATAaataaccctaagaggtaaatatttttttt
901 tgtgtttatgatatagaatatgttgaattttaccccataaaaaatacaaaatgttttttcaa
961 cagcaaagatattatacttgttccaaattaataatgtgatatcctgttgttttccctattg
1021 attatatttaggaccaagtgtttcctagacataaataaaaggcattaaaatatttatttgtt
1081 tttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcgcaagatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccatc
1261 accatgtccagctaatttttgtatttttagtagagacgggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccaccttggcctcccaaagtgctggga
1381 ttacaggttgtgagccaccacacctcagcctgtatctttctaatattgaaacttgttagaca
1441 atttgctacccatctaatgtgtatattttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattatttttacctgtcaacctgaatttagtaatgccattttatgttaccaaact
1561 tagcaatttccagaaacaaaaactctctccttgaaatcatagagttttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgctttttcagcttacatttttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttttaaaactatctcagatttactgaggttttat
1741 cttctggtggtagattatccatagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgccaagattcaaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaattaccgttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccaccaaggtcagaccattgccaactatcccttctacat
1921 gtccacacgtatactccaaccagtttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtaccaacattctccacgaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgatacccactggagttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgctctgcctgttacacatatgatgaaccactgctttttgaacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgccaactgagcctatttctatatatgtaccaataactagcccatact
2221 aggtatccaatacccatttggtaaaactaatttccaaccaatgccatgtatttttccaact
2281 agtaacctagaaatgtttccacttaaaatctgagaactggttacactccaagttacctgg
2341 agattcatatatgaaaacgccaaacttagctatttgattgtattccactgggacttaagaat
2401 gagcctgaataattgtgagttcgatttgttctggcaggctaatgaccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagaggtgttgtcagaacaccgttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttaggcaactttatttgtgtagtgaccaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatccacatctctggatctctctatttttgtgcagacattgaaaaaattgtt
2641 catatttatttccatgttatcagaatatttgatttttttaaaaacataggccagttcatta
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcaaattagtcgccttccaaactgata
2761 aagatcactgagtcaaattgatttttgctatcaatcttcaatctacctatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtacaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctatatagtaagact
2881 cagtcctgatttaggtatcctgtgataagcagaattaagcaaaatacacaagagcaca
2941 agcacaaaaaataaatatcatagggatgaccaaatggtggagaaagagtagcaaag

3001 ttttgatcaactgcgcttcaaagaaaggctgtgaatttgttccacttagacagcttggag
3061 acaagaaattaccccaaagtaaggtgaggaggataggcaaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacaatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacaatcttcaccaattt
3241 tgttttttttttgcagagcaagctaggaattgtttccttctactgggcaccaatacagc
3301 attgatttttgcctggataagtggatagatatcaaaacaatttgtatggtatacacctcc
3361 aacttttatgatagctgttttccttccaattgttgtcctgatatttaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgtgaggaagaagtactgaagattagacatggttgggaagcgtcaccaa
3481 aattaacaaaactgagatatgttccacagttgtagaattactgtttacaacacattttgtt
3541 caatattgtatatattttatcaccaacatttcaagtttgtatttgttaataaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura (O). El cADN (SEQ ID NO:30) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:31) de v.15 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se codifica desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.

```
   1 gaggcccgcacccctctagcgcagcagcggcagccgagactccaggtccaagctaaggcgaaga
   1                                  .  M  E  S  R  K  D  I  T  E
  61 gtgggtggctgaagccatactattttatagaattaATGGAAAGCCGAAAAGACATCACAA
  10  Q  E  E  L  W  K  M  K  F  R  R  M  L  E  E  D  D  Y  L  E
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTTGGCGAAATTTCGAAGAATGCTCGAAGACGATTATTTGC
  30  K  D  T  G  R  T  S  M  L  K  R  P  V  L  L  E  L  E  Q  T
 181 ATAAGGACACCGGCAGAACCAGCATGCTAAAAAGACCTGTGCTTTTGCATTGCACCAAA
  50  A  E  A  D  S  F  D  C  P  S  E  L  Q  E  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCCATGCTGATGATTTGACTGCCCTTCAGACTTCAGCCACACAGCAGACTCTTTC
  70  Q  W  E  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTGGCAATTAAAATAGCTGCTATTATAGCATCTCTGACTTTTGTTTCA
  90  L  L  R  E  V  I  E  P  L  A  T  S  E  Q  Q  Y  P  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGGAAGTAATCAGCCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTPAAAA
 110  P  I  L  V  I  W  K  V  L  P  M  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCACAAAGTCTTGCCAATGGTTTCCATCACTCTGTTGGCATTGG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  N  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACCAAGTATAAA
 150  F  P  N  W  L  D  K  W  M  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  F
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGGCTTCTCAGTT
 170  F  F  A  V  L  H  A  I  Y  S  L  S  Y  P  K  R  R  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTGTACTGCATGCAATTTATAGTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
 190  Y  K  L  L  M  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  M  K  E  D  A  W  I
 661 GATACAAGTTGCTAAACTGGCATATCAACGGCCAACAAATAAAGAAAATGCCCTGGA
 210  E  E  D  V  W  R  M  E  I  Y  V  S  L  G  I  V  G  L  A  I
 721 TTGAGCATGATGTTTGGAGATGGAGATTTATGTGTCTCTGGGAATTGTGGGATTGGCAA
 230  L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  E  V  S  D  E  L  T  W  R  E
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCAATCCCATCTGTAGTGACTCTTTGACATGGAGAG
 250  Y  K  Y  I  Q  V  M  N  I  *
```

```
 841 AATTTCACTATATTCAGGTAAATAAGTTTAAaatacccctaagaggtaaatcttcatttt
 901 tgtgttttatgatatagaatatgttgacctttaccccattaaaaaatacaaaatgtttttcaa
 961 cagcaaaagatcttatacttgttccaattaataatgtgctctcctgttgttttccctattg
1021 cttctaattaggacaagtgtttcctagaaataaataaaggcatttaaaatattctttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgttttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcgcgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccatc
1261 accatgtccagctaatttttgtatttttagtagagacgggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctggga
1381 ttacaggttgtgagccaccacgcctggcctgtctttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgctaccctctaatgtgatatttttaggaatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaaatattcttttaccttgtcacctgaatttagtaatgccttttatgttacacaact
1561 tagcactttccagaaccaaaaactctctccttgaaatactagagtttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgtttttccagcttacatttttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaatttaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccatacgaagagtgatgtgccagaatccactctgggatccttg
1801 tatgacaagattcaaaggactaaatttbattcagtcatgaacactgccaattaccgttta
1861 tgggtagacatctttggaatttccacaaggtcagacattgcaaactatccattctacat
1921 gtccacacgtatactccaacactttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtgggtttagagttggtacaaccattctcaacgaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgatcaccactgggttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgctctgcctgttacaccatatgatgaacactgttttttagacttcattaggtatt
2161 taggactgcatcttgcaccactgagcctattctactatgtacaatacctagcccctaat
2221 aggtatacaatacaccatttggtaaaaatcatttttcaaccaatgaaatgtcatttttcaaact
2281 agtaaccctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttcacctacaagttacctgg
2341 agattcatatatgaaaacgcaaaacttagctatttgattgtattcactgggacttaagaat
2401 gcgcctgaataattgtgagttcgatttgttctggcaggctaatgaccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagaggtgttgtcagaacacagttgagattcata
2521 ggtgaacaactatttttaggaaatttattgtgtagtgccaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatccatctctggatctctctatttgtgccgacattgaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgatttttaaaaccataggccagttcattc
2701 acttcattattcatttatccaaaatcagagtgaatccacattagtcgccttcacaagtgata
2761 aagatcactgaagtccaaattgatttttgtatataatcttcaatctacctatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtaccaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctatagtaagaat
2881 cagtcccctgattttaggtatcctgtgaaaagcagaattaagcaaaatacacaagagcaca
2941 agcacaaaaaatagatatcctaagggatgaacaaaatggtgggagaagagtagacaaag
3001 ttttttcatccacctgccttccaaagaaaggctgtgaatttgttcacttagacagcttggag
3061 acaagaaattacccaaaagtaaggtgaggaggataggcaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggaaattgttgagaaatgtgatagggaaacaatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggatcaactcttattgaacccatcttcaccaatttt
3241 tgttttttcttttgcagagcaagcatgaggattgtttgccttctactgggcacaatacacgc
3301 attgatttttgcctggaatagtggatagatataaacaatttgtatggtatacaccctcc
```

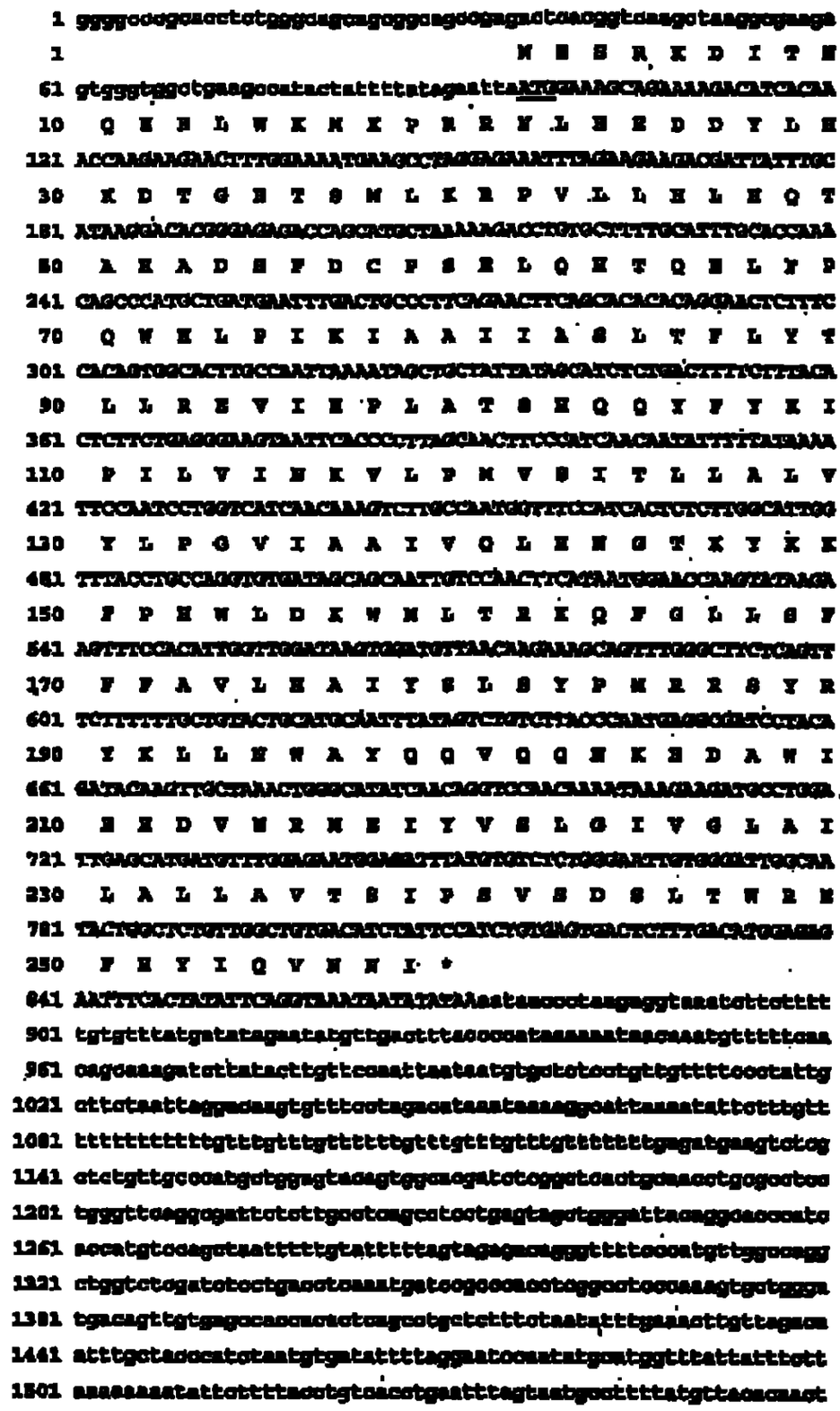
3361 aactttttatgatagctgttttcctccaattgttgtcctgatatttaaaagcataatatt
3421 cctgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagacatggttgggaagcgtcacccaa
3481 aatttaccaaaaactgagatatgttcccagttgtagaattaatgtttaaaaaaattttgtt
3541 caatattgatatatttttatcacccaacatttcaagtttgtatttgttaataaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 2P. El cADN (SEQ ID NO:32) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO:33) de v.16 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-972 incluyendo el codón de detención.

```
   1 ggggccagcaacctctgggcagcagcgggcagcgagactcaaggtcaagctaaggagaaga
   1                                       M  N  S  E  K  D  I  T  N
  61 gtgggtgggtgaagccatactatttttatagaattaATGGAAAAGCAGAAAAACACATCACAA
  10  Q  N  E  L  W  K  M  K  P  R  R  N  L  M  E  D  D  Y  L  E
 121 ACCAAGAAGAACTTTGGAAAATGAAGCCTCGGGGAAATTTAGAAGAAGACGATTATTTGC
  30  K  D  T  G  E  T  S  M  L  K  R  P  V  L  L  S  L  E  Q  T
 181 ATAAGGACACGGGAGAGACCAGCATGCTCAAAAGACCTGTGCTTTTGCAATTGCAGCAAA
  50  A  E  A  D  E  F  D  C  P  S  E  L  Q  H  T  Q  E  L  F  P
 241 CAGCCAATGCTGATGAATTTGACTGCCCTCAGGAACTTCAGCACACACAGGAACACTTTC
  70  Q  W  H  L  P  I  K  I  A  A  I  I  A  S  L  T  F  L  Y  T
 301 CACAGTGGCACTTGCCAATAAAATAGCTGCTCATAAGGCATCTCTGACTTTTCTTTACA
  90  L  L  R  H  V  I  H  P  L  A  T  S  H  Q  Q  Y  F  Y  K  I
 361 CTCTTCTGAGGCAAGTAATCACCCTTAGCAACTTCCCATCAACAATATTTTATAAAA
 110  P  I  L  V  I  M  K  V  L  P  M  V  S  I  T  L  L  A  L  V
 421 TTCCAATCCTGGTCATCAACAAAGTCTTGCCAACTGTTTCCATCACTCTCTTGCATTGG
 130  Y  L  P  G  V  I  A  A  I  V  Q  L  H  H  G  T  K  Y  K  K
 481 TTTACCTGCCAGGTGTGATAGCAGCAATTGTCCAACTTCATAATGGAACCAAGTATAAA
 150  F  P  H  W  L  D  K  W  M  L  T  R  K  Q  F  G  L  L  S  Y
 541 AGTTTCCACATTGGTTGGATAAGTGGATGTTAACAAGAAAGCAGTTTGGCCTTCTCAGTT
 170  F  F  A  V  L  H  A  I  Y  S  L  S  Y  P  N  R  R  S  Y  R
 601 TCTTTTTTGCTATACTGCATGCAATTTATAGTCTGTCTTACCCAATGAGGCGATCCTACA
 190  Y  K  L  L  M  W  A  Y  Q  Q  V  Q  Q  M  K  H  D  A  W  I
 661 GATACAAGTTGCTAAACTGGCCATATCAACAGGTCCAACAAATGAAACACGATGCCTGGA
 210  H  H  D  V  W  R  M  E  I  Y  V  S  L  Q  I  V  G  L  A  I
 721 TTGGGCATGATGTTTGGAAATGGAGATTTATGTGTCTCTGGCAATTGTGGGATTGGCAA
 230  L  A  L  L  A  V  T  S  I  P  S  V  S  D  S  L  T  W  R  N
 781 TACTGGCTCTGTTGGCTGTGACATCTATTCCATCTGTAGATGACTCTTTGACATGGAGAG
 250  F  N  Y  I  Q  V  N  N  I  *
 841 AATTTCACTATATTCAGGTAATAATATATAAataaccctaggaggtaaatcttctttt
 901 tgtgtttatgatatagaatatgttgacttaccccataaaaattaccaaatgttttttcaa
 961 cagcaaagatcttataattgttccaattaataatgtgatctcctgttgtttcccctattg
1021 ttctaattaggacaagtgtttcctagacataaataaaggcattaaaatattcttttgtt
1081 ttttttttttgtttgtttgttttttgtttgtttgtttgttttttgagatgaagtctcg
1141 ctctgttgcccatgctggagtacagtggcgcgatctcggctcactgcaacctgcgcctcc
```

1201 tgggttcaggcgattctcttgcctcagcctcctgagtagctgggattacaggcacccatc
1261 acccatgtccagctaattttttgtatttttagtagagacgggtttcaccatgttggccagg
1321 ctggtctcgatctcctgacctcaaatgatccgcccacctcggcctcccaaagtgctgggg
1381 tgacagttgtgagccaccacacctcagcctgctctttctaatatttgaaacttgttagaca
1441 atttgctacccatctaatgtgatatttaggatccaatatgcatggtttattatttctt
1501 aaaaaaatattcttttacctgtcacctgaatttagtaatgcattttatgttacacaact
1561 tagcactttccagaacaaaaactatctcttgaaatcatagagttttatatacccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgcttttccagcttacatttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattctttgtaatttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagatttatccatacgaagagtgtgtgtgccagaatcacttctgggatcattg
1801 tctgacatgattcaaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaatttaccgtttt
1861 tgggtagacatctttggaaatttccacaaggtcagacattgcaacctatccattctacat
1921 gtccacacgtatactccaacacttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtacaacattctcacagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgatacccactggagtttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgctctgcctgttacacatatgatgaacactgcttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgcaactgagcctatttctactatatgtacaatacctagcccataat
2221 agctatacaatacacatttggtaaaactcatttcaaccaatgacatgtatttttcaact
2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaaatctgagaactggttacactacaagttaccttgg
2341 agatttcatatatgaaaacgcaaacttagctatttgattgtattcactgggacttaagat
2401 gcgcctgatcattgtgagttcgatttgttctggcagctaatgaccatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtcgtataaaagagctgttgtcagaacccgttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttagcaaacttattgtgtagtgacaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatcacatctctggatctctctatttttgtgcagacattgaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagaatatttgatttttaaaaccataggccaagttcatta
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcacattagtcgccttcacaacgata
2761 aagatcactgaagtcaaattgatttttgctatattatcttcatctacctatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtacaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctataagtaagact
2881 cagtccctgatttttaggtatcctgtgaaaagcagaattaagacaaatacacaaagagcaa
2941 agcacaaaaaattaaatatcatagggggatgaacaaaatggtggagaaagagtagacaaag
3001 ttttttgatcacctgccttcaaagaaaggctgtgaatttttgttcacttagacagcattggag
3061 acaagaaattacctaaaagtaaggtgaggaggataggcaaaaagagtagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacaatcatagataaaggatttccaagcaaca
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacctatttcacctattt
3241 tgttttttattttgcagagcaagctaggaattgtttccattctactgggcacaatacacgc
3301 attgatttttgcctggaataagtggatagatatacaaacaatttgtatggtatcacacctcc
3361 aacttttatgatagctgttttccttccaattgttgtcctgatatttaaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgaggaagaagatactgaagattagacatggttgggaagacgtcaccaa
3481 aattaccaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttacacacatttttgtt
3541 caatattgatatatttttatcacccaacatttcaagcttgtatttgttaatacaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 2Q. El cADN (SEQ ID NO:34) y secuencia de amino ácido (SEQ ID NO: 35) de v.17 de STEAP-1. La metionina de inicio está subrayada. El marco de lectura abierto se extiende desde el ácido nucléico 96-872 incluyendo el codón de detención.



