



República Federativa do Brasil  
Ministério do Desenvolvimento, Indústria  
e do Comércio Exterior  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0610975-6 A2**

(22) Data de Depósito: 26/04/2006  
(43) Data da Publicação: 03/08/2010  
(RPI 2065)



**(51) Int.Cl.:**  
C07K 16/18  
C12N 5/20  
G01N 33/574  
G01N 33/68  
G01N 33/577  
C07K 14/47  
C07K 16/40

(54) Título: **ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS PARA SEU USO NA DETECÇÃO DE DOENÇA CERVICAL**

(30) Prioridade Unionista: 27/04/2005 US 60/675.305, 16/09/2005 US 60/718.082, 16/09/2005 US 60/718.082, 27/04/2005 US 60/675.305

(73) Titular(es): Tripath Imaging, Inc.

(72) Inventor(es): Adriann J. Taylor, Douglas P. Malinowski, Timothy J. Fischer

(74) Procurador(es): Orlando de Souza

(86) Pedido Internacional: PCT US2006015706 de 26/04/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2006/116442 de 02/11/2006

(57) Resumo: São fornecidos métodos e composições para o diagnóstico de doença cervical de alto grau em uma amostra de paciente. As composições incluem novos anticorpos monoclonais e variantes e fragmentos desses, que se ligam especificamente a MCM2. Anticorpos monoclonais que têm as características de ligação de um anticorpo de MCM2 da invenção também são fornecidos. São também aqui reveladas linhas de células de hibridoma que produzem um anticorpo monoclonal de MCM2 da invenção. As composições têm uso na prática dos métodos para diagnóstico de doença cervical de alto grau que compreendem a detecção de superexpressão de MCM2 em uma amostra cervical de um paciente. Kits para a prática dos métodos da invenção são também fornecidos. Os polipeptídeos que compreendem a sequência de aminoácidos para um epítipo de MCM2 e métodos de uso desses polipeptídeos na produção de anticorpos também são englobados pela presente invenção.

Pet 020070183376  
Pi 0610975-6

1/56

**ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS PARA SEU USO NA DETECÇÃO  
DE DOENÇA CERVICAL**

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção relaciona-se a anticorpos capazes de se  
5 ligar a MCM2 e métodos de uso desses anticorpos,  
particularmente no diagnóstico de doença cervical.

FUNDAMENTO DA INVENÇÃO

O carcinoma cervical uterino é a segunda neoplasia  
mais comum em mulheres, respondendo por aproximadamente 12%  
10 de todos os cânceres femininos e causando aproximadamente  
250.000 mortes por ano. Baldwin e cols. (2003) *Nature  
Reviews Cancer* 3: 1-10. Em vários países em desenvolvimento  
em que os programas de rastreamento em massa não são  
disponíveis, o problema clínico é mais sério. O câncer  
15 cervical nesses países é a causa número um de mortes por  
câncer em mulheres.

A maioria dos casos de câncer cervical representa  
carcinoma escamoso celular, embora adenocarcinoma também  
seja visto. O câncer cervical pode ser evitado por exame da  
20 população, uma vez que ele se desenvolve através de  
estágios intraepiteliais não invasivos, bem definidos, que  
podem ser morfológicamente distintos. Williams e cols.  
(1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 14.932-14.937. Embora  
não se entenda como as células normais se tornam  
25 transformadas, o conceito de um espectro contínuo de  
mudança histopatológica de epitélio normal, estratificado  
através de neoplasia intraepitelial cervical (CIN) para  
câncer invasivo, tem sido aceito por anos. O precursor para  
o câncer cervical é a displasia, também conhecida na  
30 técnica como CIN ou lesões intraepiteliais escamosas (SIL).

As anormalidades intraepiteliais escamosas podem ser classificadas pelo uso do sistema de três fileiras (CIN) ou de duas fileiras (Bethesda). Sob o sistema de Bethesda, lesões intraepiteliais escamosas (LSIL) de baixo grau, que correspondem a infecção por CINI e HPV, geralmente representam infecção de HPV produtiva com um risco relativamente baixo de progressão para doença invasiva. Lesões intraepiteliais escamosas (HSIL) de alto grau, que correspondem a CINII e CINIII no sistema de três fileiras, mostram um maior risco de progressão para câncer cervical que LSIL, embora tanto LSIL quanto HSIL sejam vistas como precursores potenciais de malignidade. Amostras do paciente também podem ser classificadas como ASCUS (células escamosas atípicas de significância desconhecida) ou AGUS (células glandulares atípicas de significância desconhecida) sob esse sistema.

Foi estabelecida uma forte associação de câncer cervical e infecção por tipos de alto risco de vírus do papiloma humano (HPV), como tipos 16, 18 e 31. De fato, um grande corpo de evidência epidemiológica e biológica molecular estabeleceu a infecção por HPV como um fator causador no câncer cervical. Além disso, HPV é encontrado em 85% ou mais dos casos de doença cervical de alto grau. No entanto, infecção por HPV é muito comum, ocorrendo possivelmente em 5-15% das mulheres com idade de 30, mas poucas mulheres HPV-positivas desenvolverão doença cervical de alto grau ou câncer. A presença de HPV isoladamente é indicativa apenas de infecção, não de doença cervical de alto grau, e, portanto, o teste para infecção por HPV isoladamente resulta em vários falso positivos. Veja, por

exemplo, Wright e cols. (2004) *Obstet. Gynecol.* 103: 304-309.

A literatura atual sugere que o HPV infecta as células-tronco basais no tecido subjacente da cérvix uterina. A diferenciação das células-tronco em queratinócitos maduros, com a resultante migração das células para o epitélio cervical estratificado, está associada à replicação viral de HPV e à re-infecção das células. Durante esse processo de replicação viral, ocorrem inúmeras mudanças celulares que incluem desregulação do ciclo celular, proliferação ativa, replicação de DNA, ativação transcricional e instabilidade genômica (Crum (2000) *Modern Pathology* 13: 243-251; Middleton e cols. (2003) *J. Virol.* 77: 10.186-10.201; Pett e cols. (2004) *Cancer Res.* 64: 1.359-1.368).

A maioria das infecções por HPV é transitória em natureza, com a infecção viral solucionando por si mesma em um período de 12 meses. Para aqueles indivíduos que desenvolvem infecções persistentes com um ou mais subtipos oncogênicos de HPV, há um risco para o desenvolvimento de neoplasia em comparação com pacientes sem uma infecção por HPV. Dada a importância do HPV no desenvolvimento de neoplasia cervical, a detecção clínica de HPV tem se tornado uma ferramenta diagnóstica importante na identificação de pacientes em risco de desenvolver neoplasia cervical. A utilidade clínica de rastreamento baseado em HPV para doença cervical está em seu valor preditivo negativo. Um resultado negativo para HPV em combinação com uma história de Papanicolau normal é um excelente indicador de uma condição livre de doença e de um

baixo risco de desenvolvimento de neoplasia cervical durante os 1-3 anos subsequentes. No entanto, um resultado positivo para HPV não é diagnóstico de doença cervical; ao contrário, é uma indicação de infecção. Embora a maioria das infecções por HPV seja transitória e suma espontaneamente em um período de 12 meses, uma infecção persistente com um subtipo viral de HPV de alto risco indica um alto risco para o desenvolvimento de neoplasia cervical. Para suplementar o teste de HPV, a identificação de marcadores moleculares associados a neoplasia cervical deve melhorar a especificidade clínica para o diagnóstico de doença cervical.