1561 tagcactttccagaaacaaaaactctctcctgaaatattagagttttatctaccaaag
1621 atatgctagtgtctcatttcaaaggctgcttttccagcttacatttatatacttactc
1681 acttgaagtttctaaatattcttgtaattttaaaactatctcagatttactgaggtttat
1741 cttctggtggtagattatccataagaagagtgatgtgccagaatcactctgggatccttg
1801 tctgacaagattcaaaggactaaatttaattcagtcatgaacactgccaattaccgttta
1861 tgggtagacatctttggaaatttccacaaggtcagacattgcaactatccctttctacat
1921 gtccaaagtatactccaacacttattaggcatctgattagtttggaaagtatgcctcc
1981 atctgaattagtccagtgtggcttagagttggtacaacattctcacagaatttcctaatt
2041 ttgtaggttcagcctgataaccactggagttctttggtcctcattaaatagctttcttca
2101 cacattgctctgcctgttacacatatgatgaacactgcttttagacttcattaggaatt
2161 taggactgcatcttgacaactgagcctattctactatatgtacaatacctagccataat
2221 aggtatacaatacacatttggtaaaactaatttcaaccaatgacatgtatttttcaact
2281 agtaacctagaaatgtttcacttaaatctgagaactggttcacctacaagttccttgg
2341 agattcatatatgaaaaagcaaactagctatttgattgtattcactgggacttaagaat
2401 gagcctgaataattgtgagttgatttgttctggcaggctaatgacaatttccagtaaag
2461 tgaatagaggtcagaagtggtatcaaaagaggtgttgtcagaacaccgttgagattacata
2521 ggtgaacaactatttttaagcaacttattttgtgtagtgacaaagcatcccaatgcaggc
2581 tgaaatgtttcatcacatctctggatctctctatttttgtgcagacattgaaaaaattgtt
2641 catattatttccatgttatcagatatttgatttttttaaaaacataggccaagttcatta
2701 acttcattattcatttatcaaaatcagagtgaatcacattagtcgccttcacaactgata
2761 aagatcactgaagtcaaattgatttttgtatattatttcaatctacctatatttaattga
2821 gaatctaaaatgtacaaatcattgtgttgattctgcagtgatcctgctatacagtaagact
2881 cagtcctgatttaggtatcctgtgaaaagcagaattaagacaaatacaacaagagacaa
2941 agcacaaaaaaatcaaatatcatagggatgaacaaaatggtggagaaagagtagacaaag
3001 ttttgatcaacctgccttcaaagaaaggctgtgaatttgttcacttagcagcttggag
3061 acaagaaattacccaaaagtaaggtgaggaggataggcaaaaagagcagaaagatgtgaa
3121 tggacattgttgagaaatgtgataggaaaacaatcatagataaaggatttccagcaact
3181 gagcatatccagatgaggtaggatgggataaactcttattgaacccatcttcacccattt
3241 tgtttttcttttgcagagcaagctaggaattgtttcccttctactgggcacactacacgc
3301 attgatttttgcctggaataagtggatagatataaaacaatttgtatggtatcacccctcc
3361 aacttttatgatagctgtttccttccaattgttgtcctgatatttaaaagcatactatt
3421 cctgccatgcttgaggagaagagatactgaagattagcctggttgggaagcgtcacccaa
3481 aattaccaaaactgagatatgttcccagttgtagaattactgtttcacacacatttttgtt
3541 caatattgatatattttatcacccaacatttcaagtttgtatttgttaataaaatgattat
3601 tcaaggaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

Figura 3:

Figura 3A. Secuencia de amino ácido de v.1 de STEAP-1(SEQ ID NO: 36). La proteína v.1 de STEAP-1 tiene 339 amino ácidos.

```
  1 MESRKDITRQ EELWEMKPER ELEEDDYLEK DTGPTSMLER PVLLELEQTA HADEVDCPSE
 61 LQHTQELFPQ WELPIKIAAI IASLTFLYTL LEEVIHPLAT SHQQYFYKIP ILVINKVLPM
121 VSITLLALVY LPGVIAAIVQ LHNGTKYKKF PNTLDNSPLT REQFGLLGFF FAVLHAIYSL
181 SYPMRRSYRY KLLNWAYQQV QQNKEDAWIE HDVWRMEIYV SLGIVGLAIL ALLAVTSIPS
241 VSDSLTWREF EYIQNKLGIV SLLLGTIHAL IFAWNKHIDI EQFVNYTFFT FMIAVFLPIV
301 VLIFKSILFL PCLRKKILKI RHGWEDVTKI NKTEICSQL
```

Figura 3B. Secuencia de amino ácido de v.2 de STEAP-1(SEQ ID NO: 37). La proteína v. 2 de STEAP-1 tiene 258 amino ácidos.

```
  1 MESRKDITRQ EELWEMKPER ELEEDDYLEK DTGPTSMLER PVLLELEQTA HADEVDCPSE
 61 LQHTQELFPQ WELPIKIAAI IASLTFLYTL LEEVIHPLAT SHQQYFYKIP ILVINKVLPM
121 VSITLLALVY LPGVIAAIVQ LHNGTKYKKF PNTLDNSPLT REQFGLLGFF FAVLHAIYSL
181 SYPMRRSYRY KLLNWAYQQV QQNKEDAWIE HDVWRMEIYV SLGIVGLAIL ALLAVTSIPS
241 VSDSLTWREF EYIQNKLGIV
```

Figura 3C. Secuencia de amino ácido de v. 3 de STEAP-1(SEQ ID NO: 38). La proteína v.3 de STEAP-1 tiene 282 amino ácidos.

```
  1 MESRKDITRQ EELWEMKPER ELEEDDYLEK DTGPTSMLER PVLLELEQTA HADEVDCPSE
 61 LQHTQELFPQ WELPIKIAAI IASLTFLYTL LEEVIHPLAT SHQQYFYKIP ILVINKVLPM
121 VSITLLALVY LPGVIAAIVQ LHNGTKYKKF PNTLDNSPLT REQFGLLGFF FAVLHAIYSL
181 SYPMRRSYRY KLLNWAYQQV QQNKEDAWIE HDVWRMEIYV SLGIVGLAIL ALLAVTSIPS
241 VSDSLTWREF EYIQNKLGIV SLLLGTIHAL IFAWNKHIDI EQFVNYTFFT FMIAVFLPIV
301 VLIFKSILFL PCLRKKILKI RHGWEDVTKI NKTEICSQL
```

Figura 3D. Secuencia de amino ácido de v.4 de STEAP-1(SEQ ID NO: 39). La proteína v.4 de STEAP-1 tiene 258 amino ácidos.

```
  1 MESRKDITRQ EELWEMKPER ELEEDDYLEK DTGPTSMLER PVLLELEQTA HADEVDCPSE
 61 LQHTQELFPQ WELPIKIAAI IASLTFLYTL LEEVIHPLAT SHQQYFYKIP ILVINKVLPM
121 VSITLLALVY LPGVIAAIVQ LHNGTKYKKF PNTLDNSPLT REQFGLLGFF FAVLHAIYSL
181 SYPMRRSYRY KLLNWAYQQV QQNKEDAWIE HDVWRMEIYV SLGIVGLAIL ALLAVTSIPS
241 VSDSLTWREF EYIQNKLGIV
```

Figura 4:

Figura 4A-Homología de STEAP-1 (SEQ ID NO: 40) a proteína relacionada adiposa inducida por TNF-α de ratón (gi|16905133|) (SEQ ID NO: 41)

```
 Puntaje =  224 bits (570), Esperada = 2e-57
 Identidades  = 110/270 (40%), Positivos  = 174/270 (63%)

Pregunta: 66  XLFPQWXLPIXIAAIIASLTFLYTLLREVIEPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMVSITLL 125
              +LFP W  P  +++++    F+Y  +NEVI+P         Y++ I + N+Y P+ ++ L
Sbjct: 195 QLFPNNXFFFLSSVLCIFFVYCAIRSVIYPYVMKNSDATYRLAISISNKVFFPITALIL 254

Pregunta: 126 LALVYLPGVIAAIVQLHRGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSLSYNGR 185
              LALVYLPG++AAI+QL+ GTKY++FP+WLD WML RKQ GL++  FA LH IY+L  P+R
Sbjct: 255 LALVYLPGILAAILQLYRGTKYRFFPNWLDKWMLCRKQLGLVALGFAFLHVIYSLVIPIR 314

Pregunta: 186 RSYYKELLEWAYQQVQQNGDDANTSMDVRNRSIYVELGIVGLATLALLAVTSIPSVSDSL 245
                 R++L W    Q   NK+  +I    W  + Y++LGI+G  +  LL +TS+PSVS+ +
Sbjct: 315 YYVNNRLRNAFTTQAVTNKDSPFTTFTANIEDSYLAIAGILGPTLFLLLGTTSLPSVSNNV 374

Pregunta: 246 TWRNFHYTQSKLGIVSLLLSTIHALIFAGNKNIDIKQFVNTPPTFMIAVFLPIVVLIFK 305
               NREF ++QSKLG ++L+L T K L++   +++      W  P  +++A+ +P  YL+ K
Sbjct: 375 WNRNFRFVQSKLGYLMLVLCTAKFLVYGGKRFLSTSILSNNLPSAYILALIIPCAVLVLK 434

Pregunta: 306 SILFLPCLRKKILKIRHGWEDVTKQNKYNK 335
              IL +PC+ K + +IR GNE  +K  ++ +
Sbjct: 435 CILIMPCIDKMLRIRQGWSSNSKYTQSAL 464
```

Figura 4B-Homología de STEAP-1 (SEQ ID NO: 42) a proteína pHyde de rata (gi|21717855|). (SEQ ID NO: 43)

```
 Puntaje =  283 bits (724), Esperada = 2e-75
 Identidades  = 127/259 (49%), Positivos  = 184/259 (71%)

Pregunta: 67  LFPQWXLPIXCAAIIASLTFLYTLLREVIEPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMVSITLL 126
              L P W +P  +A  +++ ++ Y  +N+V+ P      +  FYE+P+ V+W  +P V+  LL
Sbjct: 208 LLPWFKVFTLLALGLFTQSYAMNFINDVLQPTTEKNMKFYIMFLSVVHTTIPCVAYVLL 267

Pregunta: 127 ALVYLPGVIAAIVQLHRGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSLSYNGR 186
              +LVYLPGV+AA +QL  GTKY++FP WLD W+  RKQ GLLSFFFA+LHA+YS   P+NR
Sbjct: 268 SLVYLPGVLAAALQLRRGTKYQRFPDWLDSWLQRRKQIGLLSFFFAMLHALYSFCLPLRR 327

Pregunta: 187 SYNYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEMDVRNRSIYVELGIVGLATLALLAVTSIPSVSDSL* 246
              S+NY L+W A +QV  NK   W+E +VRNRSIY+ELG++ L +L+LLAVTSIPS+++SL
Sbjct: 328 SHNYDLVELAVEQVLRNKQQLAVEEEVVRNRSIYLELGVLALGNLGLLAVTSIPSIANNLE 387

Pregunta: 247 NKKFHYIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAGNKNIDIKQFVNTPPTFMIAVFLPIVVLIFKS 306
              N+ F ++QS LG V+L+L T+H L + N +   +   + +Y PFW + + LP V+++ K
Sbjct: 388 NRSFVQSTLGFVALGLFDMKTVTGVIAFEKRIKKYLLPPTFFLCLLLPCVIILAKS 447

Pregunta: 307 ILFLPCLRKKILKIRHGWE 325
              +  LPCL  ++ KIR GNE
Sbjct: 448 LFLLPCLSSKLAKIRHGWE 466
```

Figura 4C-Homología de STEAP-1 (SEQ ID NO: 44) a antígeno epitelial de seis transmembrana de ratón de la (gi|20820492|). de próstata. (SEQ ID NO: 45)

```
 Puntaje =  488 bits (1256), Esperada = e-137
 Identidades  = 255/303 (84%), Positivos  = 277/303 (91%)
```

```
Pregunta: 1   MLKRPVLLHLEQTAADEHDCPHELQHIQELVPQWELPIKIAAIIALSAVFLVTLLGNVIH 60
              MLKRP L HL     H D FDCPHELQHIQE VP W LP+E+AAII+SLAVFLVTLLGN+I+
  Sbjct: 37   MLKRPGLSHLQEAVEVDADFDCPHELQHIQEVPPWHLPVEVAAIISSLAVFLVTLLGNIIV 96

Pregunta: 61  PLATHERQIVYKIPILVIHKVLPMVSITLLALVYLPGVIAAIVQLHHGTKYKKFPHWLDK 120
              PL TH +QIVYKIPILVIHKVLPMV+ITLLALVYLPG +AA+VQL HGTKYKKFP WLD+
  Sbjct: 97   PLVTHRRQIVYKIPILVIHKVLPMVAITLLALVYLPGLAAVVQLHHGTKYKKFPHWLDR 156

Pregunta: 121 WMLTREQFGLLSFFAVLHAIYSLSYPHERSYAYLLHNAYQQVQQHKHDANIEHDVWRM 180
              WGL REQFGLLSFFAVLHA+YSLSYPHERSYAYLLHNAY+QVQQHKHDAN+EHDVWRM
  Sbjct: 157 WGLAREQFGLLSFFAVLHAVYSLSYPHERSYAYLLHNAYEQVQQHKHDANVEHDVWRM 216

Pregunta: 181 KIYVSLGIVGLALLALAVTSIPSVSDSLTWRDFEYIQSKLGIVSLLLGTIHALIYAWSK 240
              KIYVSLGIVGLALLALAVTSIPSVSDSLTWRDFEYIQSKLGIVSLLLGTVHALVFAWSK
  Sbjct: 217 KIYVSLGIVGLALLALAVTSIPSVSDSLTWRDFEYIQSKLGIVSLLLGTVHALVFAWSK 276

Pregunta: 241 WIDIEQFVWYTFFTWIAVFLPIVVLIWSILFLPCLRKKILKIRHGWEDVTKINKTEIC 300
              W+D+ QFVWY FFTWIAVFLP +VLI K  L LPCLRKKILKIR GWEDV+KIN+TE+
  Sbjct: 277 WVDVQQFVWYDFFTWIAVFLPFLVLICKIALCLPCLRKKILKIRCGWEDVSKINRTEMA 336

Pregunta: 301 SQL 303
              S+L
  Sbjct: 337 SKL 339
```

Figura 5a variante 1 de STEAP-1
Perfil de Hidrofilicidad
(Hopp T.P., Woods K.R., 1981.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828)

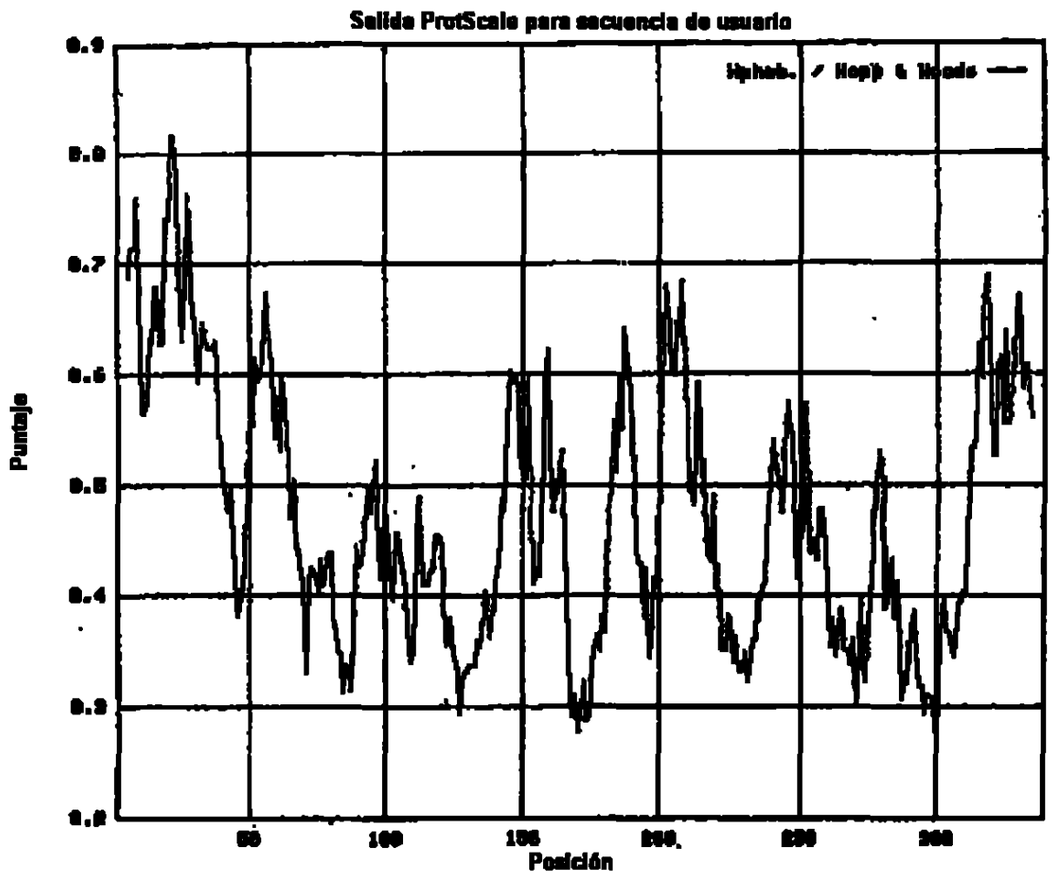


Figura 5b variante 3 de STEAP-1
Perfil de Hidrofilicidad
(Hopp T.P., Woods K.R., 1981.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:3824-3828)

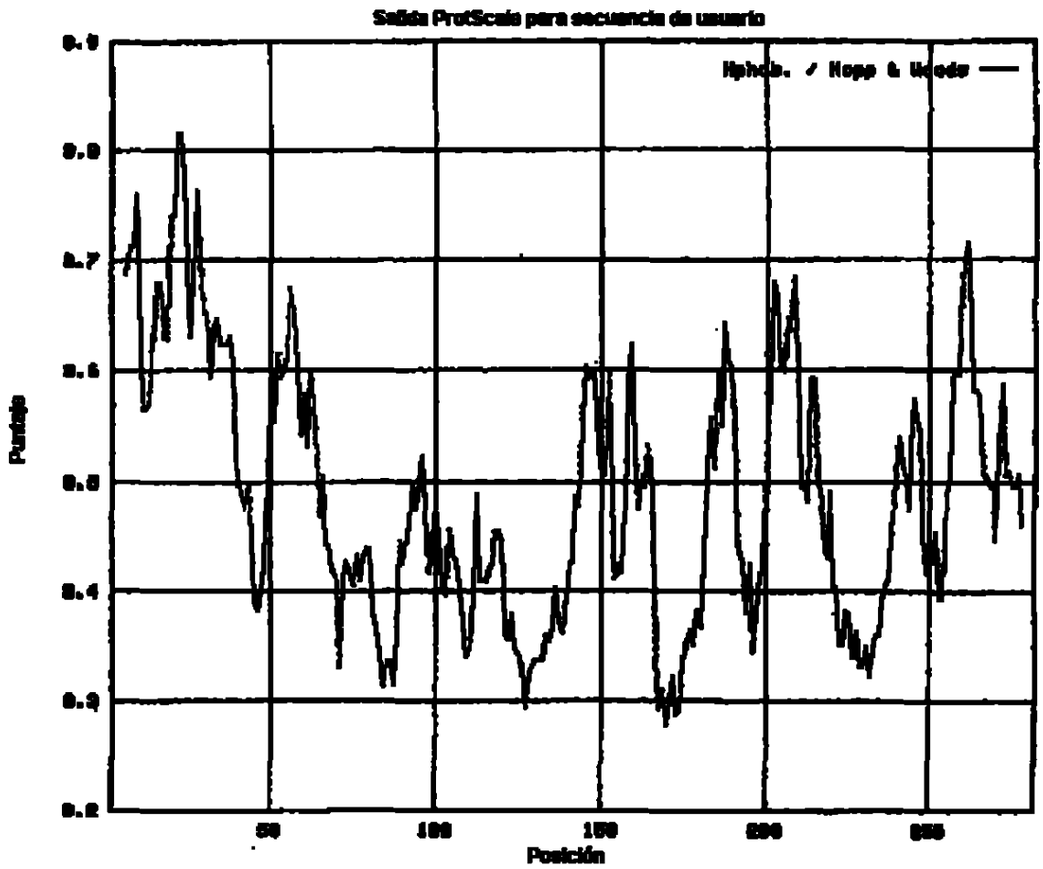


Figura 6a variante 1 de STEAP-1
Perfil de Hidropaticidad

(Kyte J., Doolittle R.F.,.1982. J. Mol. Biol. 157:105-132)