O exame citológico de esfregaços cervicais corados por Papanicolau atualmente é o método de escolha para a detecção de câncer cervical. O teste de Papanicolau é um método subjetivo que permaneceu substancialmente não modificado por 60 anos. No entanto, há várias preocupações em relação a seu desempenho. A sensibilidade relatada de um teste único de Papanicolau (a proporção de positivos para doença que é teste-positivo) é baixa e mostra ampla variação (30-87%). A especificidade de um único teste de Papanicolau (a proporção de negativos para doença que é teste-negativo) deve ser tão baixa quanto 86% em uma população examinada e consideravelmente mais baixa na população ASCUS PLUS para a determinação de doença de alto grau subjacente. Veja Baldwin e cols., supra. Uma percentagem significativa de Papanicolau caracterizada como LSIL ou CINI é realmente positiva para lesões de alto grau. Além disso, até 10% dos exames de Papanicolau são classificados como ASCUS (células escamosas atípicas de

significância indeterminada), ou seja, não é possível fazer uma categorização clara como lesão normal, moderada ou severa, ou tumor. No entanto, a experiência mostra que até 10% dessa população ASCUS tem lesões de alto grau, que são conseqüentemente desconsideradas. Veja, por exemplo, Manos e cols. (1999) *JAMA* 281: 1.605-1.610. Portanto, biomarcadores moleculares que sejam superexpressos seletivamente em doença cervical de alto grau e composições para a detecção desses biomarcadores são necessários para métodos práticos confiáveis para o diagnóstico de doença cervical de alto grau.

As proteínas de manutenção de minicromossomo (MCM) têm uma participação essencial na replicação de DNA eucariótico. As proteínas de manutenção de minicromossomo (MCM) funcionam nos estágios iniciais da replicação do DNA através da carga do complexo pré-replicação em DNA e funcionando como uma helicase para ajudar a desenrolar o DNA duplo durante a síntese de novo da fita de DNA duplicata. Cada um das proteínas MCM tem motivos de ATPase dependentes de DNA em seu domínio central altamente conservado. Os níveis de proteínas MCM geralmente aumentam de forma variável à medida que células normais progridem da fase G0 para a fase G1/S do ciclo celular. Na fase G0, proteínas MCM2 e MCM5 são bem menos abundantes do que as proteínas MCM7 e MCM3. MCM6 forma um complexo com MCM2, MCM4 e MCM7, que se liga à histona H3. Além disso, o subcomplexo de MCM4, MCM6 e MCM7 possui atividade de helicase, que é mediada pela atividade de ligação à ATP de MCM6 e pela atividade de ligação ao DNA de MCM4. Veja, por exemplo, Freeman e cols. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 2.121-

2.132; Lei e cols. (2001) *J. Cell Sci.* 114: 1.447-1.454; Ishimi e cols. (2003) *Eur. J. Biochem.* 270: 1.089-1.101, todos aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Publicações anteriores demonstraram que as proteínas MCM e, em particular, MCM-5, são úteis para a detecção de doença cervical (Williams e cols. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14.932-14.937), além de outros cânceres (Freeman e cols. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 2.121-2.132). A literatura publicada indica que anticorpos para MCM-5 são capazes de detectar células neoplásicas cervicais. A especificidade para detecção de doença cervical de alto grau não foi demonstrada para MCM-5 (Williams e cols. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14.932-14.937). A detecção da expressão de MCM-5 não se restringe à doença cervical de alto grau, mas também é detectada na displasia de baixo grau identificada e em células proliferativas que reingressam no ciclo celular após infecção com HPV de alto risco. Além de MCM-5, outros membros da família MCM, que inclui MCM-2 e MCM-7, demonstraram ser marcadores potencialmente úteis para a detecção de neoplasia cervical em amostras de tecido (Freeman e cols. (1999) *Clin. Cancer Res.* 5: 2.121-2.132; Brake e cols. (2003) *Cancer Res.* 63: 8.173-8.180). Resultados recentes demonstraram que MCM-7 parece ser um marcador específico para a detecção de doença cervical de alto grau com o uso de formatos de imunquímica (Brake e cols. (2003) *Cancer Res.* 63: 8.173-8.180; Malinowski e cols. (2004) *Acta Cytol.* 43: 696).

Portanto, há na técnica a necessidade de anticorpos que sejam capazes de detectar a expressão de um biomarcador que seja superexpresso seletivamente na doença cervical de

alto grau. Tais anticorpos poderiam ser usados nos métodos para a diferenciação entre doença de alto grau e condições que não são consideradas doença clínica, por exemplo, infecção por HPV em estágio inicial e displasia leve.

## 5 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

São fornecidos composições e métodos para o diagnóstico de doença cervical de alto grau. Composições incluem anticorpos monoclonais capazes de se ligar às proteínas biomarcadoras nucleares da invenção, particularmente proteínas MCM, mais particularmente MCM2. Fragmentos de ligação de antígeno e variantes desses anticorpos monoclonais, linhagens celulares de hibridomas capazes de produzir esses anticorpos e kits que compreendem os anticorpos monoclonais da invenção também são aqui englobados.

As composições da invenção são utilizadas em métodos para o diagnóstico de doença cervical de alto grau. Os métodos compreendem a detecção da superexpressão de pelo menos um biomarcador nuclear, em que a superexpressão do biomarcador nuclear é indicativa de doença cervical de alto grau. Especificamente, os métodos compreendem o uso dos anticorpos da invenção para detectar a superexpressão de MCM2 em uma amostra cervical.

As composições da invenção ainda incluem polipeptídeos isolados que compreendem um epítipo capaz de se ligar a um anticorpo monoclonal de MCM2. Esses polipeptídeos podem ser usados em métodos para a produção de anticorpos de MCM2. Também são fornecidas moléculas de ácido nucléico isolado que codificam seqüências de aminoácidos dos epítipos de MCM2.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

São fornecidos composições e métodos para o diagnóstico de doença cervical de alto grau. As composições incluem anticorpos monoclonais que são capazes de se ligar às proteínas biomarcadoras nucleares que são superexpressas seletivamente na doença cervical de alto grau, particularmente proteínas MCM, mais particularmente, MCM2. Também são reveladas linhagens celulares de hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais da presente invenção.

10 São ainda fornecidos kits que compreendem os anticorpos monoclonais aqui descritos. As presentes composições podem ser usadas em métodos para o diagnóstico de doença cervical de alto grau em um paciente.

As composições da invenção incluem anticorpos monoclonais que se ligam especificamente à MCM2, ou a uma variante ou um fragmento desta. Em particular, são fornecidos os anticorpos de MCM2 designados 27C5.6 e 26H6.19. As linhagens celulares de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais de MCM2 27C5.6 e 26H6.19 foram depositadas com um Depositário de Patente da "American Type Culture Collection" (ATCC), Manassas, Virginia, 20110-2209 em 14 de abril de 2005, e foram atribuídos os Depósitos de Patente N<sup>os</sup> PTA-6668 e PTA-6667, respectivamente. Esses depósitos serão mantidos sob os termos do Tratado de Budapeste sobre o Reconhecimento Internacional do Depósito de Microorganismos para as Finalidades de Procedimento de Patente. Esses depósitos foram feitos simplesmente como conveniência para aqueles habilitados na técnica e não constituem uma admissão de que seja necessário um depósito sob 35 U.S.C. § 112.