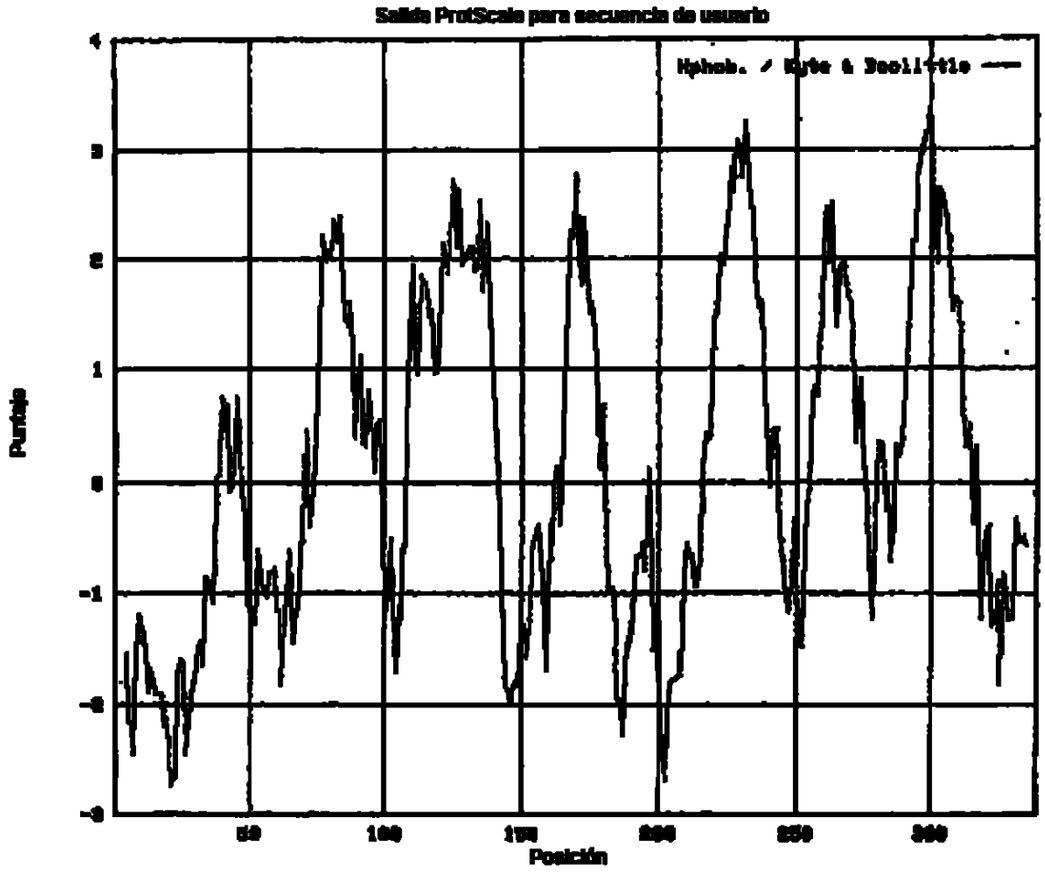


Figura 6b variante 3 de STEAP-1
Perfil de Hidropaticidad
(Kyte J., Doolittle R.F., 1982. J. Mol. Biol. 157:105-132)

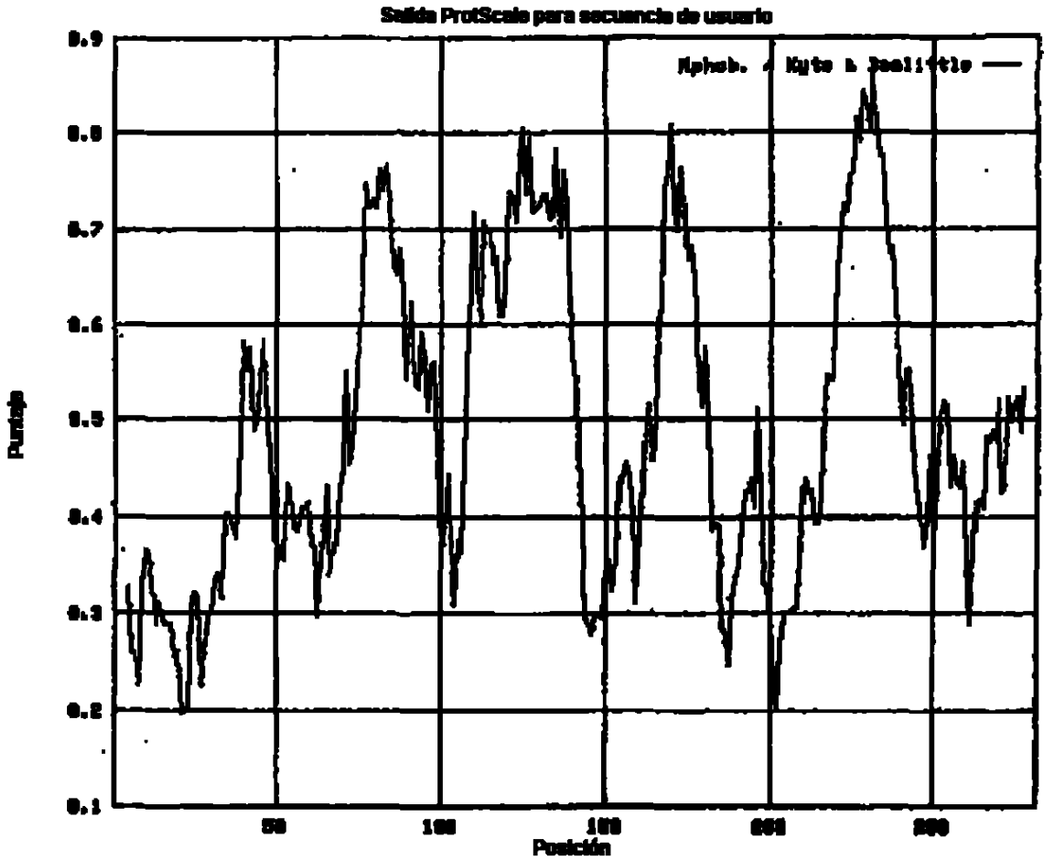


Figura 7a variante 1% de STEAP-1
Perfil de Residuos Accesibles
(Janin J., 1979. Nature 277:491-492)

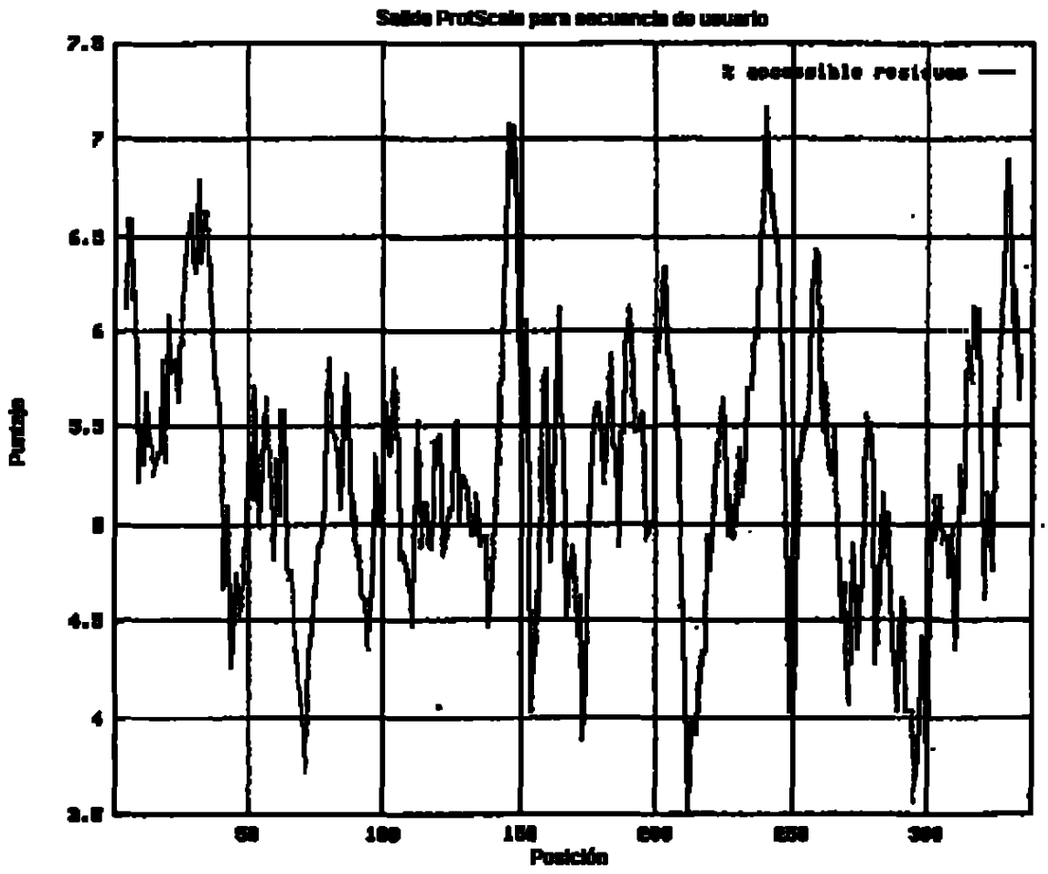


Figura 7b variante 3% de STEAP-1
Perfil de Residuos Accesibles
(Janin J., 1979. Nature 277:491-492)

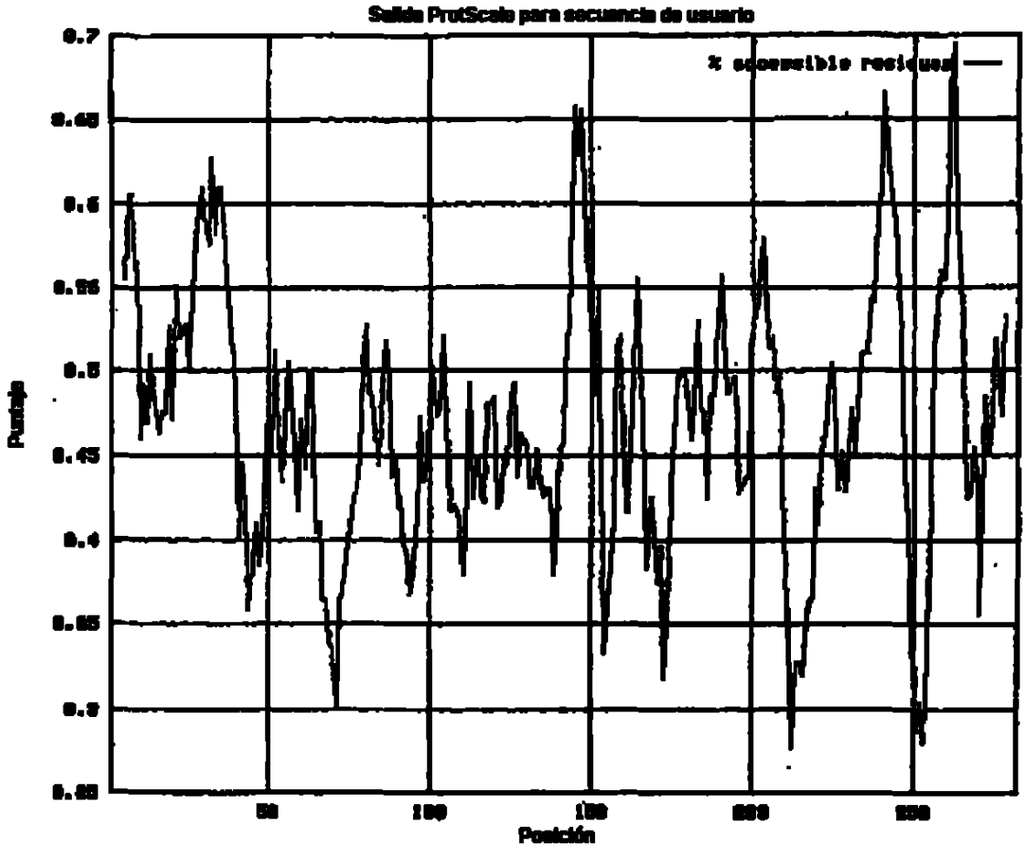


Figura 8a variante 1 de STEAP-1
Perfil de Flexibilidad Promedio
(Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988.
Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255)

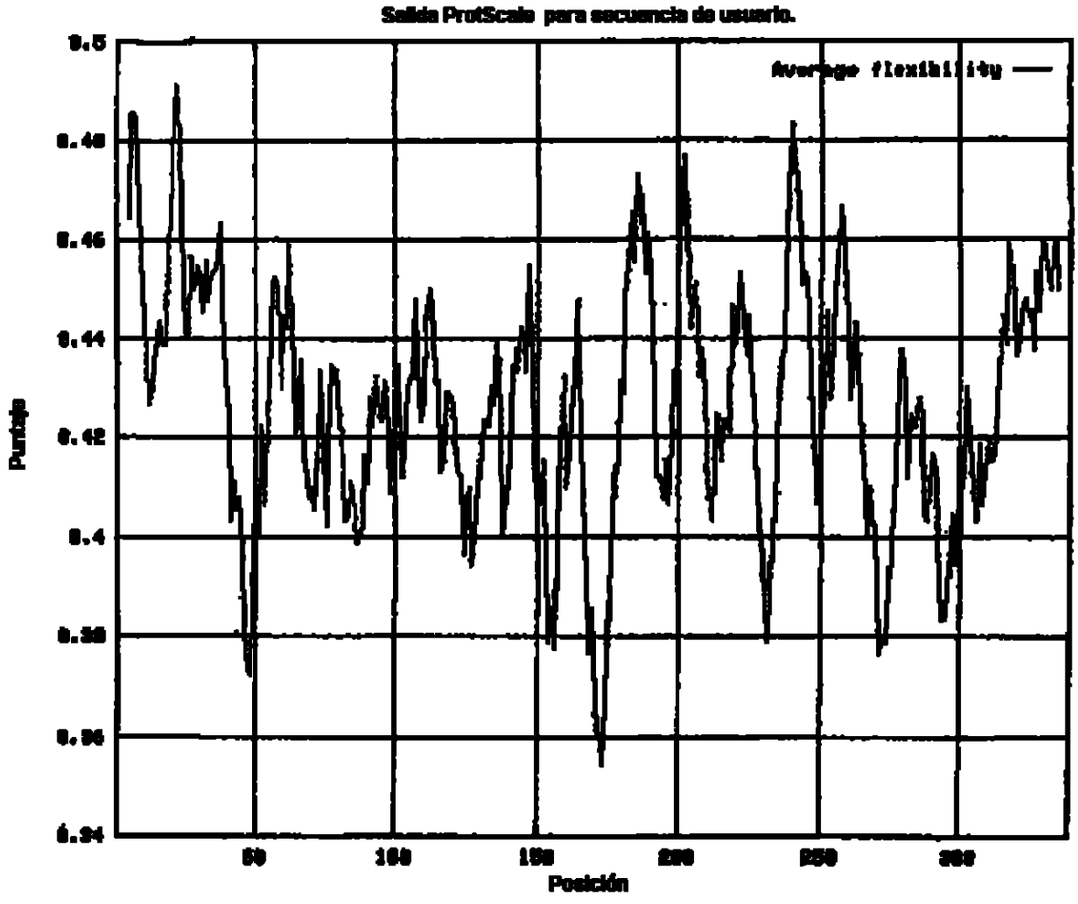


Figura 8b variante 3 de STEAP-1
Perfil de Flexibilidad Promedio
(Bhaskaran R., Ponnuswamy P.K., 1988.
Int. J. Pept. Protein Res. 32:242-255)

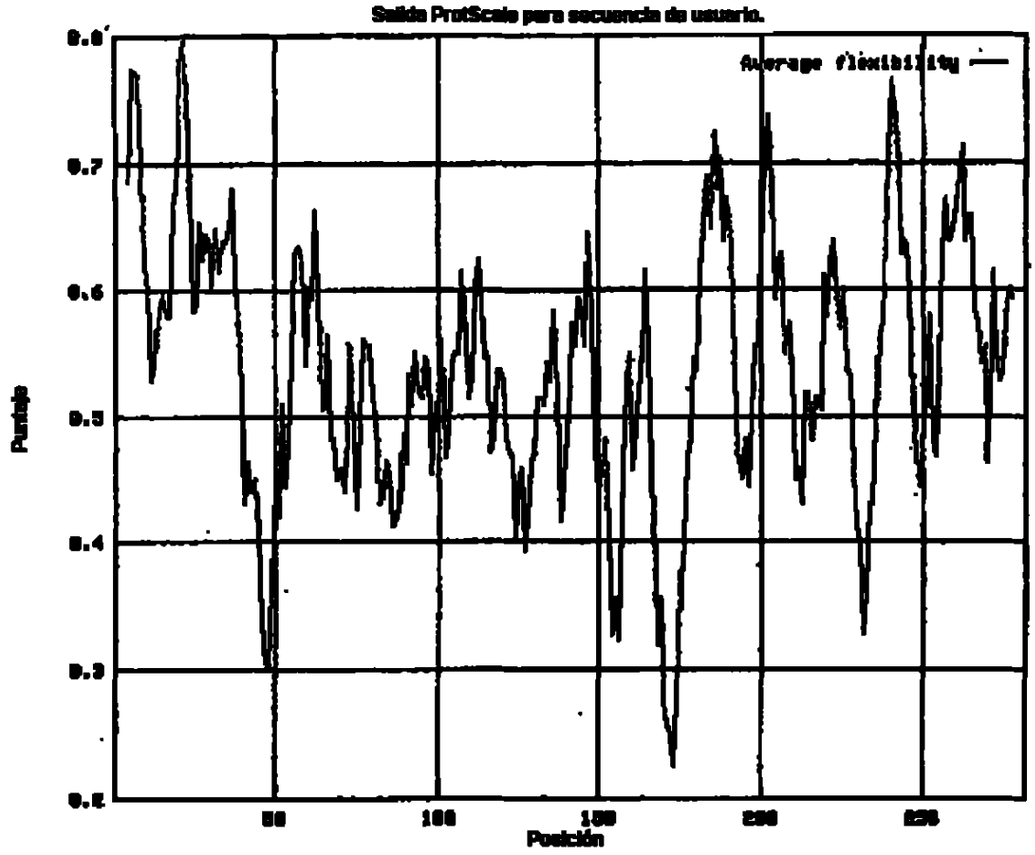


Figura 9a variante 1 de STEAP-1
Perfil de Giro Beta
(Deleage, G., Roux B. 1987. Protein Engineering 1:289-294)

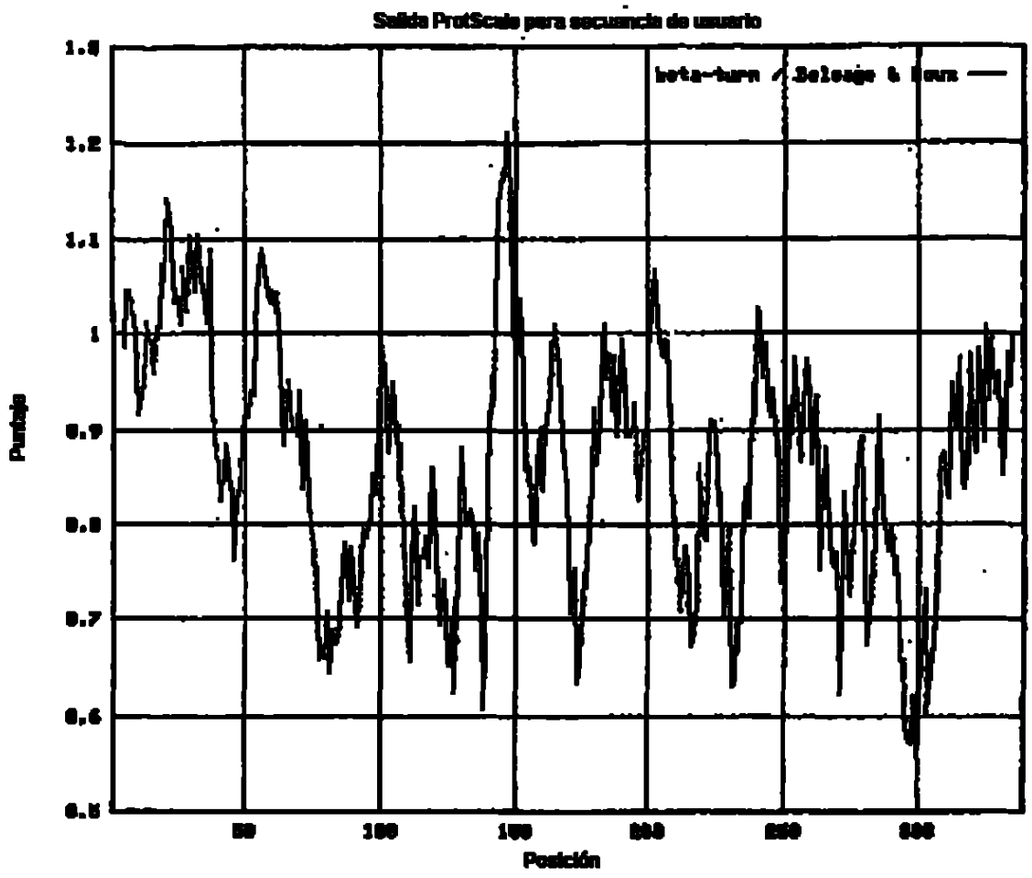


Figura 9b variante 3 de STEAP-1
Perfil de Giro Beta
(Deleage, G., Roux B. 1987. Protein Engineering 1:289-294)