15  
20  
25  
30

Anticorpos que possuem as características de ligação dos anticorpos monoclonais 27C5.6 e 26H6.19 também são aqui revelados. Tais anticorpos incluem, sem limitação, anticorpos que competem em ensaios de ligação competitiva com esses anticorpos, além de anticorpos que se ligam a um epitopo capaz de se ligar ao anticorpo monoclonal 27C5.6 ou 26H6.19. Também são fornecidos variantes e fragmentos de anticorpos monoclonais 27C5.6 e 26H6.19 que retêm a capacidade de se ligar especificamente à MCM2. As composições ainda incluem linhagens celulares de hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais da presente invenção e kits que compreendem pelo menos um anticorpo monoclonal aqui revelado.

"Anticorpos" e "imunoglobulinas" (Igs) são glicoproteínas que possuem as mesmas características estruturais. Embora os anticorpos exibam especificidade de ligação para um antígeno, imunoglobulinas incluem tanto anticorpos quanto outras moléculas semelhantes a anticorpo desprovidas de especificidade de antígeno. Polipeptídeos desse último tipo são, por exemplo, produzidos em níveis baixos pelo sistema linfático e em níveis elevados por mielomas.

Os termos "anticorpo" e "anticorpos" englobam de forma ampla formas de ocorrência natural de anticorpos e anticorpos recombinantes, tais como anticorpos de cadeia única, anticorpos quiméricos e humanizados, e anticorpos multiespecíficos, além de fragmentos e derivados de todos os citados anteriormente, cujos fragmentos e derivados tenham pelo menos um sítio de ligação antigênica. Derivados de anticorpos podem compreender uma proteína ou uma porção

química conjugada ao anticorpo. O termo "anticorpo" é usado em seu sentido mais amplo e cobre anticorpos totalmente montados, fragmentos de anticorpo que podem se ligar a um antígeno (por exemplo, Fab', F'(ab)<sub>2</sub>, Fv, anticorpos de 5 cadeia única, diacorpos) e peptídeos recombinantes que compreendem os citados anteriormente. Como aqui usado, "anticorpo de MCM2" refere-se a qualquer anticorpo que se ligue especificamente a MCM2 (Id. de Seq. N°: 1), ou a um variante ou fragmento deste, e inclui anticorpos 10 monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos de cadeia única e fragmentos destes que retenham a função de ligação de antígeno do anticorpo parente.

Os anticorpos de MCM2 da invenção são otimamente anticorpos monoclonais. O termo "anticorpo monoclonal" como 15 aqui usado refere-se a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em quantidades 20 menores.

"Anticorpos nativos" e "imunoglobulinas nativas" são normalmente glicoproteínas heterotetraméricas de cerca de 150.000 dáltons, compostas de duas cadeias leves (L) idênticas e duas cadeias pesadas (H) idênticas. Cada cadeia 25 leve é ligada a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto covalente, enquanto o número de ligações dissulfeto varia entre as cadeias pesadas de isótipos de imunoglobulinas diferentes. Cada cadeia pesada e leve também possui pontes dissulfeto intracadeia regularmente 30 espaçadas. Cada cadeia pesada tem em uma extremidade um

domínio variável (VH), seguido por diversos domínios constantes. Cada cadeia leve tem um domínio variável em uma extremidade (V,) e um domínio constante na sua outra extremidade; o domínio constante da cadeia leve é alinhado com um primeiro domínio constante da cadeia pesada, e o domínio variável da cadeia leve é alinhado com um domínio variável da cadeia pesada. Acredita-se que resíduos de aminoácidos específicos formem uma interface entre os domínios variáveis da cadeia leve e pesada.

10 O termo "variável" refere-se ao fato de que certas porções dos domínios variáveis diferem intensamente em termos de seqüências entre anticorpos, e de que elas são usadas na ligação e especificidade de cada anticorpo em particular por seu antígeno em particular. No entanto, a variabilidade não é igualmente distribuída pelos domínios variáveis de anticorpos. Ela está concentrada em três segmentos denominados regiões determinantes de complementaridade (CDRs) ou regiões hipervariáveis nos domínios variáveis tanto da cadeia leve quanto da cadeia pesada. As porções mais altamente conservadas de domínios variáveis são denominadas regiões framework (FR). Os domínios variáveis de cadeias pesadas e leves nativas compreende quatro regiões FR, que adotam amplamente uma configuração em lâmina p, conectadas por três CDRs, que formam alças que conectam, e em alguns casos formam, parte da estrutura em lâmina p. As CDRs em cada cadeia são mantidas intimamente juntas pelas regiões FR e, com as CDRs da outra cadeia, contribuem para a formação do sítio de ligação de antígeno de anticorpos (veja Kabat e cols., NIH Publ. N° 91-3.242, Vol. I, páginas 647-669 (1991)).

15  
20  
25  
30

Os domínios constantes não estão envolvidos diretamente na ligação de um anticorpo a um antígeno, mas exibem várias funções efetoras, por exemplo, participação do anticorpo na toxicidade celular dependente de anticorpo.

5 O termo "região hipervariável", quando usado nesta especificação, refere-se aos resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação de antígeno. A região hipervariável compreende resíduos de aminoácidos de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (ou  
10 seja, resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) no domínio variável da cadeia leve, e 31-35 (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Kabat e cols., "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5ª Ed. Public Health Service, "National Institute of  
15 Health", i 25 Bethesda, MD. [1991]) e/ou aqueles resíduos de uma "alça hipervariável" (ou seja, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) no domínio variável da cadeia leve e 26-32 (H1), 53-55 (H2) e 96-101 (H3) no domínio variável da cadeia pesada; Clothia e Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901 -  
20 917 [1987]). Resíduos "framework" ou "FR" são aqueles resíduos do domínio variável diferentes dos resíduos da região hipervariável como aqui considerados.

"Fragmentos de anticorpos" compreendem uma porção de um anticorpo intacto, preferivelmente a região de ligação  
25 de antígeno ou variável do anticorpo intacto. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> e Fv; diacorpos; anticorpos lineares (Zapata e cols. (1995) *Protein Eng.* 8(10): 1.057-1.062); moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos  
30 formados por fragmentos de anticorpo. A digestão com

papaína de anticorpos produz dois fragmentos de ligação de antígeno idênticos, denominados fragmentos "Fab", cada um com um único sítio de ligação de antígeno, e um fragmento "Fc" residual, cujo nome reflete sua capacidade para  
5 cristalizar rapidamente. O tratamento com pepsina gera um fragmento  $F(ab')_2$  que tem dois sítios de combinação de antígenos que ainda é capaz de entrecruzamento com antígeno.

"Fv" é o fragmento de anticorpo mínimo que contém um  
10 sítio de reconhecimento e ligação de antígeno de completo. Em uma espécie de Fv de duas cadeias, essa região consiste em um dímero de um domínio variável de cadeia pesada e um de cadeia leve em estreita associação não covalente. Em uma espécie de Fv de cadeia única, um domínio variável de  
15 cadeia pesada e um de cadeia leve podem ser ligados de forma covalente por um vinculador peptídico flexível, de tal forma que as cadeias leves e pesadas possam se associar em uma estrutura "dimérica" análoga àquela em uma espécie de Fv de duas cadeias. É nessa configuração que as três  
20 CDRs de cada domínio variável interagem para definir um sítio de ligação de antígeno na superfície do dímero  $V_H-V_L$ . Coletivamente, as seis CDRs conferem especificidade de ligação de antígeno ao anticorpo. No entanto, até mesmo um domínio variável único (ou metade de um Fv que compreende  
25 apenas três CDRs específicas para um antígeno) tem a capacidade de reconhecer e se ligar a antígeno, embora com menor afinidade do que o sítio de ligação inteiro.