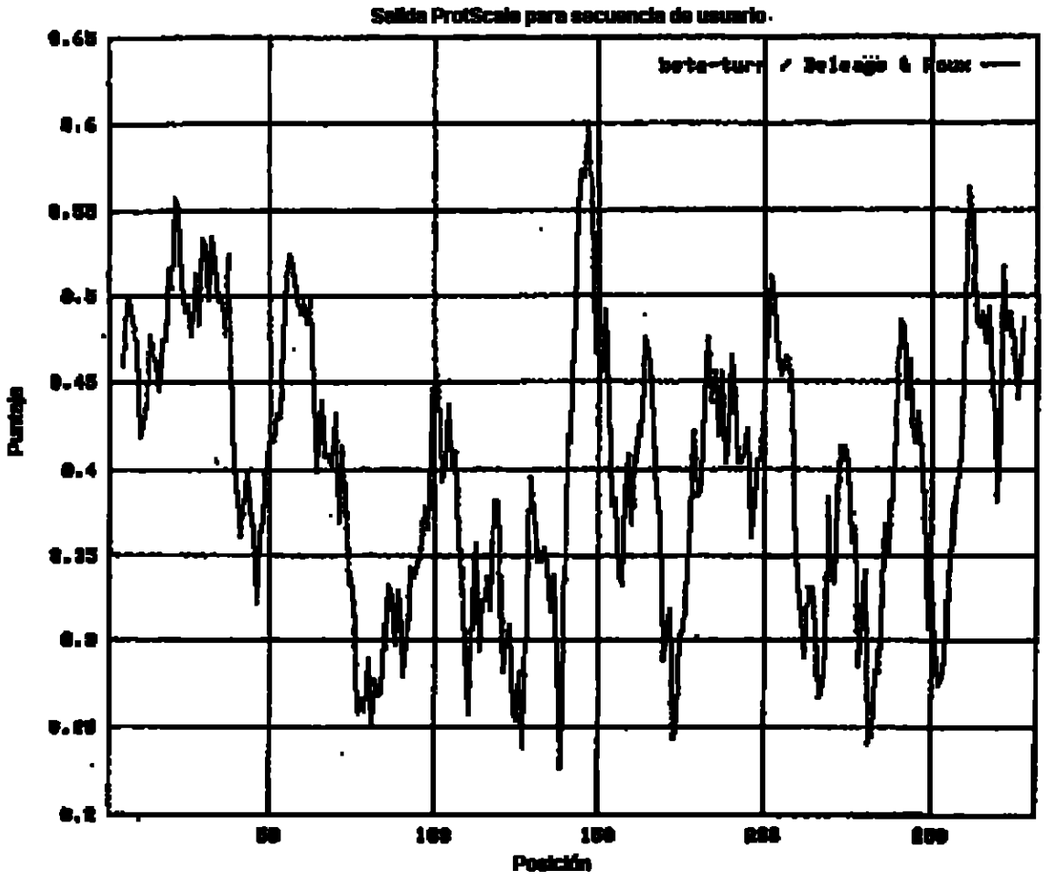


Figura 10

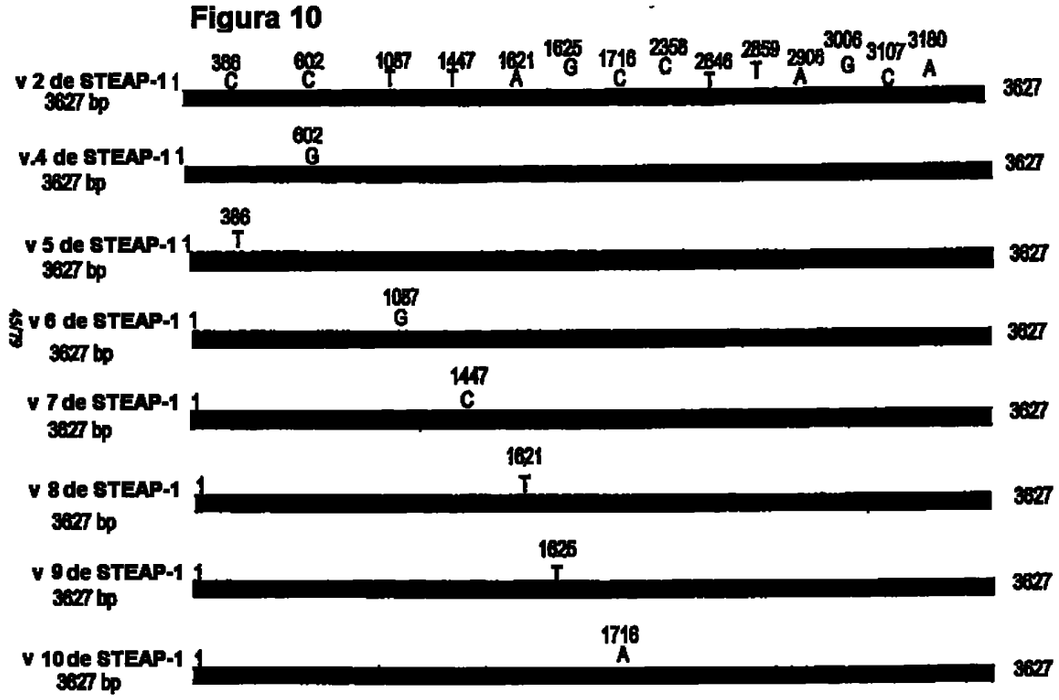

v 2 de STEAP-1
3627 bp
386 C
602 C
1087 T
1447 T
1621 A
1625 G
1716 C
2358 C
2646 T
2659 T
2906 A
3006 G
3107 C
3180 A
3627
v.4 de STEAP-1
3627 bp
602 G
v 5 de STEAP-1
3627 bp
386 T
v 6 de STEAP-1
3627 bp
1087 G
v 7 de STEAP-1
3627 bp
1447 C
v 8 de STEAP-1
3627 bp
1621 T
v 9 de STEAP-1
3627 bp
1625 T
v 10 de STEAP-1
3627 bp
1716 A

Figura 10 (cont)

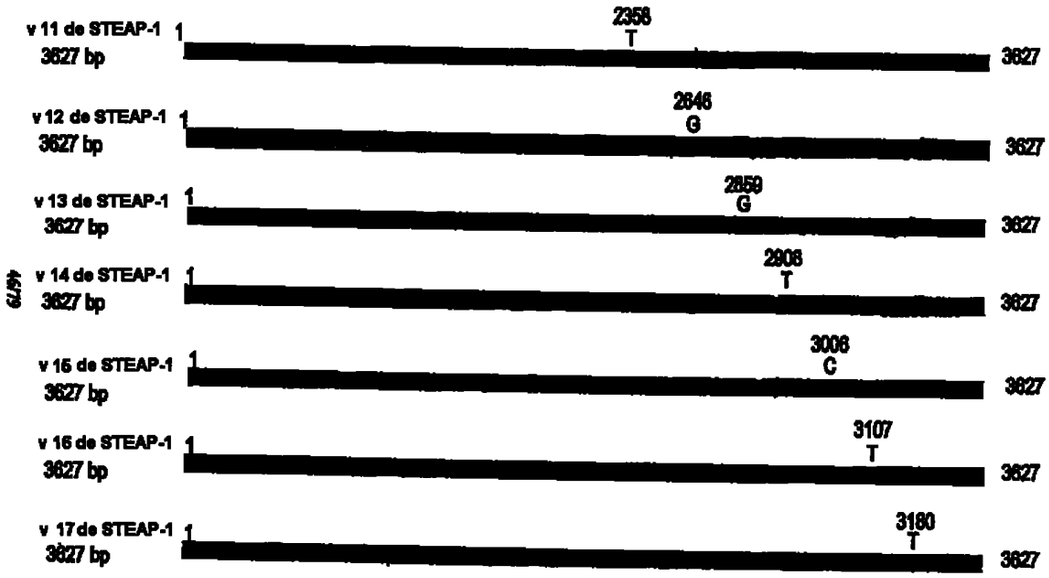


Figura 11

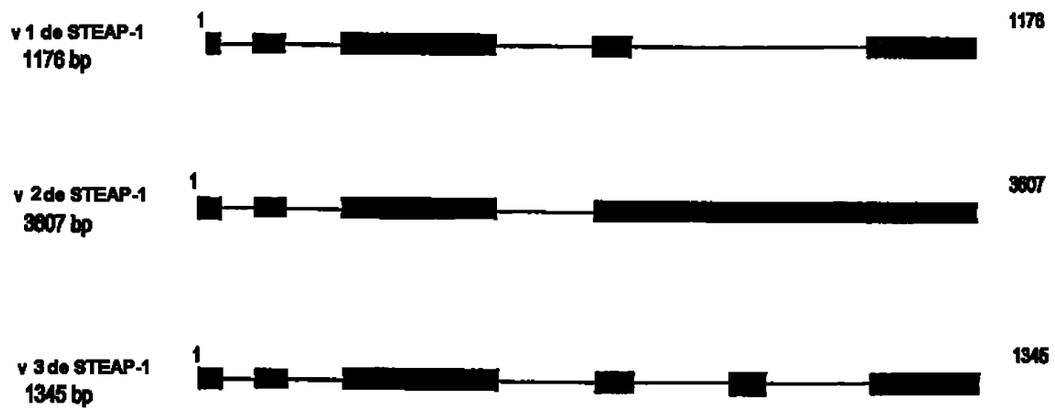

v 1 de STEAP-1
1176 bp
1
1176
v 2de STEAP-1
3607 bp
1
3607
v 3 de STEAP-1
1345 bp
1
1345

Figura 12

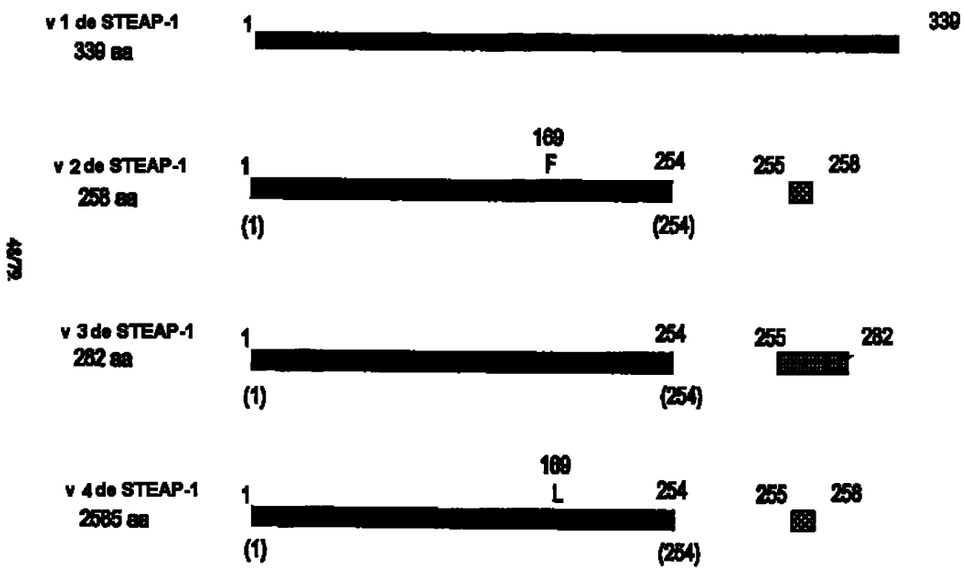
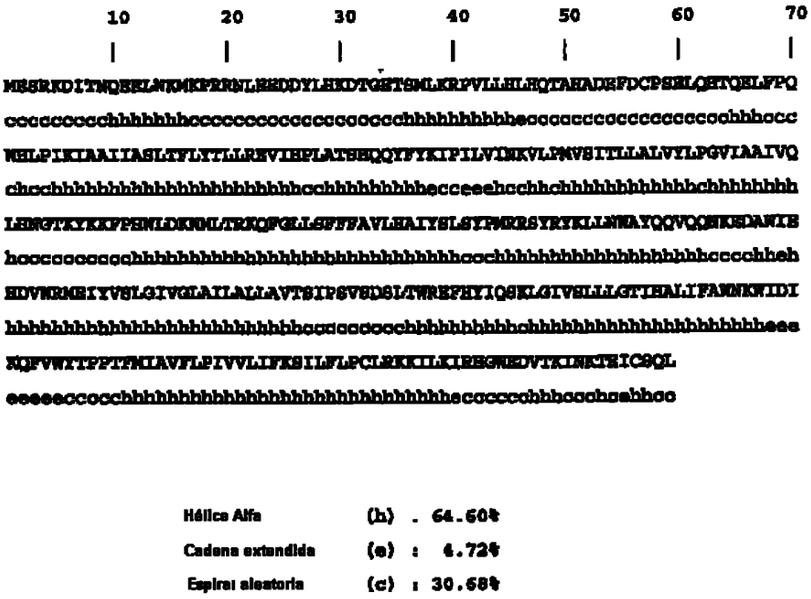
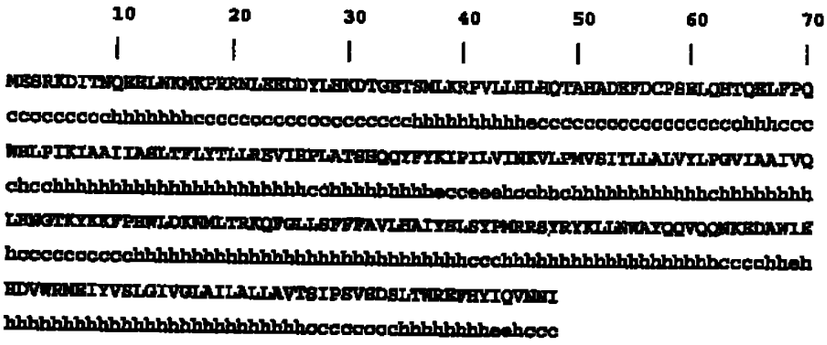

v 1 de STEAP-1
339 aa
1
339
v 2 de STEAP-1
258 aa
169
F
1
254
255
258
(1)
(254)
v 3 de STEAP-1
282 aa
1
254
255
282
(1)
(254)
v 4 de STEAP-1
2585 aa
169
L
1
254
255
258
(1)
(254)

Figura 13A Predicción de estructura Secundaria del variante 1 de STEAP-1



Hélice Alfa	(h)	. 64.60%
Cadena extendida	(e)	: 6.72%
Espiral aleatoria	(c)	: 30.68%

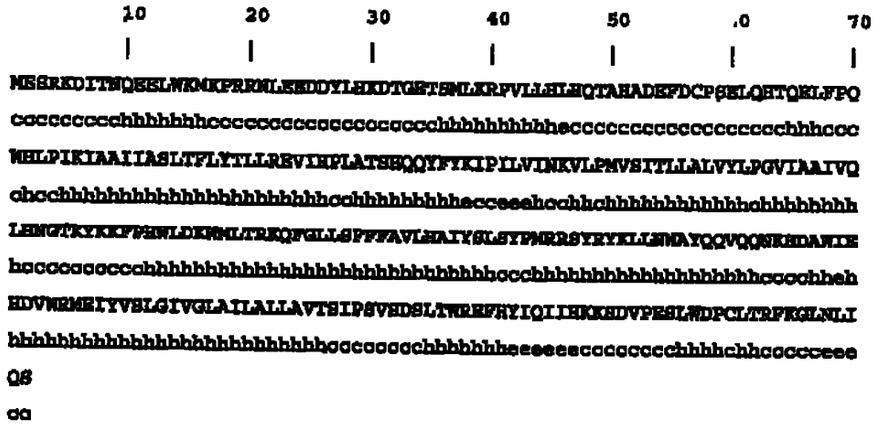
Figura 13B Predicción de estructura secundaria del variante 2 de STEAP-1



SEQ ID NO: 79

Hélice Alfa	(h)	: 62.79%
Cadena extendida	(e)	: 3.10%
Espiral aleatoria	(c)	: 34.11%

Figura 13C Predicción de estructura secundaria del variante 3 de STEAP-1



Hélice Alfa	(h)	: 58.67%
Cadena extendida	(e)	: 5.32%
Espiral aleatoria	(c)	: 35.82%

Figura 13D Predicción de transmembrana para el variante 1 de STEAP-1

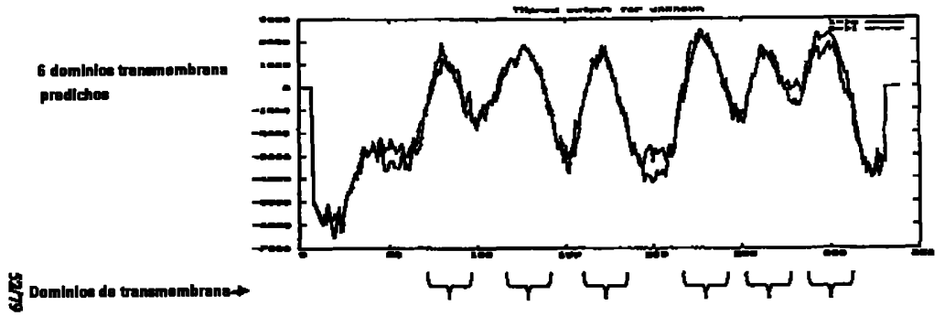
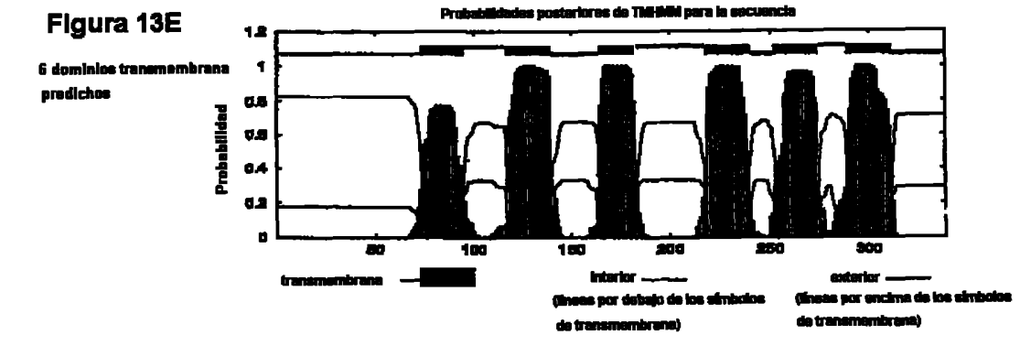


Figura 13E



Predicción de transmembrana para el variante 2 de STEAP-1

Figura 13F

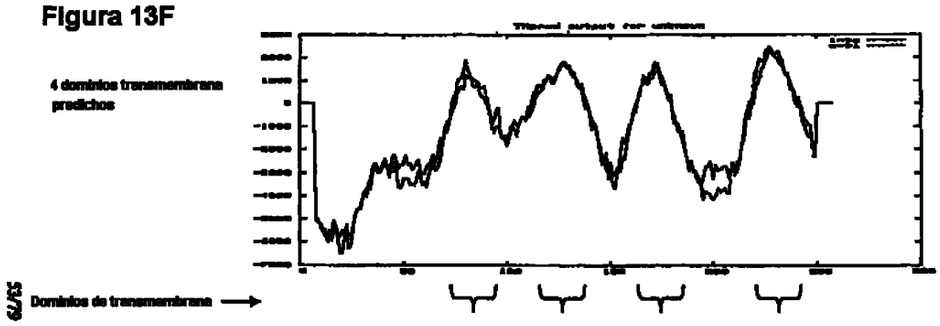
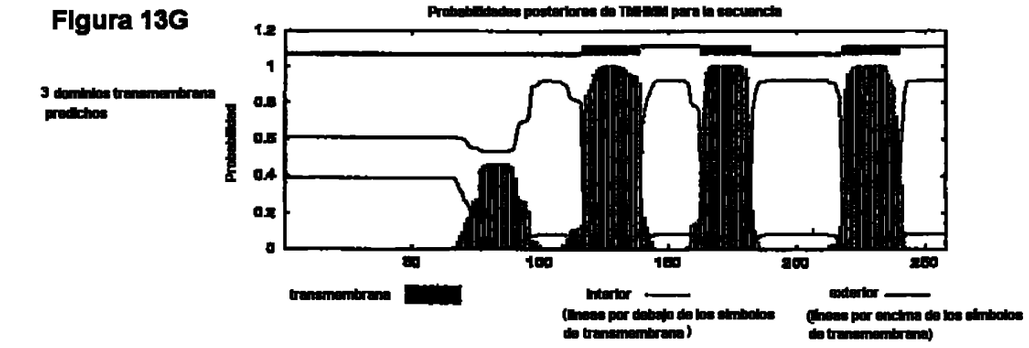