O fragmento Fab também contém o domínio constante da cadeia leve e o primeiro domínio constante ( $C_{H1}$ ) da cadeia  
30 pesada. Fragmentos Fab diferem de fragmentos Fab' pela

adição de poucos resíduos no terminal carboxi do domínio  $C_{H1}$  da cadeia pesada que inclui uma ou mais cisteínas da região de dobradiça do anticorpo. Fab'-SH é a designação aqui utilizada para Fab' em que o(s) resíduo(s) de cisteína dos domínios constantes abriga um grupo tiol livre. Fragmentos de anticorpos  $F(ab')_2$  originalmente foram produzidos como pares de fragmentos Fab' que possuem cisteínas como dobradiça entre eles.

Fragmentos dos anticorpos de MCM2 são englobados pela invenção, desde que retenham a afinidade desejada do anticorpo de comprimento total. Dessa forma, por exemplo, um fragmento de um anticorpo de MCM2 irá reter a capacidade de se ligar ao antígeno MCM2. Tais fragmentos são caracterizados por propriedades similares àquelas do anticorpo de comprimento total correspondente, ou seja, os fragmentos irão se ligar especificamente a MCM2. Tais fragmentos são aqui denominados fragmentos de "ligação de antígeno".

Fragmentos de ligação de antígeno adequados de um anticorpo compreendem uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a região de ligação de antígeno ou variável deste. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem, sem limitação, fragmentos Fab,  $F(ab')_2$  e Fv, e moléculas de anticorpo de cadeia única. O termo "Fab" significa um fragmento de ligação de antígeno monovalente de uma imunoglobulina que é composto pela cadeia leve e parte da cadeia pesada.  $F(ab')_2$  significa um fragmento de ligação de antígeno bivalente de uma imunoglobulina que contém ambas as cadeias leves e parte de ambas as cadeias pesadas. "Fv de cadeia única" ou fragmentos de anticorpo

"sFv" significa fragmentos que compreendem os domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> de um anticorpo, estando esses domínios presentes em uma única cadeia polipeptídica. Veja, por exemplo, as Patentes U.S. N<sup>os</sup> 4.946.778, 5.260.203, 5.455.030, e 5.856.456, aqui  
5 incorporadas por referência. Geralmente, o polipeptídeo Fv ainda compreende um vinculador polipeptídico entre os domínios V<sub>H</sub> e V<sub>L</sub> que permite que o sFv forme a estrutura desejada para a ligação de antígeno. Para uma revisão sobre sFv, consulte Pluckthun (1994) em "The Pharmacology of  
10 monoclonal antibodies", Vol. 113, ed. Rosenberg e Moore (Springer-Verlag, Nova York), pp. 269-315.

Anticorpos ou fragmentos de anticorpos podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpos geradas com o uso de técnicas descritas, por exemplo, em McCafferty e  
15 cols. (1990) *Nature* 348: 552-554 (1990) e na Patente U.S. N<sup>o</sup> 5.514.548. Clackson e cols. (1991) *Nature* 352: 624-628 e Marks e cols. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 descrevem o isolamento de anticorpos murídeos e humanos, respectivamente, com o uso de bibliotecas de fago.  
20 Publicações subseqüentes descrevem a produção de anticorpos humanos de alta afinidade (na faixa de nM) por embaralhamento de cadeias (Marks e cols. (1992) *Bio/Technology* 10: 779-783), bem como infecção combinatória e recombinação *in vivo* como estratégia para a construção de  
25 bibliotecas de fago muito grandes (Waterhouse e cols. (1993) *Nucleic. Acids Res.* 21: 2.265-2.266). Dessa forma, essas técnicas são alternativas viáveis para as técnicas tradicionais de hibridoma de anticorpo monoclonal para o isolamento de anticorpos monoclonais.

30 Foram desenvolvidas várias técnicas para a produção de

fragmentos de anticorpo. Tradicionalmente, esses fragmentos eram derivados por meio de digestão proteolítica de anticorpos intactos (veja, por exemplo, Morimoto e cols. (1992) *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24: 107-117 (1992) e Brennan e cols. (1985) *Science* 229: 81).  
5 No entanto, esses fragmentos agora podem ser produzidos diretamente por células hospedeiras recombinantes. Por exemplo, os fragmentos de anticorpos podem ser isolados a partir de bibliotecas de fago de anticorpos discutidas  
10 acima. Alternativamente, fragmentos Fab'-SH podem ser recuperados diretamente de *E. coli* e acoplados quimicamente para formar fragmentos F(ab')<sub>2</sub> (Carter e cols. (1992) *Bio/Technology* 10: 163-167). De acordo com outra abordagem, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> podem ser isolados diretamente de  
15 cultura de célula hospedeira recombinante. Outras técnicas para a produção de fragmentos de anticorpo serão evidentes para aqueles habilitados na técnica.

De preferência, os anticorpos da invenção são de natureza monoclonal. Como indicado acima, "anticorpo  
20 monoclonal" significa um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, ou seja, os anticorpos individuais que compreendem a população são idênticos, exceto quanto a possíveis mutações de ocorrência natural que podem estar presentes em pequenas  
25 quantidades. O termo não é limitado em termos de espécie ou fonte do anticorpo. O termo engloba imunoglobulinas inteiras, além de fragmentos tais como Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv e outros que retenham a função de ligação de antígeno do anticorpo. Anticorpos monoclonais são altamente  
30 específicos, sendo dirigidos contra um único sítio

antigênico, ou seja, um epitopo em particular dentro da proteína MCM2, como aqui definido abaixo. Além disso, ao contrário das preparações de anticorpos convencionais (policlonais) que tipicamente incluem anticorpos diferentes dirigidos contra determinantes (epitopos) diferentes, cada anticorpo monoclonal é dirigido contra um único determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido a partir de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser considerado como que exige a produção do anticorpo por um método específico. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com a presente invenção podem ser feitos pelo método de hibridoma descrito inicialmente por Kohler e cols. (1975) *Nature* 256: 495, ou por métodos de DNA recombinante (veja, por exemplo, a Patente U.S. N° 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" também podem ser isolados de bibliotecas de fago de anticorpos com o uso das técnicas descritas, por exemplo, em Clackson e cols. (1991) *Nature* 352: 624-628; Marks e cols. (1991) *J. Mol. Biol.* 222: 581-597; e na Patente U.S. N° 5.514.548.

Anticorpos monoclonais podem ser preparados com a utilização do método de Kohler e cols. (1975) *Nature* 256: 495-496, ou uma modificação deste. Tipicamente, um camundongo é imunizado com uma solução contendo um antígeno. A imunização pode ser realizada por mistura ou emulsificação da solução contendo antígeno em soro fisiológico, de preferência em um adjuvante como, por exemplo, adjuvante completo de Freund, e injetando-se a mistura ou emulsão por via parenteral. Qualquer método de

imunização conhecido na técnica pode ser usado para se obter os anticorpos monoclonais da invenção. Após a imunização do animal, o baço (e, opcionalmente, vários linfonodos grandes) é removido e dissociado em células 5 únicas. As células esplênicas podem ser rastreadas aplicando-se uma suspensão de células em uma placa ou poço revestido com o antígeno de interesse. As células B que expressam imunoglobulina ligada à membrana específica para o antígeno (ou seja, células produtoras de anticorpo) se 10 ligam à placa e não são removidas por enxágüe. As células B resultantes, ou todas as células esplênicas dissociadas, são então induzidas a se fundirem com células de mieloma para formar hibridomas produtores de anticorpo monoclonal, e são cultivadas em um meio seletivo. As células 15 resultantes são plaqueadas por diluição serial e são testadas quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente ao antígeno de interesse (e que não se ligam a antígenos não relacionados). Os hibridomas que secretam anticorpo monoclonal (mAb) selecionados são então 20 cultivados *in vitro* (por exemplo, em garrafas de cultura de tecido ou em reatores de fibra oca) ou *in vivo* (como ascite em camundongos). Anticorpos monoclonais também podem ser produzidos com o uso de tecnologia de Sítios de Imunizações Múltiplas Repetitivas (RIMMS). Veja, por exemplo, 25 Kilpatrick e cols. (1997) *Hybridoma* 16(4): 381-389; Wring e cols. (1999) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 19(5): 695-707; e Bynum e cols. (1999) *Hybridoma* 18(5): 407-411, todos aqui incorporados por referência em sua totalidade.