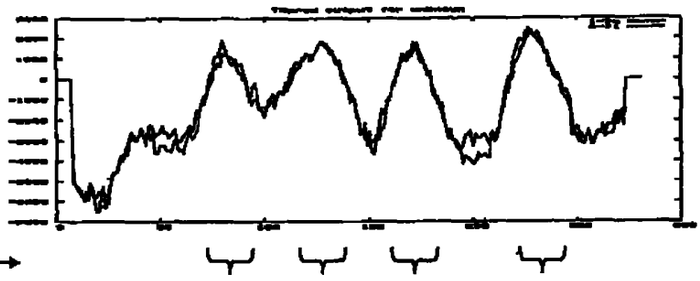
Figura 13G



Predicción de transmembrana para el variante 3 de STEAP-1

Figura 13H

4 dominios transmembrana predichos



Dominios de transmembrana →

Figura 13I

3 dominios transmembrana predichos

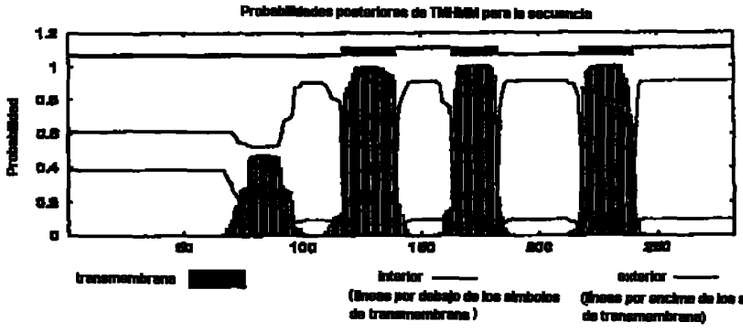
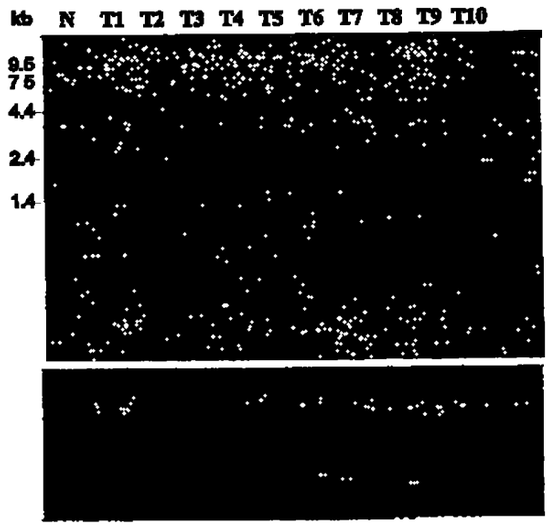


Figura 14a. Expresión de STEAP-1 en Muestras de Paciente con Cáncer de Estómago



N = Estómago normal
T = Tumor de estómago

Figura 14b. Expresión de STEAP-1 en Muestras de Paciente con Cáncer de Recto

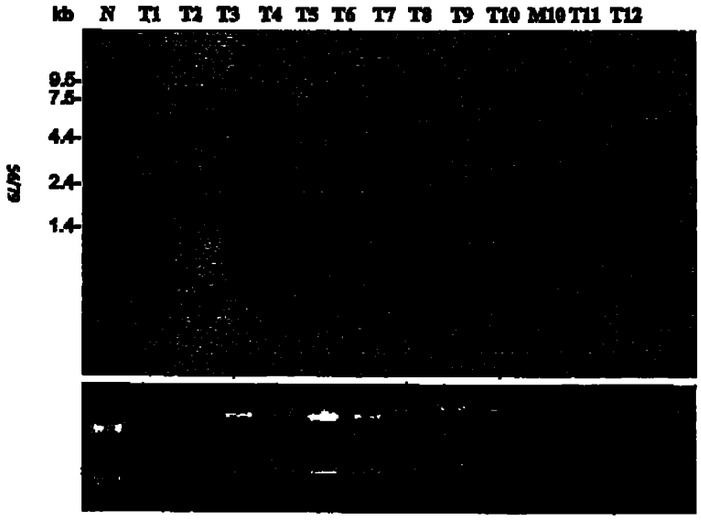


Figura 14c: Expresión de STEAP-1 en HUVEC mediante RT-PCR

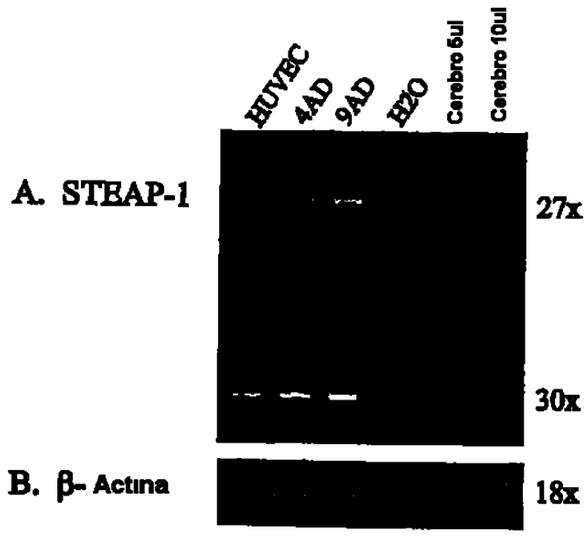
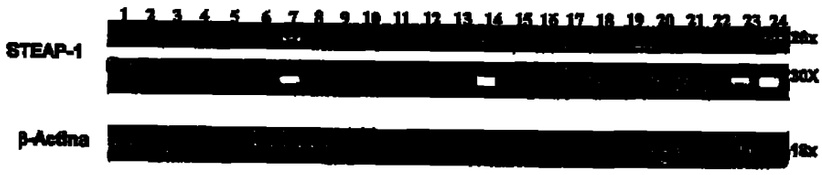


Figura 14(d) y 14(e): Expresión de STEAP-1 en Tejidos Normales y con Cáncer

14d.



1. Vejiga
2. Cerebro
3. Corazón
4. Riñón
5. Hígado
6. Pulmón
7 Próstata
8. Bazo
9. Músculo Esqu
10. Testículo
11 Páncreas
12. Colon
13. Estómago
14. Conjunto de cáncer de próstata
15. Conjunto de cáncer de vejiga
16. Conjunto de Cáncer de Riñón
17. Conjunto de cáncer de Colon
18. Conjunto de Cáncer de Pulmón
19. Conjunto de cáncer de Ovario
20. Conjunto de cáncer de Seno
21. Conjunto de Metástasis
22. Conjunto de Cáncer de Páncreas
23. Conjunto de xenoinjerto LAPC
24. Met. de Próstata a Ganglio Linfático

14e.

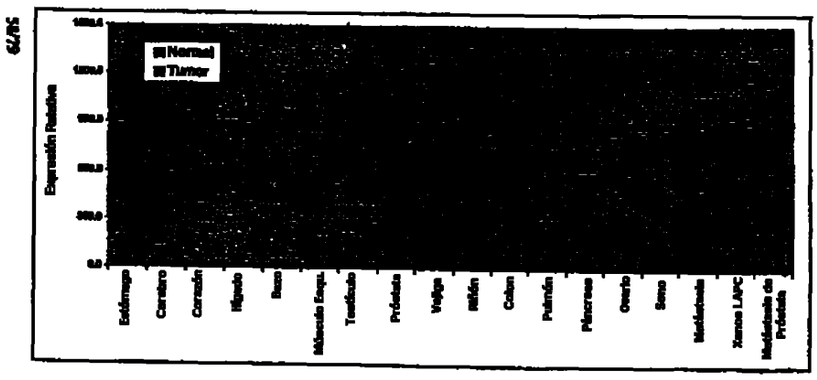


Figura 14(f): Expresión de STEAP-1 en Muestras de Pacientes con Linfomas

Paciente#	Diagnóstico	Expresión de STEAP-1
1	Linfoma folicular de Bazo Tipo de célula B atípica	
2	LCA+,CD20+,KI+,CD3-, Queratina	
3	Tipo célula B grande difusa	
4	Hodkin, celularidad mixta	
5	Linfoma de Manto celular	
6	Tipo de célula B de célula grande	
7	Linfoma de célula grande 6 célula pequeña mixto difuso - Etapa II	
8	Linfoma de célula grande difusa-Etapa I	
9	CD20+,CD10+,CD22+, CD14-,CD38-,CD5-,CD3-	
10	Linfoma de célula B (CD5-&CD10-)	
11	Tipo Linfático B pequeño (CLL)	
Porcentaje		72.7%

	Expresión Fuerte
	Expresión Media
	Sin expresión

Figura 15 MAbs específicas de STEAP-1 de Superficie celular

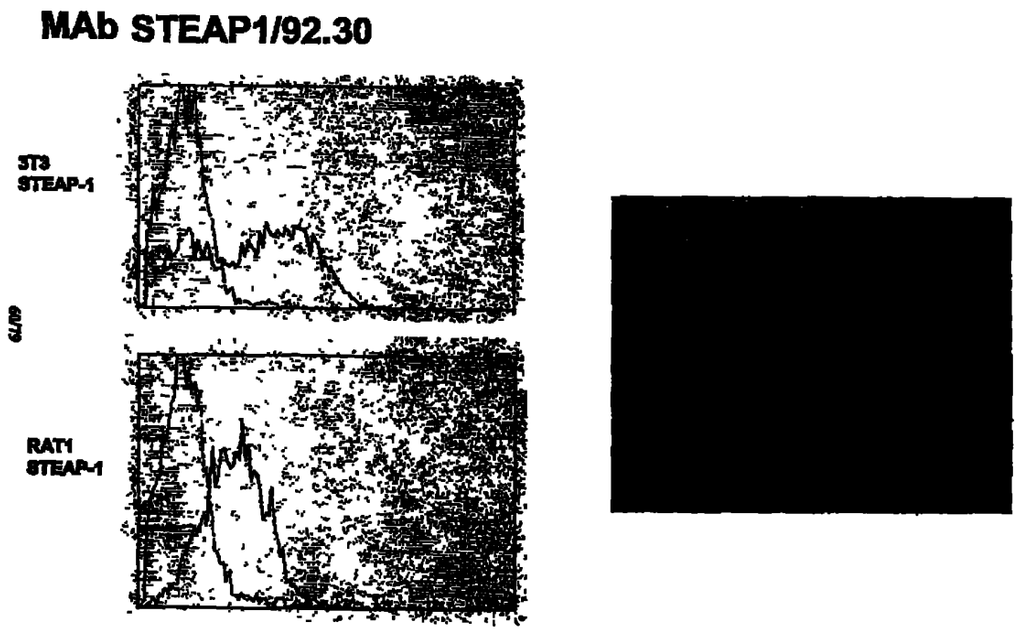


Figura 16. MAb STEAP1/92 30 Reconoce STEAP-1 de Superficie celular en Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Humanos

Xenoinjerto LAPC9 de Cáncer de Próstata

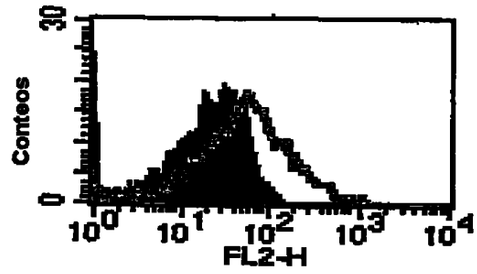


Figura 17: MAb STEAP1/92.30 Reconoce STEAP-1 de Ratón

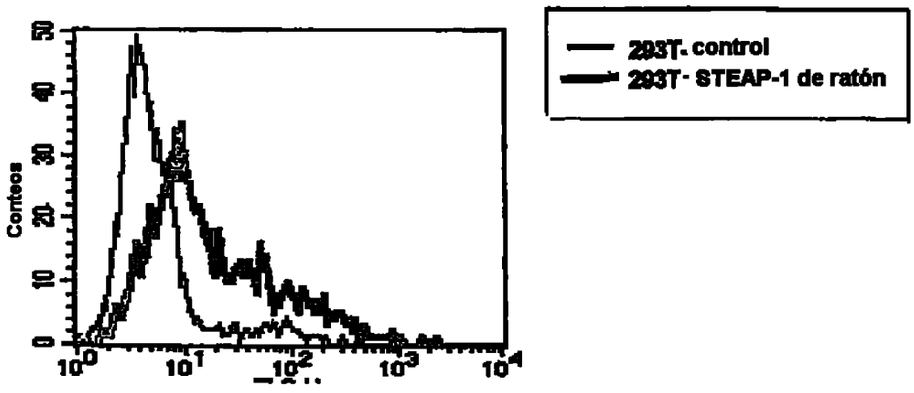


Figura 18 MAb STEAP1/120 545 Reconoce STEAP-1 de Superficie Celular

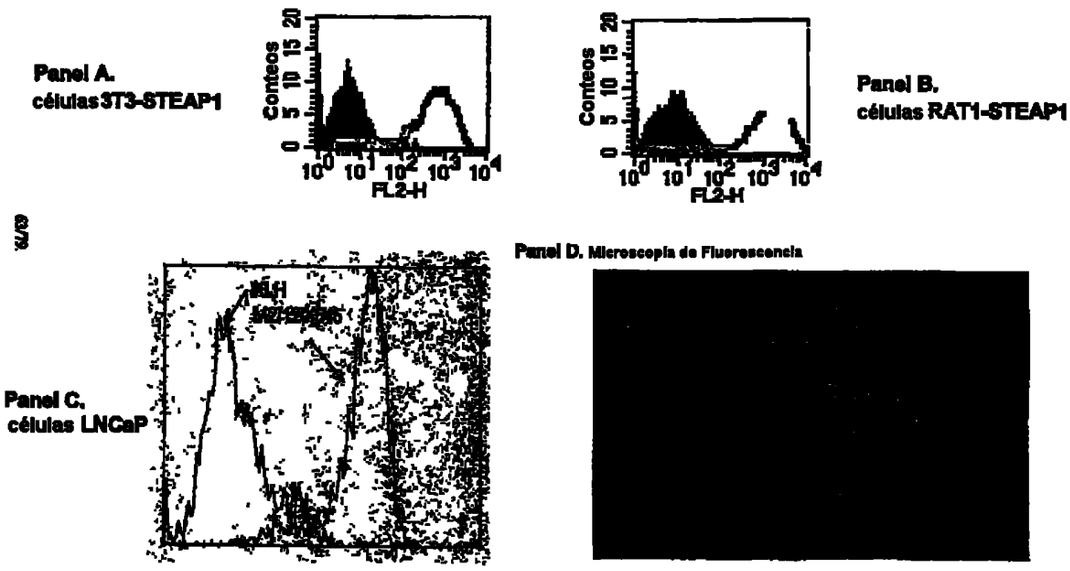


Figura 19:

Figura 19a. El cADN y secuencia de amino ácido del clon #2 de M2A92.30VH

```
  1 V  K  L  Q  E  S  G  P  E  L  K  K  P  G  E  T  V  K  I  S
  1 gtcaagctgcaggagtctggacctgagctgaagaagcctggagagacagtcaagatctcc
 21 C  K  A  S  G  Y  T  F  T  N  Y  G  M  N  W  V  K  Q  A  P
 61 tgcaaggcttctgggtataccttcacaaactatggaatgaactgggtgaagcaggctcca
 41 G  K  G  L  K  W  M  G  W  I  N  T  Y  T  G  E  P  T  Y  A
121 ggaaagggtttaaagtggatgggctggataaacacctacactggagagccaacatatgct
 61 D  D  F  K  G  R  F  A  F  S  L  E  T  S  A  S  T  A  Y  L
181 gatgacttcaagggacggtttgccttctctttggaaacctctgccagcactgcctatttg
 81 Q  I  N  N  L  K  N  E  D  T  A  T  Y  F  C  A  R  P  W  F
241 cagatcaacaacctcaaaaatgaggacacggctacatatttctgtgcaagaccctggttt
101 A  Y  W  G  Q  G  T  T  V  T  V  S  S
301 gcttactgggccaagggaccacggtcaccgtctcctca
```

Figura 19b. El cADN y secuencia de amino ácido del clon #2 de M2A92.30VL

```
  1 G  L  F  E  A  A  T  M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  M  I  R
  1 ggactgttcgaagccgccaccatgaagttgcctgttaggctgttggtgctctggattccgg
 21 E  T  N  G  D  V  V  M  T  Q  T  P  L  T  L  S  V  T  I  G
 61 gaaaccaacggtgatgttgtgatgacccagactccactcacatttgtcggttaccaattgga
 41 Q  P  A  S  I  S  C  K  S  S  Q  S  L  L  D  S  D  G  K  T
121 caaccagcctccatctcttgcaagtcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaagaca
 61 Y  L  N  W  L  L  Q  R  P  G  Q  S  P  K  R  L  I  Y  L  V
181 tatttgaattggttgttacagaggccaggccagtctccaaagcgcctaatctatctggtg
 81 S  K  L  D  S  G  V  P  D  R  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F
241 tctaaactggactctggagtccctgacaggttcactggcagtggatcagggacagatttc
101 T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  L  G  V  Y  Y  C  W  Q  G
301 acactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatttgggagtttattattgctggcaaggt
121 T  H  F  P  P  T  F  G  S  G  T  K  L  E  I  K  R  T  D  A
361 acacattttccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaacgtacggatgct
141 A  P  T  V  S
421 gcaccaactgtatcc
```

Figura 19c. El cADN y secuencia de amino ácido del clon #8 de M2A92.30VL

```
  1 G  L  F  E  A  A  T  M  K  A  P  A  Q  L  T  L  S  V  T  I
  1 ggactgttcgaagccgccaccatggaagccccagctcagcttcactttgtcggttaccatt
 21 G  Q  P  A  S  I  S  C  K  S  S  Q  S  L  L  D  S  D  G  K
 61 ggacaaccagcctccatctcttgcaagtcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaag
 41 T  Y  L  N  W  L  L  Q  R  P  G  Q  S  P  K  R  L  I  Y  L
121 acatatttgaattggttgttacagaggccaggccagtctccaaagcgcctaatctatctg
 61 V  S  K  L  D  S  G  V  P  D  R  F  T  G  S  G  S  G  T  D
181 gtgtctaaactggactctggagtccctgacaggttcactggcagtggatcagggacagat
 81 F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  L  G  V  Y  Y  C  W  Q
241 ttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatttgggagtttattattgctggcaa
101 G  T  H  F  P  P  T  F  G  S  G  T  K  L  E  I  K  R  T  D
301 ggtacacattttccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaacgtacggat
121 A  A  P  T  V  S
361 gctgcaccaactgtatcc
```

Figura 19D El cADN y secuencia de amino ácido del clon #8 de MZ/X120.545 VL

```
  1 M  G  F  K  M  K  S  Q  A  Q  V  L  M  L  L  L  L  W  V  S
  1 atgggcttcaagatggagtcacaggcccaggttcttctgttactgctgctatgggtatct
 21 G  T  C  G  D  I  V  M  S  Q  S  P  S  S  L  A  V  S  V  G
 61 ggtacctgtggggacattgtgatgtcacagtctccatcctccctagctgtgtcagttgga
 41 E  K  V  T  M  S  C  K  S  S  Q  S  L  L  Y  R  S  N  Q  K
121 gagaaggttaccatgagctgcaagtccagtcagagcctttttatagaagcaatcaaaag
 61 N  Y  L  A  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  S  P  K  L  L  I  Y  W
181 aactactggcatgggtaccagcagaaaccagggcagtctcctaaactgctgatttactgg
 81 A  S  T  R  H  S  G  V  P  D  R  F  T  G  S  G  S  G  T  D
241 gcatccactagggaatctggggtcctgatcgcttcacaggcagtggatctgggacagat
101 F  T  L  T  I  S  S  V  K  A  E  D  L  A  V  Y  Y  C  Q  Q
301 ttcactctcaccatcagcagtgtgaaggctgaagacctggcagtttattactgtcagcaa
121 Y  Y  N  Y  P  L  T  F  G  G  G  T  K  L  E  I  K  R  T  D
361 tattatagttatcctctcacgttcggtggagggaccaaactggaaataaaacgtacggat
141 A  A  P  T  V  S
421 gctgcaccaactgtatcc
```

Figura 20:

Figura 20a. La secuencia de amino ácido del clon # 2 de M2A92.30VH

```
  1 VKLQESGPEL KKPGETVKIS CKASGYTFTN YGMNWVKQAP GKGLKWMGWI NTYTGEPTYA
 61 DDFKGRFAFS LETSASTAYL QINNLKNEDT ATYFCARPWF AYWGQGTTVT VSS
```

Figura 20 b La secuencia de amino ácido del clon # 2 de M2A92.30VL

```
  1 GLFSAATMKL PVRLLVLMIR ETNGDVVMTQ TPLTLSVTIG QPASISCKSS QSLLDSDGKT
 61 YLNWLLQRPG QSPKRLIYLV SKLDSGVPDR FTGSGSGTDF TLKISRVEAE DLGVYYCWQG
121 THFPFTTGSG TKLEIKRTDA APTVS
```

Figura 20c. El cADN y secuencia de amino ácido del clon #6 de M2A92.30VL

```
1 G  L  F  S  A  A  T  M  K  L  P  V  R  L  L  V  L  M  I  R.
1 ggactgttcagcagccgccaccatggaagccccagctcagctcctttgtcggttaccatt
21 G  Q  P  A  S  I  S  C  K  S  S  Q  S  L  L  D  S  D  G  K
61 ggacaaccagcctccatctcttgcaagtcaagtcagagcctcttagatagtgatggaaag
41 T  Y  L  N  W  L  L  Q  R  P  G  Q  S  P  K  R  L  I  Y  L
121 acatatttgaattggttgttacagaggccaggccagtctccaaagcgcctaatctatctg
61 V  S  K  L  D  S  G  V  P  D  R  F  T  G  S  G  S  G  T  D
181 gtgtctaaactggactctggagtccctgacaggttcactggcagtggatcagggacagat
81 F  T  L  K  I  S  R  V  E  A  E  D  L  G  V  Y  Y  C  W  Q
241 ttcacactgaaaatcagcagagtggaggctgaggatttgggagtttattattgctggcaa
101 G  T  H  F  P  F  T  F  G  S  G  T  K  L  E  I  K  R  T  D
301 ggtacacattttccattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaacgtacggat
121 A  A  P  T  V  S
361 gctgcaccaactgtatcc
```

Figura 20d. Alineación de amino ácido del clon #2 M2A92.30VL y el clon #6 M2A92.30VL

```
Clone 2: 1   GLFSAATMKLPVRLLVLMIRETNGDVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKT 60
             GLFSAATM+ P +L                    TLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKT
Clone 6: 1   GLFSAATMSAPAQL--------------------TLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKT 41

Clone 2: 61  YLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQG 120
             YLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQG
Clone 6: 42  YLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQG 101

Clone 2: 121 THFPFTTGSGTKLEIKRTDAAPTVS 145
             THFPFTTGSGTKLEIKRTDAAPTVS
Clone 6: 102 THFPFTTGSGTKLEIKRTDAAPTVS 126
```

Figura 20e. La secuencia de amino ácido del clon #6 de M2A120.545VL. La secuencia del péptido de señal está subrayado

```
  1 MGFTMESQAQ VLMLLLLWVS GTCGDIVMSQ SPSSLAVSVG EKVTMSCKSS QSLLYRSNQK
 61 NYLAWYQQKP GQSPKLLIYW ASTRESGVPD RFTGSGSGTD FTLTISSVKA EDLAVYYCQQ
121 YYSYPRTFGG GTKLEIKRTD AAPTVS
```

Figura 21: MAb STEAP1M2/92 30 Reconoce STEAP-1 de Superficie Celular en Xenoinjertos de Cáncer de Próstata y Vejiga Humanos

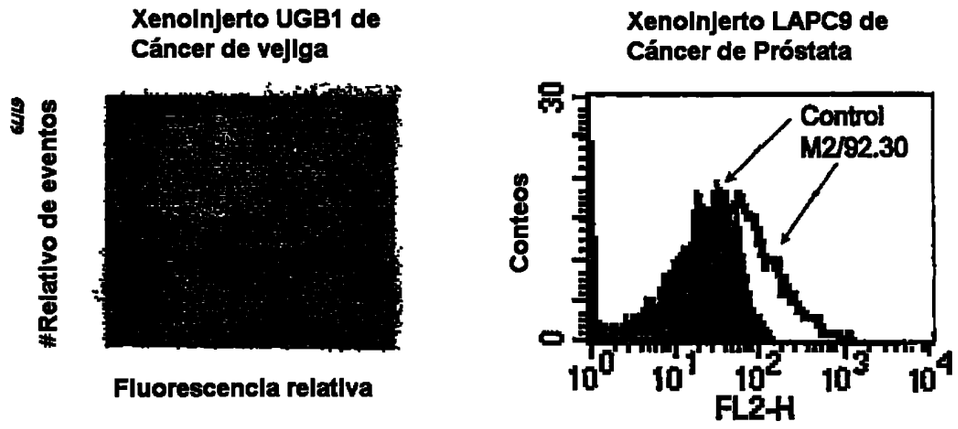
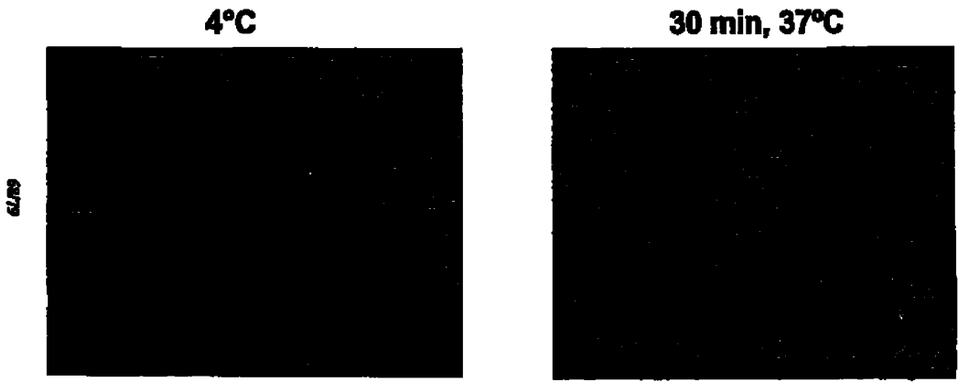


Figura 22: Internalización de STEAP-1 por MAb STEAP1 M2/92.30



Microscopía Fluorescente

Figura 23: Internalización de MAb STEAP-1 por STEAP1 M2/120.545

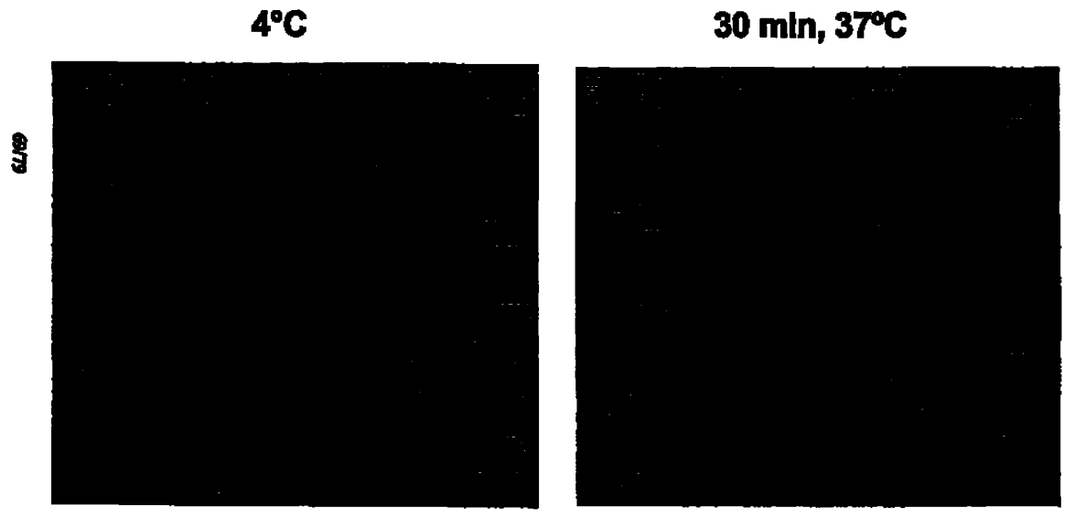


Figura 24: Internalización de STEAP-1

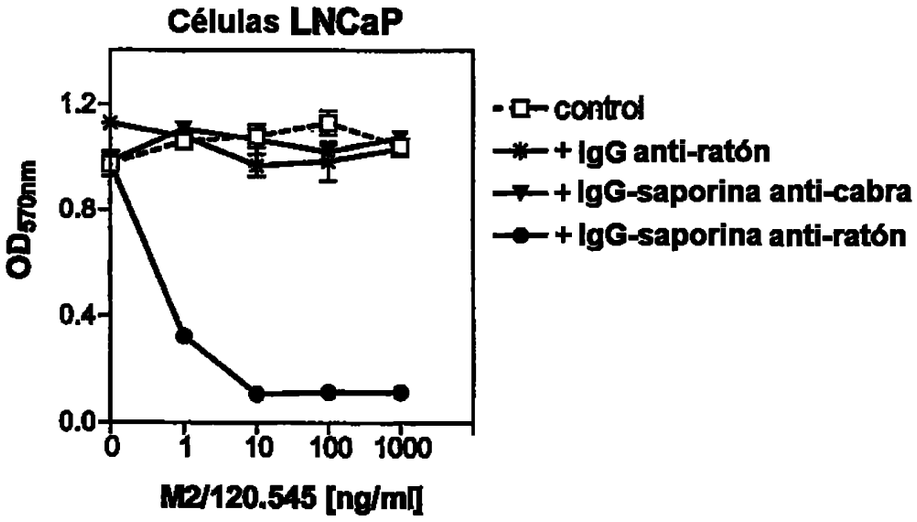
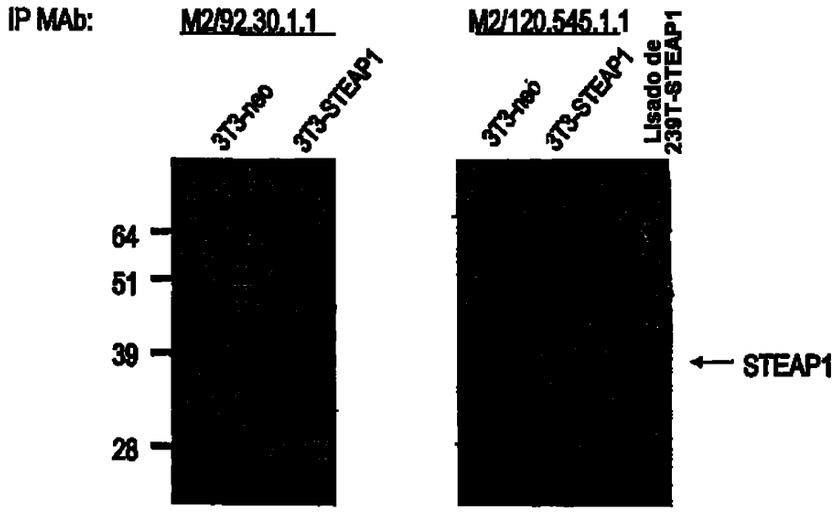


Figura 25 - Inmunoprecipitación de STEAP1 por MAbs M2/92.30 y M2/120.545 anti-STEAP1



Manchas occidentales realizadas con pAb anti-STEAP de conejo

Figura 26: Efecto de MAbs STEAP-1 en el crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Humano LAPC9 en Ratones

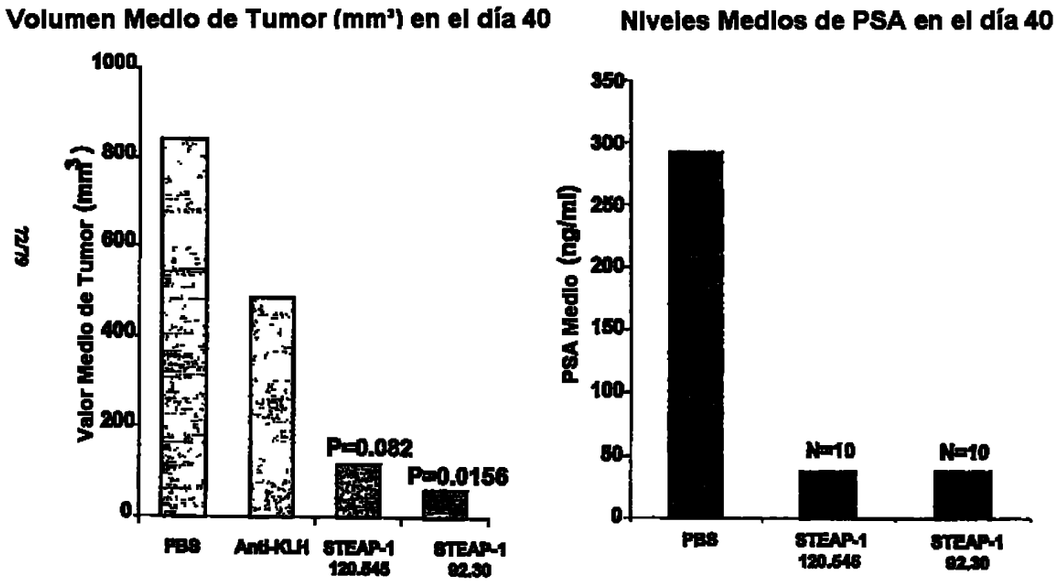
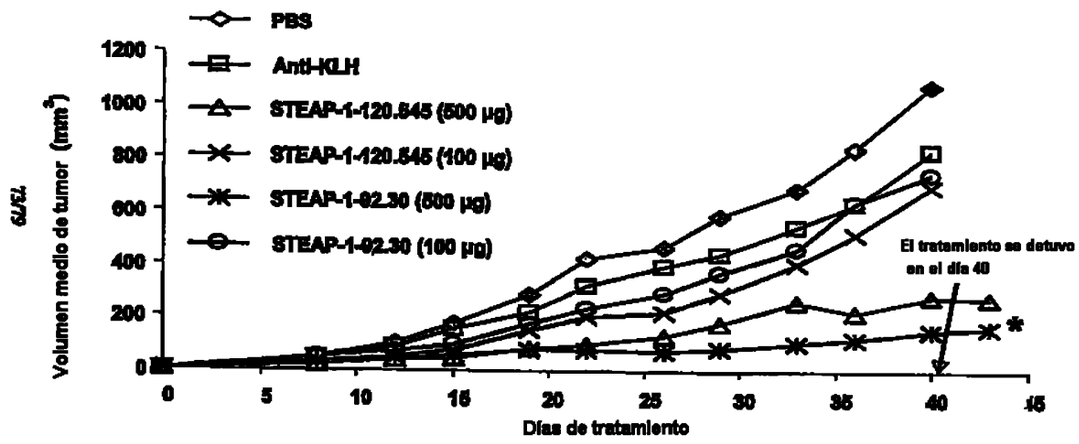
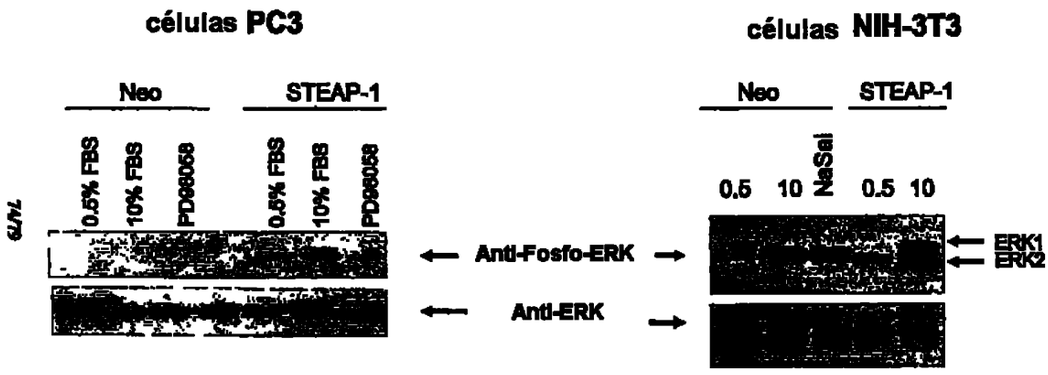


Figura 27: Efecto de MAbs STEAP-1 en el crecimiento de Xenoinjertos de Cáncer de Próstata Humano LAPC9 en Ratones



- El tratamiento inició en el mismo día de inyección de célula de tumor subcutánea ($2x10^6$/ ratón, n=10/grupo)
- Inyección ip de MAb- 100 o 500 µg/dosis, 2/semana, 12 inyecciones (último día d40)
- * Diferencia significativa comparada con controles de PBS y anti-KLH con $p < 0.05$)

Figura 28: STEAP-1 Induce la Fosforilación de ERK



- La Expresión de STEAP-1 induce la fosforilación de ERK
- La fosforilación de ERK1 mediada por FBS es inhibida por el inhibid r MEK PD 98038

Figura 29: STEAP-1 Media la Comunicación Célula-Célula



PC3-Neo PC3-STEAP-1 PC3-Gen de Control

Figura 30: La Comunicación celular requiere la Expresión de STEAP-1 en las células Donadoras y Recipientes

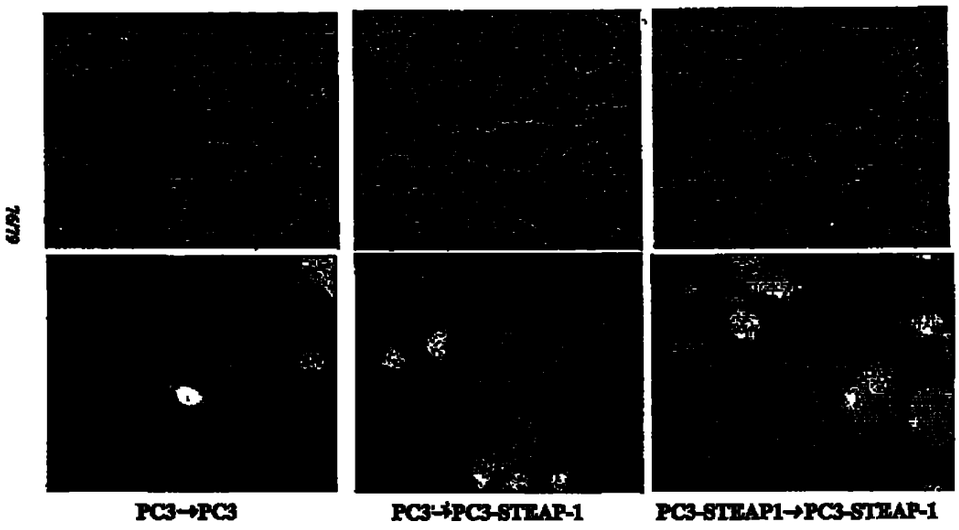
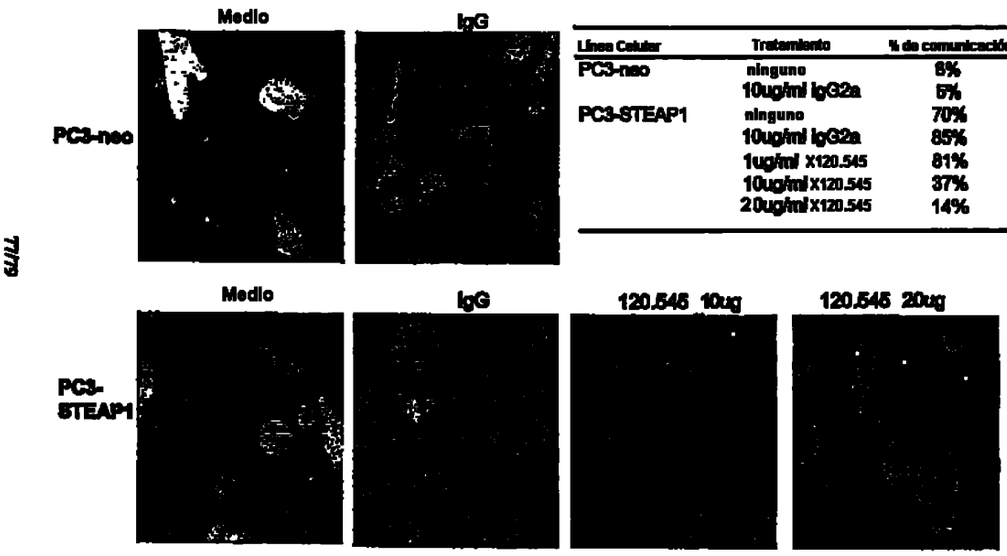


Figura 31: MAb STEAP1/120.545
Efecto de la Unión de Brecha



Línea Celular	Tratamiento	% de comunicación
PC3-neo	ninguno	6%
	10ug/ml IgG2a	5%
PC3-STEAP1	ninguno	70%
	10ug/ml IgG2a	65%
	1ug/ml X120.545	61%
	10ug/ml X120.545	37%
	20ug/ml X120.545	14%

Figura 32: Inhibición de la Fosforilación de ERK por mAb y ARNi de STEAP-1

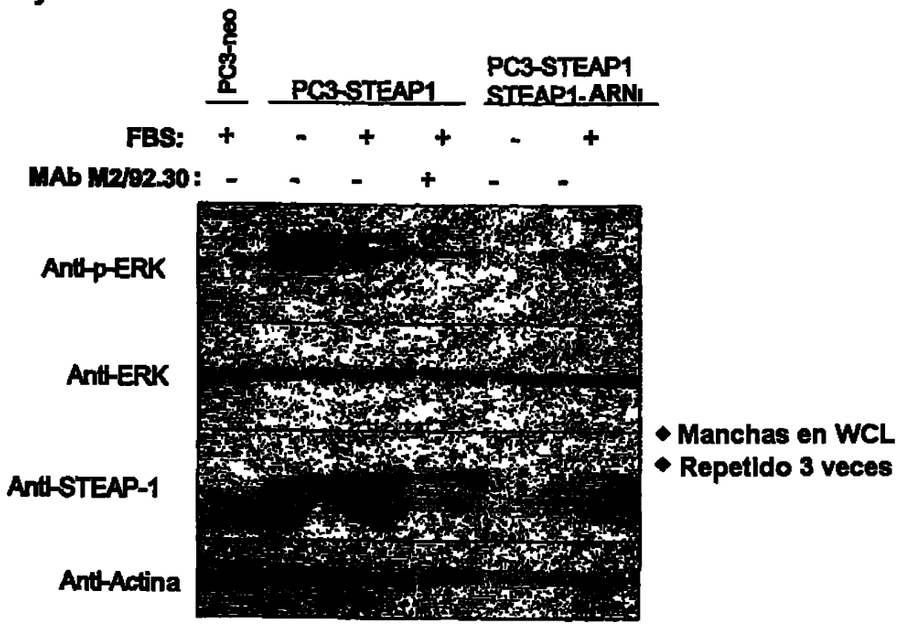
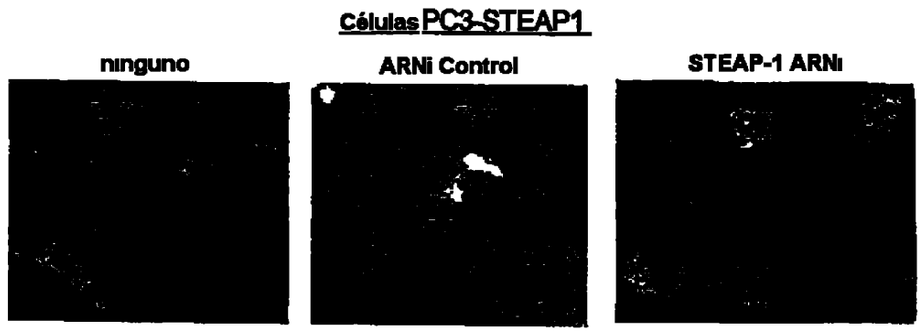


Figura 33: Efecto del ARNi de STEAP-1 en la comunicación Célula-Célula



	Tratamiento	% de Transferencia
PC3-neo		5.2
PC3-STEAP1		76
	Control	47
	STEAP-1 ARNi	4.8

Listdo de Secuencias

<110> Agensys, Inc.
Jakobovits, Aya
Etessami, Soudabeh
Challita-Eid, Pia M.
Perez-Villar, Juan
Meyrick Morrison, Karen Jane
Jia, Xiao-Chi
Faris, Mary
Gudas, Jean
Raitano, Arthur B.