Como alternativa ao uso de hibridomas, o anticorpo 30 pode ser produzido em uma linhagem celular como, por

exemplo, linhagem celular CHO, como revelado nas Patentes U.S. N<sup>os</sup> 5.545.403, 5.545.405 e 5.998.144, aqui incorporadas por referência. Resumidamente, a linhagem celular é transfectada com vetores capazes de expressar uma cadeia leve e uma cadeia pesada, respectivamente. Com a transfecção de duas proteínas em vetores separados, podem ser produzidos anticorpos quiméricos. Outra vantagem é a glicosilação correta do anticorpo. Um anticorpo monoclonal também pode ser identificado e isolado rastreando-se uma biblioteca recombinante combinatória de imunoglobulinas (por exemplo, uma biblioteca de exibição de fago de anticorpos) com uma proteína biomarcadora para, desse modo, isolar os membros da biblioteca de imunoglobulinas que se ligam à proteína biomarcadora. Kits para a geração e rastreamento de bibliotecas de exibição de fago são disponíveis comercialmente (por exemplo, o "Pharmacia Recombinant Phage Antibody System", N<sup>o</sup> de Catálogo 27-9400-01; e o "Stratagene SurfZAPJ Phage Display Kit", N<sup>o</sup> de Catálogo 240612). Adicionalmente, exemplos de métodos e reagentes particularmente adequados para uso na geração e no rastreamento de biblioteca de exibição de anticorpos podem ser encontrados, por exemplo, na Patente U.S. N<sup>o</sup> 5,223,409, Publicações PCT N<sup>os</sup> WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, 93/01288, WO 92/01047, 92/09690, e 90/02809; Fuchs e cols. (1991) *Bio/Technology* 9: 1.370-1.372; Hay e cols. (1992) *Hum. Antibod. Hybridomas* 3: 81-85; Huse e cols. (1989) *Science* 246: 1.275-1.281; Griffiths e cols. (1993) *EMBO J.* 12: 725-734.

Em alguns aspectos da invenção, anticorpos podem ser selecionados com base na coloração desejável de amostras

citológicas, e não histológicas. Ou seja, em modalidades específicas, os anticorpos são selecionados com o tipo de amostra final (por exemplo, preparações de citologia) em mente e para especificidade de ligação. Anticorpos dirigidos a biomarcadores de interesse específicos, por exemplo, MCM2, são selecionados e purificados por meio de um processo de rastreamento em multietapas. Tais métodos para seleção de anticorpos são descritos no Pedido U.S. pendente N° de Série 11/087.227, intitulado "Methods and Compositions for the Detection of Cervical Disease", depositado em 23 de março de 2005, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade.

Também são fornecidos anticorpos que possuem as características de ligação de um anticorpo monoclonal da invenção. "Características de ligação" ou "especificidade de ligação", quando usado em relação a um anticorpo, significa que o anticorpo reconhece o mesmo epitopo antigênico ou um epitopo antigênico similar que um anticorpo de comparação. Exemplos de tais anticorpos incluem, por exemplo, um anticorpo que compete com um anticorpo monoclonal da invenção em um ensaio de ligação competitiva. Aqueles habilitados na técnica podem determinar se um anticorpo interfere competitivamente com outro anticorpo através de métodos-padrão.

"Epitopo" significa a parte de uma molécula antigênica para a qual um anticorpo é produzido e à qual o anticorpo irá se ligar. Um "epitopo de MCM2" compreende a parte da proteína MCM2 à qual um anticorpo monoclonal de MCM2 se liga. Epitopos podem compreender resíduos de aminoácidos lineares (ou seja, os resíduos dentro do epitopo estão

dispostos seqüencialmente um depois do outro de forma linear), resíduos de aminoácidos não lineares (aqui denominados "epitopos não lineares"; esses epitopos não estão dispostos seqüencialmente), ou resíduos de aminoácidos tanto lineares quanto não lineares. Tipicamente, epitopos são seqüências de aminoácidos curtas, por exemplo, com comprimento de cerca de cinco aminoácidos. Metodologias sistemáticas para a identificação de epitopos são conhecidas na técnica e são descritas, por exemplo, na Patente U.S. N° 4.708.871 e nos exemplos apresentados abaixo. Resumidamente, em um método, um conjunto de oligopeptídeos superpostos derivados do antígeno pode ser sintetizado e ligado a um arranjo de fase sólida de pinos, com um único oligopeptídeo em cada pino. O arranjo de pinos pode compreender uma placa de microtitulação de 96 poços, que permite testar todos os 96 oligopeptídeos simultaneamente, por exemplo, quanto à ligação a um anticorpo monoclonal específico para o biomarcador. Alternativamente, kits de biblioteca de peptídeos de exibição de fago (New England BioLabs) são atualmente disponíveis comercialmente para mapeamento de epitopos. Com a utilização desses métodos, a afinidade de ligação para todos os subconjuntos possíveis de aminoácidos consecutivos pode ser determinada a fim de identificar o epitopo ao qual certo anticorpo se liga. Epitopos também podem ser identificados por dedução quando são usadas seqüências peptídicas do comprimento do epitopo para a imunização de animais dos quais os anticorpos foram obtidos.

A invenção também engloba polipeptídeos isolados que compreendem um epitopo para a ligação de um anticorpo

monoclonal de MCM2. Esses polipeptídeos correspondem a uma porção do antígeno (ou seja, MCM2) que se liga a um anticorpo monoclonal. Tais polipeptídeos podem ser utilizados em métodos para a produção de anticorpos que se ligam seletivamente a MCM2. A capacidade de um polipeptídeo para ser usado na produção de anticorpos é aqui denominada "atividade antigênica". Por exemplo, as seqüências de aminoácidos apresentadas nos Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 3, 4 e 14 (que correspondem aos resíduos 369 a 382, 688 a 710 e 683 a 692, respectivamente, na seqüência de aminoácidos de MCM2 apresentada no Id. de Seq. N<sup>o</sup>: 1) compreendem epitopos reconhecidos por anticorpos monoclonais de MCM2, mais particularmente, anticorpos monoclonais 27C5.6 e 26H6.19. Veja o Exemplo 4 para detalhes. Variantes e fragmentos das seqüências do epitopo de MCM2 apresentadas nos Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 3, 4 e 14 que retêm a atividade antigênica do polipeptídeo original também são fornecidos. A invenção ainda inclui moléculas de ácido nucléico isolado que codificam polipeptídeos que compreendem epitopos de MCM2, e variantes e fragmentos destas.