<120> Anticuerpos y Moleculas derivadas de
estos que se enlazan a proteinas STEAP-1

<130> 51158-20016.61

<140> PCT/US04/12625
<141> 2004-04-22

<150> 09/323,873
<151> 1999-06-01

<150> 10/010,667
<151> 2001-12-06

<150> 10/011,095
<151> 2001-12-06

<150> 10/236,878
<151> 2002-09-06

<150> 10/165,044
<151> 2002-06-06

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

<150> 60/091,183
<151> 1998-06-30

<150> 60/317,840
<151> 2001-09-06

<150> 60/370,387
<151> 2002-04-05

<150> 60/296,656
<151> 2001-06-06

<150> 60/087,520
<151> 1998-06-01

<160> 103

<170> FastSEQ Para Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 436
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1
gtacagcaaa aaagaaactg agaagcccaa actgctttct tgttaacatc cacttatcca 60
accaatgtgg aaacttctta tacttggttc cattatgaag ttggacaatt gctgctatca 120
cacctggcag gtaaaccaat gccaagagag tgatggaaac cattggcaag actttgttga 180
tgaccaggat tggaatttta taaaaatatt gttgatggga agttgctaaa gggtgaatta 240

```
cttccctcag aagagtgtaa agaaaagtca gagatgctat aatagcagct attttaattg 300
gcaagtgcca ctgtggaaag agttcctgtg tgtgctgaag ttctgaaggg cagtcaaatt 360
catcagcatg ggctatttgg tgcaaatgca aaagcacagg tcttttttagc atgctggtct 420
ctcccgtgtc cttatg                                                  436

<210> 2
<211> 1193
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (66)...(1085)

<400> 2
ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga gtgggtggct gaagccatac tattttatag 60
aatta atg gaa agc aga aaa gac atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa 110
      Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys
       1               5                  10                  15

atg aag cct agg aga aat tta gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac   158
Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp
                   20                  25                  30

acg gga gag acc agc atg cta aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac   206
Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His
               35                  40                  45

caa aca gcc cat gct gat gaa ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac   254
Gln Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His
           50                  55                  60

aca cag gaa ctc ttt cca cag tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct   302
Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala
       65                  70                  75

att ata gca tct ctg act ttt ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att   350
Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile
   80                  85                  90                  95

cac cct tta gca act tcc cat caa caa tat ttt tat aaa att cca atc   398
His Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile
                  100                 105                 110

ctg gtc atc aac aaa gtc ttg cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca   446
Leu Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala
              115                 120                 125

ttg gtt tac ctg cca ggt gtg ata gca gca att gtc caa ctt cat aat   494
Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn
          130                 135                 140

gga acc aag tat aag aag ttt cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta   542
Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu
      145                 150                 155

aca aga aag cag ttt ggg ctt ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat   590
Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His
160                 165                 170                 175

gca att tat agt ctg tct tac cca atg agg cga tcc tac aga tac aag   638
Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys
                  180                 185                 190

ttg cta aac tgg gca tat caa cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc   686
Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala
              195                 200                 205

tgg att gag cat gat gtt tgg aga atg gag att tat gtg tct ctg gga   734
```

```
Trp Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly
        210                 215                 220

att gtg gga ttg gca ata ctg gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca   782
Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro
    225                 230                 235

tct gtg agt gac tct ttg aca tgg aga gaa ttt cac tat att cag agc   830
Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser
240                 245                 250                 255

aag cta gga att gtt tcc ctt cta ctg ggc aca ata cac gca ttg att   878
Lys Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile
                260                 265                 270

ttt gcc tgg aat aag tgg ata gat ata aaa caa ttt gta tgg tat aca   926
Phe Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr
            275                 280                 285

cct cca act ttt atg ata gct gtt ttc ctt cca att gtt gtc ctg ata   974
Pro Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile
        290                 295                 300

ttt aaa agc ata cta ttc ctg cca tgc ttg agg aag aag ata ctg aag   1022
Phe Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys
    305                 310                 315

att aga cat ggt tgg gaa gac gtc acc aaa att aac aaa act gag ata   1070
Ile Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile
320                 325                 330                 335

tgt tcc cag ttg tag aattactgtt tacacacatt tttgttcaat attgatatat   1125
Cys Ser Gln Leu  *

tttatcacca acatttcaag tttgtatttg ttaataaaat gattacaagg aaaaaaaaaa 1185
aaaaaaaa                                                         1193

<210> 3
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1               5                  10                  15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
            20                  25                  30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
        35                  40                  45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
    50                  55                  60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65                  70                  75                  80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
                85                  90                  95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100                 105                 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115                 120                 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130                 135                 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145                 150                 155                 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165                 170                 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180                 185                 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
```

```
        195                 200                 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210                 215                 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
                245                 250                 255
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
            260                 265                 270
Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
        275                 280                 285
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe
    290                 295                 300
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
305                 310                 315                 320
Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys
                325                 330                 335
Ser Gln Leu
```

<210> 4
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 4

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac    113
                                      Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                       1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
```

```
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
```

aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 5
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1   5   10   15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
            20   25   30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
        35   40   45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
    50   55   60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65   70   75   80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
                85   90   95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100   105   110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115   120   125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130   135   140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145   150   155   160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165   170   175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180   185   190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195   200   205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210   215   220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225   230   235   240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245   250   255
Asn Ile

<210> 6
<211> 1365
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(944)

<400> 6
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tatttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac 113
                                    Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                     1   5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta 161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
             10   15   20

```
gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
          25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
      40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
 55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                 75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac cct tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
             90                  95                 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag att atc cat aag aag agt gat gtg   881
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ile Ile His Lys Lys Ser Asp Val
            250                 255                 260

cca gaa tca ctc tgg gat cct tgt ctg aca aga ttc aaa gga cta aat   929
Pro Glu Ser Leu Trp Asp Pro Cys Leu Thr Arg Phe Lys Gly Leu Asn
        265                 270                 275

tta att cag tca tga acactgccaa ttaccgttta tgggtagaca tctttggaaa   984
Leu Ile Gln Ser *
    280
```

tttccacaag agcaagctag gaattgtttc ccttctactg ggcacaatac acgcattgat 1044
ttttgcctgg aataagtgga tagatataaa acaatttgta tggtatacac ctccaacttt 1104
tatgatagct gttttccttc caattgttgt cctgatattt aaaagcatac tattcctgcc 1164
atgcttgagg aagaagatac tgaagattag acatggttgg gaagacgtca ccaaaattaa 1224
caaaactgag atatgttccc agttgtagaa ttactgttta cacacatttt tgttcaatat 1284
tgatatattt tatcaccaac atttcaagtt tgtatttgtt aataaaatga ttattcaagg 1344
aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 1365

<210> 7
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ile Ile
245 250 255
His Lys Lys Ser Asp Val Pro Glu Ser Leu Trp Asp Pro Cys Leu Thr
260 265 270
Arg Phe Lys Gly Leu Asn Leu Ile Gln Ser
275 280

<210> 8
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 8
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac 113
Met Glu Ser Arg Lys Asp
1 5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta 161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu

```
                10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttg ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Leu Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
```

tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 9
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1   5   10   15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
            20   25   30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
        35   40   45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
    50   55   60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65   70   75   80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
                85   90   95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100   105   110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115   120   125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130   135   140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145   150   155   160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Leu Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165   170   175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu

```
            180                 185                 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195                 200                 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210                 215                 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245                 250                 255
Asn Ile
```

<210> 10
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 10

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac    113
                                       Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                         1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac cct tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
```

```
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                 3627
```

<210> 11
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11

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

<210> 12
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 12

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac    113
                                        Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                         1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
             10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
         25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
     40                  45                  50
```

```
ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
 55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                 75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
             90                  95                 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttgttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
catttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
```

actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 13
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
245 250 255

Asn Ile

<210> 14
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 14

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac     113
                                        Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                         1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
```

```
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt attttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgccaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
catttttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                 3627
```

<210> 15
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15

```
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 16
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 16

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac    113
                                        Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                         1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85
```

```
ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
             90                  95                 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagtt atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
```

tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 17
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Asn Ile

<210> 18
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 18
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac 113
Met Glu Ser Arg Lys Asp
1 5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta 161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
10 15 20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta 209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
25 30 35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa 257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
40 45 50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag 305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55 60 65 70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt 353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
75 80 85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat 401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
90 95 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg 449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
105 110 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg 497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
120 125 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt 545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135 140 145 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt 593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
155 160 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac 641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
170 175 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa 689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
185 190 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg 737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
200 205 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg 785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215 220 225 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca 833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
235 240 245

```
tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat attctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                 3627

<210> 19
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1               5                  10                  15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
            20                  25                  30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
        35                  40                  45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
    50                  55                  60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65                  70                  75                  80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
```

```
                85                  90                  95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100                 105                 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115                 120                 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130                 135                 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145                 150                 155                 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165                 170                 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180                 185                 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195                 200                 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210                 215                 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245                 250                 255
Asn Ile
```

<210> 20
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 20

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac    113
                                      Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                       1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
           10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
       25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
   40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                 60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
               75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
           90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
       105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
```

```
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaaatatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
```

caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 21
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
245 250 255
Asn Ile

<210> 22
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 22
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac 113
Met Glu Ser Arg Lys Asp
1 5

```
atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
```

ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaatgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 23
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 23
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160

Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
245 250 255
Asn Ile

<210> 24
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 24
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac 113
Met Glu Ser Arg Lys Asp
1 5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta 161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
10 15 20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta 209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
25 30 35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa 257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
40 45 50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag 305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55 60 65 70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt 353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
75 80 85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat 401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
90 95 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg 449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
105 110 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg 497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
120 125 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt 545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135 140 145 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt 593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu

```
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tatgatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
```

ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 25
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
245 250 255
Asn Ile

<210> 26
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 26
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac 113
Met Glu Ser Arg Lys Asp
1 5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta 161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
10 15 20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta 209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
25 30 35

```
aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
     40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
 55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                 75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
             90                  95                 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt attttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
```

```
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagggat 2862
cctgctataa gtaagactca gtcccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                 3627
```

<210> 27
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 27

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

```
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245                 250                 255
Asn Ile
```

<210> 28
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 28

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac    113
                                       Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                        1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195
```

```
cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt attttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgataagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaatttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa ctttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                 3627
```

<210> 29
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

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

<210> 30
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 30

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac     113
                                        Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                         1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta    161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta    209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa    257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag    305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt    353
```

```
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                 75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                 100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
```

caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttcatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 31
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 31
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1   5   10   15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
            20   25   30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
        35   40   45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
    50   55   60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65   70   75   80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
                85   90   95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100   105   110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115   120   125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130   135   140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145   150   155   160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165   170   175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180   185   190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195   200   205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210   215   220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225   230   235   240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245   250   255
Asn Ile

<210> 32
<211> 3627

<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 32
```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tatttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac      113
                                      Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                       1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta   161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta   209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa   257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag   305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt   353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat   401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg   449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat gcc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230
```

```
gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagtagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaacaga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttcccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa                 3627
```

<210> 33
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

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

```
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65                  70                  75                  80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
                85                  90                  95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100                 105                 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115                 120                 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130                 135                 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145                 150                 155                 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165                 170                 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180                 185                 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195                 200                 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210                 215                 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245                 250                 255
Asn Ile
```

<210> 34
<211> 3627
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (96)...(872)

<400> 34

```
ggggcccgca cctctgggca gcagcggcag ccgagactca cggtcaagct aaggcgaaga 60
gtgggtggct gaagccatac tattttatag aatta atg gaa agc aga aaa gac     113
                                        Met Glu Ser Arg Lys Asp
                                         1               5

atc aca aac caa gaa gaa ctt tgg aaa atg aag cct agg aga aat tta    161
Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg Arg Asn Leu
            10                  15                  20

gaa gaa gac gat tat ttg cat aag gac acg gga gag acc agc atg cta    209
Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr Gly Glu Thr Ser Met Leu
        25                  30                  35

aaa aga cct gtg ctt ttg cat ttg cac caa aca gcc cat gct gat gaa    257
Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala Asp Glu
    40                  45                  50

ttt gac tgc cct tca gaa ctt cag cac aca cag gaa ctc ttt cca cag    305
Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr Gln Glu Leu Phe Pro Gln
55                  60                  65                  70

tgg cac ttg cca att aaa ata gct gct att ata gca tct ctg act ttt    353
Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala Ser Leu Thr Phe
                75                  80                  85

ctt tac act ctt ctg agg gaa gta att cac ccc tta gca act tcc cat    401
Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu Ala Thr Ser His
            90                  95                  100

caa caa tat ttt tat aaa att cca atc ctg gtc atc aac aaa gtc ttg    449
Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile Asn Lys Val Leu
```

```
        105                 110                 115

cca atg gtt tcc atc act ctc ttg gca ttg gtt tac ctg cca ggt gtg   497
Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr Leu Pro Gly Val
    120                 125                 130

ata gca gca att gtc caa ctt cat aat gga acc aag tat aag aag ttt   545
Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys Tyr Lys Lys Phe
135                 140                 145                 150

cca cat tgg ttg gat aag tgg atg tta aca aga aag cag ttt ggg ctt   593
Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu
                155                 160                 165

ctc agt ttc ttt ttt gct gta ctg cat gca att tat agt ctg tct tac   641
Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr
            170                 175                 180

cca atg agg cga tcc tac aga tac aag ttg cta aac tgg gca tat caa   689
Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn Trp Ala Tyr Gln
        185                 190                 195

cag gtc caa caa aat aaa gaa gat ggc tgg att gag cat gat gtt tgg   737
Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu His Asp Val Trp
    200                 205                 210

aga atg gag att tat gtg tct ctg gga att gtg gga ttg gca ata ctg   785
Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly Leu Ala Ile Leu
215                 220                 225                 230

gct ctg ttg gct gtg aca tct att cca tct gtg agt gac tct ttg aca   833
Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser Asp Ser Leu Thr
                235                 240                 245

tgg aga gaa ttt cac tat att cag gta aat aat ata taa aataacccta    882
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile  *
            250                 255

agaggtaaat cttctttttg tgtttatgat atagaatatg ttgactttac cccataaaaa 942
ataacaaatg tttttcaaca gcaaagatct tatacttgtt ccaattaata atgtgctctc 1002
ctgttgtttt ccctattgct tctaattagg acaagtgttt cctagacata aataaaaggc 1062
attaaaatat tctttgtttt ttttttttg tttgtttgtt ttttgtttgt ttgtttgttt 1122
ttttgagatg aagtctcgct ctgttgccca tgctggagta cagtggcacg atctcggctc 1182
actgcaacct gcgcctcctg ggttcaggcg attctcttgc ctcagcctcc tgagtagctg 1242
ggattacagg cacccatcac catgtccagc taatttttgt atttttagta gagacagggt 1302
tttcccatgt tggccaggct ggtctcgatc tcctgacctc aaatgatccg cccacctcgg 1362
cctcccaaag tgctgggatg acagttgtga gccaccacac tcagcctgct ctttctaata 1422
tttgaaactt gttagacaat ttgctaccca tctaatgtga tattttagga atccaatatg 1482
catggtttat tatttcttaa aaaaaatatt cttttacctg tcacctgaat ttagtaatgc 1542
cttttatgtt acacaactta gcactttcca gaaacaaaaa ctctctcctt gaaataatag 1602
agtttttatc taccaaagat atgctagtgt ctcatttcaa aggctgcttt ttccagctta 1662
cattttatat acttactcac ttgaagtttc taaatattct tgtaatttta aaactatctc 1722
agatttactg aggtttatct tctggtggta gattatccat aagaagagtg atgtgccaga 1782
atcactctgg gatccttgtc tgacaagatt caaaggacta aatttaattc agtcatgaac 1842
actgccaatt accgtttatg ggtagacatc tttggaaatt tccacaaggt cagacattcg 1902
caactatccc ttctacatgt ccacacgtat actccaacac tttattaggc atctgattag 1962
tttggaaagt atgcctccat ctgaattagt ccagtgtggc ttagagttgg tacaacattc 2022
tcacagaatt tcctaatttt gtaggttcag cctgataacc actggagttc tttggtcctc 2082
attaaatagc tttcttcaca cattgctctg cctgttacac atatgatgaa cactgctttt 2142
tagacttcat taggaattta ggactgcatc ttgacaactg agcctattct actatatgta 2202
caatacctag cccataatag gtatacaata cacatttggt aaaactaatt ttcaaccaat 2262
gacatgtatt tttcaactag taacctagaa atgtttcact taaaatctga gaactggtta 2322
cactacaagt taccttggag attcatatat gaaaacgcaa acttagctat ttgattgtat 2382
tcactgggac ttaagaatgc gcctgaataa ttgtgagttc gatttgttct ggcaggctaa 2442
tgaccatttc cagtaaagtg aatagaggtc agaagtcgta taaaagaggt gttgtcagaa 2502
caccgttgag attacatagg tgaacaacta tttttaagca actttatttg tgtagtgaca 2562
aagcatccca atgcaggctg aaatgtttca tcacatctct ggatctctct attttgtgca 2622
gacattgaaa aaattgttca tattatttcc atgttatcag aatatttgat tttttaaaaa 2682
cataggccaa gttcattcac ttcattattc atttatcaaa atcagagtga atcacattag 2742
```

tcgccttcac aactgataaa gatcactgaa gtcaaattga tttttgctat aatcttcaat 2802
ctacctatat ttaattgaga atctaaaatg tacaaatcat tgtgttgatt ctgcagtgat 2862
cctgctataa gtaagactca gtccctgatt ttaggtatcc tgtgaaaagc agaattaaga 2922
caaatacaca agagacaaag cacaaaaaat aaatatcata aggggatgaa caaaatggtg 2982
gagaaagagt agacaaagtt tttgatcacc tgccttcaaa gaaaggctgt gaattttgtt 3042
cacttagaca gcttggagac aagaaattac ccaaaagtaa ggtgaggagg ataggcaaaa 3102
agagcagaaa gatgtgaatg gacattgttg agaaatgtga taggaaaaca atcatagata 3162
aaggatttcc aagcaactga gcatatccag atgaggtagg atgggataaa ctcttattga 3222
accaatcttc accaattttg tttttctttt gcagagcaag ctaggaattg tttccccttct 3282
actgggcaca atacacgcat tgatttttgc ctggaataag tggatagata taaaacaatt 3342
tgtatggtat acacctccaa cttttatgat agctgttttc cttccaattg ttgtcctgat 3402
atttaaaagc atactattcc tgccatgctt gaggaagaag atactgaaga ttagacatgg 3462
ttgggaagac gtcaccaaaa ttaacaaaac tgagatatgt tcccagttgt agaattactg 3522
tttacacaca tttttgttca atattgatat attttatcac caacatttca agtttgtatt 3582
tgttaataaa atgattattc aaggaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3627

<210> 35
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 35
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
245 250 255
Asn Ile

<210> 36
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 36
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln

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

<210> 37
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37

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

```
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180                 185                 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195                 200                 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210                 215                 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
                245                 250                 255
Asn Ile
```

<210> 38
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38

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

<210> 39
<211> 258
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

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

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

<210> 40
<211> 270
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

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

His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile
260 265 270

400

<210> 41
<211> 270
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41
Gln Leu Phe Pro Met Trp Arg Phe Pro Phe Tyr Leu Ser Ser Val Leu
1 5 10 15
Cys Ile Phe Phe Phe Val Tyr Cys Ala Ile Arg Glu Val Ile Tyr Pro
20 25 30
Tyr Val Asn Gly Lys Thr Asp Ala Thr Tyr Arg Leu Ala Ile Ser Ile
35 40 45
Pro Asn Arg Val Phe Pro Ile Thr Ala Leu Ile Leu Leu Ala Leu Val
50 55 60
Tyr Leu Pro Gly Ile Leu Ala Ala Ile Leu Gln Leu Tyr Arg Gly Thr
65 70 75 80
Lys Tyr Arg Arg Phe Pro Asn Trp Leu Asp His Trp Met Leu Cys Arg
85 90 95
Lys Gln Leu Gly Leu Val Ala Leu Gly Phe Ala Phe Leu His Val Ile
100 105 110
Tyr Thr Leu Val Ile Pro Ile Arg Tyr Tyr Val Arg Trp Arg Leu Arg
115 120 125
Asn Ala Thr Ile Thr Gln Ala Leu Thr Asn Lys Asp Ser Pro Phe Ile
130 135 140
Thr Ser Tyr Ala Trp Ile Asn Asp Ser Tyr Leu Ala Leu Gly Ile Leu
145 150 155 160
Gly Phe Phe Leu Phe Leu Leu Leu Gly Ile Thr Ser Leu Pro Ser Val
165 170 175
Ser Asn Met Val Asn Trp Arg Glu Phe Arg Phe Val Gln Ser Lys Leu
180 185 190
Gly Tyr Leu Thr Leu Val Leu Cys Thr Ala His Thr Leu Val Tyr Gly
195 200 205
Gly Lys Arg Phe Leu Ser Pro Ser Ile Leu Arg Trp Ser Leu Pro Ser
210 215 220
Ala Tyr Ile Leu Ala Leu Ile Ile Pro Cys Ala Val Leu Val Leu Lys
225 230 235 240
Cys Ile Leu Ile Met Pro Cys Ile Asp Lys Thr Leu Thr Arg Ile Arg
245 250 255
Gln Gly Trp Glu Arg Asn Ser Lys Tyr Thr Gln Ser Ala Leu
260 265 270

<210> 42
<211> 259
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile Ile Ala
1 5 10 15
Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His Pro Leu
20 25 30
Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu Val Ile
35 40 45
Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu Val Tyr
50 55 60
Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly Thr Lys
65 70 75 80
Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys
85 90 95
Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr
100 105 110
Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu Leu Asn
115 120 125
Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp Ile Glu

```
    130                 135                 140
His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile Val Gly
145                 150                 155                 160
Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser Val Ser
                165                 170                 175
Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys Leu Gly
            180                 185                 190
Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe Ala Trp
        195                 200                 205
Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro Pro Thr
    210                 215                 220
Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe Lys Ser
225                 230                 235                 240
Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile Arg His
                245                 250                 255
Gly Trp Glu
```

<210> 43
<211> 259
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

<210> 44
<211> 303
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

```
Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln Thr Ala His Ala
 1               5                  10                  15
```

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

<210> 45
<211> 303
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

```
        195                 200                 205
Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys Leu Gly Ile Val
    210                 215                 220
Ser Leu Leu Leu Gly Thr Val His Ala Leu Val Phe Ala Trp Asn Lys
225                 230                 235                 240
Trp Val Asp Val Ser Gln Phe Val Trp Tyr Met Pro Pro Thr Phe Met
                245                 250                 255
Ile Ala Val Phe Leu Pro Thr Leu Val Leu Ile Cys Lys Ile Ala Leu
            260                 265                 270
Cys Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile Arg Cys Gly Trp
        275                 280                 285
Glu Asp Val Ser Lys Ile Asn Arg Thr Glu Met Ala Ser Arg Leu
    290                 295                 300
```

<210> 46
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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

<210> 47
<211> 258

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
180 185 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
195 200 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
210 215 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225 230 235 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
245 250 255
Asn Ile

<210> 48
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
1 5 10 15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
35 40 45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
50 55 60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65 70 75 80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
85 90 95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
100 105 110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
115 120 125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
130 135 140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145 150 155 160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
165 170 175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu

```
            180                 185                 190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195                 200                 205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210                 215                 220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225                 230                 235                 240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ile Ile
                245                 250                 255
His Lys Lys Ser Asp Val Pro Glu Ser Leu Trp Asp Pro Cys Leu Thr
            260                 265                 270
Arg Phe Lys Gly Leu Asn Leu Ile Gln Ser
        275                 280
```

<210> 49
<211> 339
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(339)

<400> 49

```
gtc aag ctg cag gag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag aca   48
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
 1               5                  10                  15

gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca aac tat gga   96
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
            20                  25                  30

atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg ggc   144
Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
        35                  40                  45

tgg ata aac acc tac act gga gag cca aca tat gct gat gac ttc aag   192
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
    50                  55                  60

gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc tat ttg   240
Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
65                  70                  75                  80

cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt gca   288
Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
                85                  90                  95

aga ccc tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc   336
Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
            100                 105                 110

tca                                                              339
Ser
```

<210> 50
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

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

```
        35                  40                  45
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
                85                  90                  95
Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
            100                 105                 110
Ser
```

<210> 51
<211> 435
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(435)

<400> 51

```
gga ctg ttc gaa gcc gcc acc atg aag ttg cct gtt agg ctg ttg gtg   48
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val
 1               5                  10                  15

ctc tgg att cgg gaa acc aac ggt gat gtt gtg atg acc cag act cca   96
Leu Trp Ile Arg Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro
            20                  25                  30

ctc act ttg tcg gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag   144
Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys
        35                  40                  45

tca agt cag agc ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg   192
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp
    50                  55                  60

ttg tta cag agg cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg   240
Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val
65                  70                  75                  80

tct aaa ctg gac tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca   288
Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser
                85                  90                  95

ggg aca gat ttc aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg   336
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
            100                 105                 110

gga gtt tat tat tgc tgg caa ggt aca cat ttt cca ttc acg ttc ggc   384
Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly
        115                 120                 125

tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgt acg gat gct gca cca act gta   432
Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val
    130                 135                 140

tcc                                                             435
Ser
145
```

<210> 52
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val
 1   5   10   15
Leu Trp Ile Arg Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro
            20   25   30
Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys
        35   40   45
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp
    50   55   60
Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val
65   70   75   80
Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser
                85   90   95
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
            100   105   110
Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly
        115   120   125
Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val
    130   135   140
Ser
145

<210> 53
<211> 378
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(378)

<400> 53
gga ctg ttc gaa gcc gcc acc atg gaa gcc cca gct cag ctc act ttg 48
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Thr Leu
 1   5   10   15

tcg gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag 96
Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
            20   25   30

agc ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag 144
Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln
        35   40   45

agg cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg 192
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu
    50   55   60

gac tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat 240
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65   70   75   80

ttc aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat 288
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
                85   90   95

tat tgc tgg caa ggt aca cat ttt cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca 336
Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            100   105   110

aag ttg gaa ata aaa cgt acg gat gct gca cca act gta tcc   378
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
        115   120   125

<210> 54
<211> 126

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Thr Leu
 1               5                  10                  15
Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
            20                  25                  30
Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln
        35                  40                  45
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu
    50                  55                  60
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65                  70                  75                  80
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            100                 105                 110
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
        115                 120                 125
```

<210> 55
<211> 438
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(438)

<400> 55

```
atg ggc ttc aag atg gag tca cag gcc cag gtt ctt atg tta ctg ctg   48
Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu
 1               5                  10                  15

cta tgg gta tct ggt acc tgt ggg gac att gtg atg tca cag tct cca   96
Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro
            20                  25                  30

tcc tcc cta gct gtg tca gtt gga gag aag gtt acc atg agc tgc aag   144
Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
        35                  40                  45

tcc agt cag agc ctt tta tat agg agc aat caa aag aac tac ttg gcc   192
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
    50                  55                  60

tgg tac cag cag aaa cca ggg cag tct cct aaa ctg ctg att tat tgg   240
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
65                  70                  75                  80

gcc tcc act agg gaa tct ggg gtc cct gat cgc ttc aca ggc agt gga   288
Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
                85                  90                  95

tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc agc agt gtg aag gct gaa gac   336
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp
            100                 105                 110

ctg gca gtt tat tac tgt cag caa tat tat aac tat cct cgg acg ttc   384
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe
        115                 120                 125

ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa cgt acg gat gct gca cca act   432
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr
    130                 135                 140

gta tcc                                                          438
```

Val Ser
145

<210> 56
<211> 146
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 56
Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu
 1   5   10   15
Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro
            20   25   30
Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
        35   40   45
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
    50   55   60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
65   70   75   80
Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
                85   90   95
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp
            100   105   110
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe
        115   120   125
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr
    130   135   140
Val Ser
145

<210> 57
<211> 113
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 57
Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu Thr
 1   5   10   15
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Gly
            20   25   30
Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly
        35   40   45
Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
    50   55   60
Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu
65   70   75   80
Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
                85   90   95
Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser
            100   105   110
Ser

<210> 58
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val
 1   5   10   15
Leu Trp Ile Arg Glu Thr Asn Gly Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro
            20   25   30
Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys
        35   40   45
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp

```
    50                  55                  60
Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val
65                  70                  75                  80
Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser
                85                  90                  95
Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu
            100                 105                 110
Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly
        115                 120                 125
Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val
    130                 135                 140
Ser
145
```

<210> 59
<211> 378
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)...(378)

<400> 59

```
gga ctg ttc gaa gcc gcc acc atg gaa gcc cca gct cag ctc act ttg   48
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Thr Leu
 1               5                  10                  15

tcg gtt acc att gga caa cca gcc tcc atc tct tgc aag tca agt cag   96
Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
            20                  25                  30

agc ctc tta gat agt gat gga aag aca tat ttg aat tgg ttg tta cag   144
Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln
        35                  40                  45

agg cca ggc cag tct cca aag cgc cta atc tat ctg gtg tct aaa ctg   192
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu
    50                  55                  60

gac tct gga gtc cct gac agg ttc act ggc agt gga tca ggg aca gat   240
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65                  70                  75                  80

ttc aca ctg aaa atc agc aga gtg gag gct gag gat ttg gga gtt tat   288
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
                85                  90                  95

tat tgc tgg caa ggt aca cat ttt cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca   336
Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            100                 105                 110

aag ttg gaa ata aaa cgt acg gat gct gca cca act gta tcc            378
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
        115                 120                 125
```

<210> 60
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Thr Leu
 1               5                  10                  15
Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
            20                  25                  30
```

```
Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln
        35                  40                  45
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu
    50                  55                  60
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65                  70                  75                  80
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            100                 105                 110
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
        115                 120                 125
```

<210> 61
<211> 145
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

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

<210> 62
<211> 126
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

```
Gly Leu Phe Glu Ala Ala Thr Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Thr Leu
 1               5                  10                  15
Ser Val Thr Ile Gly Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln
            20                  25                  30
Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln
        35                  40                  45
Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu
    50                  55                  60
Asp Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65                  70                  75                  80
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr
                85                  90                  95
Tyr Cys Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr
            100                 105                 110
Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser
        115                 120                 125
```

<210> 63
<211> 146
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63
Met Gly Phe Lys Met Glu Ser Gln Ala Gln Val Leu Met Leu Leu Leu
 1   5   10   15
Leu Trp Val Ser Gly Thr Cys Gly Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro
            20   25   30
Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys
        35   40   45
Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Arg Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala
    50   55   60
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp
65   70   75   80
Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly
                85   90   95
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp
            100   105   110
Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Arg Thr Phe
        115   120   125
Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Asp Ala Ala Pro Thr
    130   135   140
Val Ser
145

<210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> Tetanus toxoid

<400> 64
Gln Tyr Ile Lys Ala Asn Ser Lys Phe Ile Gly Ile Thr Glu
 1   5   10

<210> 65
<211> 21
<212> PRT
<213> plasmodium falciparum

<400> 65
Asp Ile Glu Lys Lys Ile Ala Lys Met Glu Lys Ala Ser Ser Val Phe
 1   5   10   15
Asn Val Val Asn Ser
            20

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> Streptococcus

<400> 66
Gly Ala Val Asp Ser Ile Leu Gly Gly Val Ala Thr Tyr Gly Ala Ala
 1   5   10   15

<210> 67
<211> 13
<212> PRT
<213>Secuencia Artificial

<220>
<221> VARIANTE
<222> 3
<223> Xaa = ciclohehilalanina, fenilanina,tirosina

<221> VARIANTE
<222> 1, 13

<223> Xaa = D-alanina o L-alanina

<223> Epitopo de enlace pan-DR

<400> 67
Xaa Lys Xaa Val Ala Ala Trp Thr Leu Lys Ala Ala Xaa
1 5 10

<210> 68
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 68
ttttgatcaa gctt 14

<210> 69
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 69
ctaatacgac tcactatagg gctcgagcgg ccgcccgggc ag 42

<210> 70
<211> 12
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 70
gatcctgccc gg 12

<210> 71
<211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 71
gtaatacgac tcactatagg gcagcgtggt cgcggccgag 40

<210> 72
<211> 10
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 72
gatcctcggc 10

<210> 73
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Prantilla

<400> 73
ctaatacgac tcactatagg gc 22

<210> 74
<211> 22
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 74
tcgagcggcc gcccgggcag ga 22

<210> 75
<211> 20
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 75
agcgtggtcg cggccgagga 20

<210> 76
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 76
atatcgccgc gctcgtcgtc gacaa 25

<210> 77
<211> 26
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 77
agccacacgc agctcattgt agaagg 26

<210> 78
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 78
actttgttga tgaccaggat tgga 24

<210> 79
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Plantilla

<400> 79
cagaacttca gcacacacag gaac 24

<210> 80
<211> 24
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Etiqueta Bandera

<400> 80
gattacaagg atgacgacga taag 24

<210> 81
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 81
aagctcattc tagcgggaaa t 21

<210> 82
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 82
aagggacgaa gacgaacacu uctt 24

<210> 83
<211> 23
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 83
aactgaagac ctgaagacaa taa 23

<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 84
Asn Gly Thr Lys
1

<210> 85
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 85
Asn Lys Thr Glu
1

<210> 86
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 86
Ser Arg Lys Asp
1

<210> 87

<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 87
Thr Asn Gln Glu
 1

<210> 88
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 88
Ser Val Ser Asp
 1

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 89
Thr Trp Arg Glu
 1

<210> 90
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 90
Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr
 1   5

<210> 91
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 91
Gly Val Ile Ala Ala Ile
 1   5

<210> 92
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 92
Gly Thr Ile His Ala Leu
 1   5

<210> 93
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 93
Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met Lys Pro Arg
 1   5   10   15
Arg

<210> 94
<211> 339
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 94
Met Glu Ser Arg Lys Asp Ile Thr Asn Gln Glu Glu Leu Trp Lys Met
 1   5   10   15
Lys Pro Arg Arg Asn Leu Glu Glu Asp Asp Tyr Leu His Lys Asp Thr
            20   25   30
Gly Glu Thr Ser Met Leu Lys Arg Pro Val Leu Leu His Leu His Gln
        35   40   45
Thr Ala His Ala Asp Glu Phe Asp Cys Pro Ser Glu Leu Gln His Thr
    50   55   60
Gln Glu Leu Phe Pro Gln Trp His Leu Pro Ile Lys Ile Ala Ala Ile
65   70   75   80
Ile Ala Ser Leu Thr Phe Leu Tyr Thr Leu Leu Arg Glu Val Ile His
                85   90   95
Pro Leu Ala Thr Ser His Gln Gln Tyr Phe Tyr Lys Ile Pro Ile Leu
            100   105   110
Val Ile Asn Lys Val Leu Pro Met Val Ser Ile Thr Leu Leu Ala Leu
        115   120   125
Val Tyr Leu Pro Gly Val Ile Ala Ala Ile Val Gln Leu His Asn Gly
    130   135   140
Thr Lys Tyr Lys Lys Phe Pro His Trp Leu Asp Lys Trp Met Leu Thr
145   150   155   160
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Phe Phe Phe Ala Val Leu His Ala
                165   170   175
Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro Met Arg Arg Ser Tyr Arg Tyr Lys Leu
            180   185   190
Leu Asn Trp Ala Tyr Gln Gln Val Gln Gln Asn Lys Glu Asp Ala Trp
        195   200   205
Ile Glu His Asp Val Trp Arg Met Glu Ile Tyr Val Ser Leu Gly Ile
    210   215   220
Val Gly Leu Ala Ile Leu Ala Leu Leu Ala Val Thr Ser Ile Pro Ser
225   230   235   240
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ser Lys
                245   250   255
Leu Gly Ile Val Ser Leu Leu Leu Gly Thr Ile His Ala Leu Ile Phe
            260   265   270
Ala Trp Asn Lys Trp Ile Asp Ile Lys Gln Phe Val Trp Tyr Thr Pro
        275   280   285
Pro Thr Phe Met Ile Ala Val Phe Leu Pro Ile Val Val Leu Ile Phe
    290   295   300
Lys Ser Ile Leu Phe Leu Pro Cys Leu Arg Lys Lys Ile Leu Lys Ile
305   310   315   320
Arg His Gly Trp Glu Asp Val Thr Lys Ile Asn Lys Thr Glu Ile Cys
                325   330   335
Ser Gln Leu

<210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 95
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile
 1   5   10

<210> 96
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 96
Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn Asn Ile
 1   5   10

<210> 97
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 97
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Val Asn
 1   5   10   15
Asn Ile

<210> 98
<211> 36
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 98
Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ile Ile His Lys Lys Ser Asp Val
 1   5   10   15
Pro Glu Ser Leu Trp Asp Pro Cys Leu Thr Arg Phe Lys Gly Leu Asn
            20   25   30
Leu Ile Gln Ser
        35

<210> 99
<211> 37
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 99
Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ile Ile His Lys Lys Ser Asp
 1   5   10   15
Val Pro Glu Ser Leu Trp Asp Pro Cys Leu Thr Arg Phe Lys Gly Leu
            20   25   30
Asn Leu Ile Gln Ser
        35

<210> 100
<211> 42
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 100
Val Ser Asp Ser Leu Thr Trp Arg Glu Phe His Tyr Ile Gln Ile Ile
 1   5   10   15
His Lys Lys Ser Asp Val Pro Glu Ser Leu Trp Asp Pro Cys Leu Thr
            20   25   30
Arg Phe Lys Gly Leu Asn Leu Ile Gln Ser
        35   40

<210> 101
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 101
Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Leu Phe Phe Ala Val Leu His Ala
 1   5   10   15
Ile

<210> 102
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 102
Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Leu Phe Phe Ala Val Leu His
 1   5   10   15
Ala Ile Tyr

<210> 103
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 103
Asp Lys Trp Met Leu Thr Arg Lys Gln Phe Gly Leu Leu Ser Leu Phe
 1   5   10   15
Phe Ala Val Leu His Ala Ile Tyr Ser Leu Ser Tyr Pro
            20   25

422

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-117696- -00000-0000
Fec: 2006-11-21 16:14:46 Dep: 2020 NUEVA
Tra: 11 PATENTES II
Eve: 378 FASENACIONALI
Act: 411 PRESENTACION
Folios: 421
Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

420

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X] 1
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X] 1
- Descripción de la invención [X] 23
- Dibujos de ser estos pertinentes [X] 2-18
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X] 2

COMPLETA [X] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Firma Responsable

Fecha 21 De Nov 2006

Conmutador: 3 82 08 40

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

A23.

421

REPUBLICA DE COLOMBIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

REFERENCIA	Radicación No.	6 117696
	Solicitud internacional	PCT/US2004/012625
	Fecha inicio fase nacional	22/11/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	1713

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 22 DIC. 2006
aalvarado