Os polipeptídeos da invenção que compreendem epitopos de MCM2 podem ser usados nos métodos para a produção de anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a MCM2, como aqui descritos acima. Tais polipeptídeos também podem ser usados na produção de anticorpos policlonais de MCM2. Por exemplo, anticorpos policlonais podem ser preparados imunizando-se um indivíduo adequado (por exemplo, coelho, cabra, camundongo ou outro mamífero) com um polipeptídeo que compreenda um epitopo de MCM2 (ou seja, um imunógeno). A titulação do anticorpo no indivíduo imunizado pode ser

monitorada ao longo do tempo por técnicas-padrão, por exemplo, com um ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) com o uso de proteína biomarcadora imobilizada. No momento apropriado após a imunização, por exemplo, quando

5 as titulações de anticorpo são as mais elevadas, células produtoras de anticorpo do indivíduo podem ser obtidas e usadas para a preparação de anticorpos monoclonais por técnicas-padrão, por exemplo, a técnica do hibridoma descrita originalmente por Kohler e Milstein (1975) *Nature*

10 256: 495-497, a técnica de hibridoma de célula B humana (Kozbor e cols. (1983) *Immunol. Today* 4:72), a técnica do hibridoma de EBV (Cole e cols. (1985) em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld e Sell (Alan R. Liss, Inc., Nova York, NY), pp. 77-96) ou técnicas de

15 trioma. A tecnologia para a produção de hibridomas é bem conhecida (veja, geralmente, Coligan e cols., eds. (1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., Nova York, NY); Galfre e cols. (1977) *Nature* 266: 55.052; Kenneth (1980) em *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In*

20 *Biological Analyses* (Plenum Publishing Corp., NY; e Lerner (1981) *Yale J. Biol. Med.*, 54: 387-402).

Variantes da seqüência de aminoácidos de um anticorpo monoclonal ou um polipeptídeo que compreende um epitopo de MCM2 aqui descrito também são englobadas pela presente

25 invenção. Variantes podem ser preparadas por mutações na seqüência de DNA clonada que codifica o anticorpo de interesse. Métodos para mutagênese e alterações da seqüência de nucleotídeos são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, Walker e Gastra, eds. (1983)

30 "Techniques in Molecular Biology" (MacMillan Publishing

Company, Nova York); Kunkel (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 488-492; Kunkel e cols. (1987) *Methods Enzymol.* 154: 367-382; Sambrook e cols. (1989) "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor, Nova York); Patente  
5 U.S. N° 4.873.192; e as referências neles citadas; aqui incorporados por referência. Um guia sobre substituições apropriadas de aminoácidos que não afetam a atividade biológica do polipeptídeo de interesse pode ser encontrado no modelo de Dayhoff e cols. (1978) no *Atlas of Protein*  
10 *Sequence and Structure* (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.), aqui incorporado por referência. Substituições conservadoras, por exemplo, a troca de um aminoácido por outro que possua propriedades similares, podem ser preferidas. Exemplos de substituições  
15 conservadoras incluem, sem limitação, Gly↔Ala, Val↔Ile↔Leu, Asp↔Glu, Lys↔Arg, Asn↔Gln e Phe↔Trp↔Tyr.

Na construção de variantes do polipeptídeo de interesse, são feitas modificações de tal forma que as variantes continuem a possuir a atividade desejada, ou  
20 seja, afinidade de ligação similar ao biomarcador. Obviamente, qualquer mutação feita no DNA que codifica o polipeptídeo variante não deve colocar a seqüência fora do quadro de leitura e, de preferência, não criará regiões complementares que poderiam produzir estrutura de mRNA  
25 secundário. Veja A Publicação de Pedido de Patente EP N° 75.444.

De preferência, variantes de um polipeptídeo de referência possuem seqüências de aminoácidos que têm pelo menos 70% ou 75% de identidade de seqüência,  
30 preferivelmente pelo menos 80% ou 85% de identidade de

seqüência, mais preferivelmente pelo menos 90%, 91%, 92%, 93%, 94% ou 95% de identidade de seqüência para a seqüência de aminoácidos para a molécula de anticorpo de referência, ou para uma porção mais curta da molécula de anticorpo de referência. Mais preferivelmente, as moléculas compartilham 5 pelo menos 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de seqüência. Para as finalidades da presente invenção, o percentual de identidade de seqüência é determinado com a utilização do algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman usando 10 uma pesquisa de lacunas afins com uma penalidade de lacuna aberta de 12 e uma penalidade de extensão de lacuna de 2, matriz BLOSUM de .62. O algoritmo de pesquisa de homologia de Smith-Waterman é ensinado em Smith e Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482-489. Uma variante, por exemplo, 15 pode diferir do anticorpo de referência em apenas 1 a 15 resíduos de aminoácidos, apenas 1 a 10 resíduos de aminoácidos, por exemplo, 6-10, apenas 5, apenas 4, 3, 2, ou até mesmo 1 resíduo de aminoácido.

Com relação ao alinhamento ótimo de duas seqüências de 20 aminoácidos, o segmento contíguo da seqüência de aminoácidos variante pode ter resíduos de aminoácidos adicionais ou resíduos de aminoácidos eliminados com relação à seqüência de aminoácidos de referência. O segmento contíguo usado para comparação com a seqüência de 25 aminoácidos de referência incluirá pelo menos 20 resíduos de aminoácidos contíguos, e pode ter 30, 40, 50 ou mais resíduos de aminoácidos. Podem ser feitas correções para identidade de seqüência associada às substituições conservadoras de resíduos ou lacunas (veja algoritmo de 30 pesquisa de homologia de Smith-Waterman).

Os anticorpos monoclonais de MCM2 da invenção podem ser rotulados com uma substância detectável, como descrito abaixo, para facilitar a detecção da proteína biomarcadora na amostra. Tais anticorpos podem ser usados na prática dos métodos da invenção. Os anticorpos e fragmentos de anticorpo da invenção podem ser acoplados a uma substância detectável para facilitar a detecção da ligação de anticorpo. A palavra "rótulo", quando aqui usada, refere-se a um composto ou uma composição detectável que seja conjugada direta ou indiretamente ao anticorpo, de forma a gerar um anticorpo "rotulado". O rótulo pode ser detectável por si próprio (por exemplo, rótulos de radioisótopo ou rótulos fluorescentes) ou, no caso de um rótulo enzimático, pode catalisar a alteração química de um composto ou uma composição de substrato que seja detectável. Exemplos de substâncias detectáveis com a finalidade de rotular os anticorpos incluem várias enzimas, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes e materiais radioativos. Exemplos de enzimas adequadas incluem peroxidase de raiz-forte (HRP), fosfatase alcalina,  $\beta$ -galactosidase ou acetilcolinesterase; exemplos de complexos de grupo prostético incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; exemplos de materiais fluorescentes adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de um material luminescente inclui luminol; exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina; e exemplos de material radioativo adequado incluem  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  ou  $^3\text{H}$ .

São ainda fornecidos kits que compreendem pelo menos um anticorpo monoclonal de MCM2 da invenção. "Kit" significa qualquer produto manufaturado (por exemplo, um pacote ou um recipiente) que compreenda pelo menos um reagente, ou seja, um anticorpo, para detectar especificamente a expressão de MCM2. O kit pode ser promovido, distribuído ou vendido como uma unidade para a realização dos métodos da presente invenção. Adicionalmente, os kits podem conter uma bula que descreva o kit e os métodos para seu uso.

Os kits da invenção geralmente compreendem pelo menos um anticorpo monoclonal dirigido a MCM2, substâncias químicas para a detecção de ligação de anticorpo, um contracorante e, opcionalmente, um agente azulador para facilitar a identificação de células com coloração positiva. Qualquer substância química que detecte a ligação antígeno-anticorpo pode ser usada nos kits da invenção. Em algumas modalidades, as substâncias químicas de detecção compreendem um polímero rotulado conjugado a um anticorpo secundário. Por exemplo, pode ser fornecido um anticorpo secundário que é conjugado a uma enzima que catalisa o depósito de um cromógeno no sítio de ligação antígeno-anticorpo. Tais enzimas e metodologias para sua utilização na detecção da ligação de anticorpo são bem conhecidas na técnica. Em uma modalidade, o kit compreende um anticorpo secundário que é conjugado a um HRP-polímero rotulado. Podem ainda ser fornecidos cromógenos compatíveis com a enzima conjugada (por exemplo, DAB, no caso de um anticorpo secundário rotulado com HRP) e soluções, tais como peróxido de hidrogênio, para o bloqueio da coloração não específica.

Em outras modalidades, a ligação de anticorpo a uma proteína biomarcadora é detectada através do uso de um reagente de sonda de camundongo que se liga aos anticorpos monoclonais, seguido pela adição de um polímero de dextrana conjugado à HRP que se liga ao reagente de sonda de camundongo. Esses reagentes de detecção são disponíveis comercialmente, por exemplo, por Biocare Medical.

Os kits da presente invenção podem ainda compreender um reagente de bloqueio de peroxidase (por exemplo, peróxido de hidrogênio), um reagente de bloqueio de proteína (por exemplo, caseína purificada) e um contracorante (por exemplo, hematoxilina). Um agente azulador (por exemplo, hidróxido de amônio ou TBS, pH 7,4, com Tween-20 e azida de sódio) pode ainda ser fornecido no kit para facilitar a detecção de células com coloração positiva. Os kits também podem conter amostras de controle positivo e negativo para fins de controle de qualidade.

Em outra modalidade, os kits da invenção compreendem dois anticorpos monoclonais de MCM2, mais particularmente anticorpos monoclonais 27C5.6 e 26H6.19. É ainda fornecido um kit que compreende dois anticorpos monoclonais de MCM2 e um terceiro anticorpo dirigido à topoisomerase II alfa (Topo2A). Quando estão presentes vários anticorpos no kit, cada anticorpo pode ser fornecido como um reagente individual ou, alternativamente, como um coquetel de anticorpos que compreende todos os anticorpos de interesse. Além disso, qualquer um ou todos os reagentes do kit podem ser fornecidos em recipientes que os protejam do ambiente externo, por exemplo, em recipientes lacrados. Os kits da invenção são úteis no diagnóstico de doença cervical de

alto grau e podem ainda incluir reagentes para coloração de Papanicolau (por exemplo, EA50 e Laranja G).

As composições da invenção podem ser usadas em métodos para o diagnóstico de doença cervical de alto grau em uma  
5 paciente, tais como aqueles revelados no Pedido U.S. pendente N° de Série 11/087.227, intitulado "Methods and Compositions for the Detection of Cervical Disease", depositado em 23 de março de 2005, que é aqui incorporado por referência em sua totalidade. O "diagnóstico de doença  
10 cervical de alto grau" visa a incluir, por exemplo, o diagnóstico ou a detecção da presença de doença cervical, o monitoramento da progressão da doença e a identificação ou detecção de células ou amostras que sejam indicativas de doença cervical de alto grau. Os termos "diagnóstico",  
15 "detecção" e "identificação" de doença cervical de alto grau são aqui usados de forma intercambiável. "Doença cervical de alto grau" significa aquelas condições classificadas por colposcopia como patologia pré-maligna, patologia maligna, displasia moderada a severa e câncer  
20 cervical. Doença cervical de alto grau subjacente inclui a identificação histológica de CINII, CINIII, HSIL, carcinoma *in situ*, adenocarcinoma e câncer (estágios FIGO I-IV).

Os métodos da invenção compreendem a detecção da superexpressão de pelo menos um biomarcador nuclear que é  
25 seletivamente superexpresso em doença cervical de alto grau. "Biomarcador nuclear" significa qualquer gene de proteína que seja expresso predominantemente no núcleo da célula. Um biomarcador nuclear pode ser expresso em um grau menor em outras partes da célula. "Superexpresso  
30 seletivamente em doença cervical de alto grau" significa

que o biomarcador nuclear de interesse é superexpresso em doença cervical de alto grau, mas não é superexpresso em condições classificadas como LSIL, CINI, amostras infectadas por HPV, sem nenhuma displasia presente, células metaplásicas imaturas e outras condições que não são consideradas como sendo doença clínica. Dessa forma, a detecção dos biomarcador nucleares da invenção permite a diferenciação de amostras indicativas de doença cervical de alto grau subjacente de amostras que são indicativas de proliferação benigna, infecção por HPV em estágio inicial ou displasia leve. Os biomarcadores nucleares de interesse particular incluem proteínas MCM, particularmente MCM2, e Topo2A.

Em um aspecto particular da invenção, os métodos compreendem a obtenção de uma amostra cervical de um paciente, o contato da amostra com pelo menos um anticorpo monoclonal de MCM2 da invenção, e a detecção da ligação do anticorpo à MCM2. Em outras modalidades, a amostra é colocada em contato com pelo menos dois anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a MCM2, particularmente anticorpos monoclonais 27C5.6 e 26H6.19. Em uma modalidade adicional, a amostra é colocada em contato com esses dois anticorpos monoclonais de MCM2 e um terceiro anticorpo que se liga especificamente a Topo2A. Metodologias para detecção da ligação de anticorpo são bem conhecidas na técnica. A ligação de anticorpo a um biomarcador de interesse pode ser detectada através do uso de reagentes químicos que geram um sinal detectável que corresponde ao nível de ligação de anticorpo e, conseqüentemente, ao nível de expressão protéica

biomarcadora. Qualquer método para detecção da ligação anticorpo-antígeno pode ser usado para a prática dos métodos da invenção.

Como aqui usado, o termo "amostra cervical" refere-se a qualquer amostra de células, tecidos ou líquidos corporais da cérvix na qual a expressão de um biomarcador possa ser detectada. Exemplos dessas amostras corporais incluem, sem limitação, líquidos ginecológicos, biópsias e esfregaços. Amostras cervicais podem ser obtidas de uma paciente por diversas técnicas, incluindo, por exemplo, raspando ou esfregando uma área ou com o uso de uma agulha para aspiração de líquidos corporais. Métodos para a coleta de amostras cervicais são bem conhecidos na técnica. Em modalidades específicas, a amostra cervical compreende células cervicais, particularmente em uma preparação de base líquida. Em uma modalidade, as amostras cervicais são coletadas de acordo com as diretrizes de preparação de amostras de citologia de base líquida, por exemplo, a preparação SurePath® (TriPath Imaging, Inc.) ou a preparação ThinPrep® (CYTYC, Inc.). As amostras cervicais podem ser transferidas para uma lâmina de vidro para serem visualizadas com ampliação. Soluções de fixação e coloração podem ser aplicadas às células na lâmina de vidro para preservar a amostra e para facilitar o exame. Em uma modalidade, a amostra cervical será coletada e processada para fornecer uma amostra de monocamada, como apresentado na Patente U.S. N° 5.346.831, aqui incorporada por referência.

Aqueles habilitados na técnica observarão que qualquer uma ou todas as etapas nos métodos da invenção poderiam ser

implementadas por profissionais de forma manual ou automatizada. Dessa forma, as etapas de preparação da amostra cervical, anticorpo e detecção de ligação de anticorpo podem ser automatizadas. Os métodos da invenção  
5 também podem ser combinados com técnicas convencionais de coloração de Papanicolou para permitir um diagnóstico mais preciso de doença cervical de alto grau.

Os exemplos a seguir são oferecidos como forma de ilustração, e não como forma de limitação.

10

## **EXPERIMENTAL**

### **Exemplo 1**

#### **Produção de anticorpos monoclonais de camundongo para MCM2**

Foram gerados anticorpos monoclonais de camundongo específicos para MCM2. O antígeno (um polipeptídeo  
15 imunogênico) foi uma proteína MCM2 recombinante de comprimento total rotulada com hexahistidina. O antígeno foi expresso usando um sistema de expressão de baculovírus em células Tni. Especificamente, a seqüência de codificação para a MCM2 rotulada com hexahistidina (Id. de Seq. N°: 10)  
20 foi clonada no plasmídeo pFastBac1 (Invitrogen) para expressão em células Tni. Métodos para a produção de proteínas recombinantes com a utilização de sistemas de expressão de baculovírus são bem conhecidos na técnica. A proteína MCM2 rotulada foi purificada usando uma agarose  
25 quelante carregada com íons Ni<sup>+2</sup> (Ni-NTA de Qiagen) e usada como imunógeno. Uma seqüência de aminoácidos do polipeptídeo MCM2 imunogênico é fornecida no Id. de Seq. N°: 11.

As imunizações dos camundongos e as fusões de  
30 hibridoma foram realizadas basicamente como descrito em

Kohler e cols. (1975) *Nature* 256: 495-496. Os camundongos foram imunizados com a proteína MCM2 imunogênica rotulada em solução. As células produtoras de anticorpos foram isoladas dos camundongos imunizados e fundidas com células de mieloma para formar hibridomas produtores de anticorpo monoclonal. Os hibridomas foram cultivados em um meio seletivo. As células resultantes foram plaqueadas por diluição serial, e testadas quanto à produção de anticorpos que se ligam especificamente a MCM2 (e que não se ligam a antígenos não relacionados). Para confirmar que os anticorpos monoclonais de interesse reagiram somente com a proteína MCM2, e não com o rótulo de hexahistidina, hibridomas selecionados foram rastreados contra uma proteína rotulada com MCM2-FLAG. As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos para a proteína MCM2-FLAG são apresentadas nos Ids. de Seq. N<sup>os</sup>: 12 e 13, respectivamente. Hibridomas selecionados que secretam anticorpo monoclonal (mAb) foram então cultivados.

Os anticorpos foram purificados a partir dos sobrenadantes dos meios de cultura de células de hibridoma "exauridas" (ou seja, células que cresceram até que a viabilidade caísse até entre 0-15%) usando resina recombinante revestida com Proteína A (STREAMLINE®, Amersham, Inc.). Os anticorpos foram eluídos usando pH baixo, seguido por neutralização imediata do pH. As frações com absorbâncias significativas a 280 nM foram reunidas em pool. O pool resultante foi dialisado contra PBS. Os anticorpos purificados foram submetidos a uma caracterização adicional. Ambos os anticorpos monoclonais de MCM2, 26H6.19 e 27C5.6 foram determinados como sendo

isótipos de IgG1. Detalhes do mapeamento de epitopos desses anticorpos são descritos abaixo.

### Exemplo 2

#### Isolamento de anticorpos monoclonais de células de 5 hibridoma

O procedimento seguinte é usado para isolar anticorpos monoclonais de células de hibridoma:

##### *Preparação dos meios*

- 10 - A uma garrafa de estocagem estéril de 1.000 ml, adicionar 100 ml de soro bovino fetal (FBS) Hyclone.
- Adicionar 10 ml de solução de aminoácidos não essenciais MEM.
- Adicionar 10 ml de solução de penicilina-estreptomicina-L-glutamina.
- 15 - QS até aproximadamente 1.000 ml com meio ExCell 610-HSF.
- Colocar tampas estéreis na garrafa e apertar com força. Agitar suavemente para misturar.
- Conectar uma unidade de filtro a vácuo de acetato 20 estéril de 1.000 ml (0,2 µm) a um sistema de bomba a vácuo.
- Derramar gentilmente aproximadamente metade da solução de meio em uma unidade de filtro a vácuo de acetato estéril e ligar o vácuo.
- Após metade do meio ter sido filtrado, derramar o 25 meio restante na unidade de filtro e continuar a filtração.
- Após todo o meio ter sido filtrado, desconectar a mangueira de vácuo da unidade de filtro a vácuo e desligar a bomba de vácuo. Remover a porção receptora da unidade de filtro da garrafa de filtro. Colocar uma nova tampa de 30 garrafa estéril na garrafa.

- Estocar a 2°C a 10°C. Proteger da luz.

*Cultura inicial de células de hibridoma*

- Descongelar o frasco de cultura de estoque congelada de hibridoma em um banho de H<sub>2</sub>O pré-aquecido a 37°C.
- 5        - Vaporizar o exterior do frasco congelado com etanol 70%.
- Mover o frasco congelado para o interior do gabinete de segurança biológica.
- Remover as células do frasco congelado e transferir
- 10 as células a um tubo de centrífuga de 15 ml.
- Adicionar 7 ml de meios de cultura de células gota a gota ao tubo de centrífuga de 15 ml que contém as células descongeladas.
- Centrifugar o tubo de centrífuga de 15 ml contendo
- 15 as células descongeladas e o meio de cultura por 5 minutos em uma força de 200 g.
- Enquanto as células estão na centrífuga, adicionar
- 45 ml de meio de cultura de células a um frasco T-225 estéril.
- 20        - Após centrifugação, inspecionar visualmente o tubo quanto à presença de um pélete de células.
- Remover o meio do tubo de centrífuga, tendo o cuidado de não deslocar o pélete de células. Observação: caso o pélete de células seja alterado, repetir a etapa de
- 25 centrifugação.
- Adicionar 5 ml de meio de cultura de células ao tubo de centrífuga de 15 ml que contém as células peletizadas. Pipetar para ressuspender o pélete de células no meio.
- Transferir todo o conteúdo das células ressuspensas
- 30 e meio de cultura para o frasco T-225 contendo os 45 ml de

meio.

- Tampar o frasco T-225.

- Observar a presença de células intactas sob o microscópio. Colocar o frasco T-225 imediatamente em uma incubadora de CO<sub>2</sub> e permitir que as células sejam incubadas de um dia para o outro.

*Expansão de linhagem celular de hibridoma*

- Continuar a monitorar a cultura de células quanto à viabilidade, concentração e presença de contaminação.

10 - Monitorar e ajustar a suspensão de células a partir do frasco T-225 inicial, até que a concentração seja de aproximadamente 600.000 células/ml a 800.000 células/ml e um total de 200 a 250 ml de meio.

15 - Deslocar as células e adicionar meio, como for necessário para atender às exigências mínimas de densidade celular. Dividir e transferir a suspensão de células em um novo frasco T-225 estéril. Colocar os 2 x frascos T-225 na incubadora de CO<sub>2</sub>.

20 - Monitorar as células dos 2 x frascos T-225 até que a concentração seja de aproximadamente 600.000 células/ml a 800.000 células/ml, e um total entre 200 a 250 ml de meio para cada frasco.

25 - Deslocar as células e adicionar meio, como for necessário para atender às exigências mínimas de densidade celular. Dividir e transferir as suspensões de células em 2 novos frascos T-225 estéreis adicionais por um total de 4 x frascos T-225. Retornar todos os frascos para a incubadora de CO<sub>2</sub>.

30 - Monitorar as células e ajustar o volume nos 4 x frascos T-225, até que a concentração celular seja de

aproximadamente 600.000 células/ml a 800.000 células/ml, com um volume total de aproximadamente 250 ml por frasco T-225 (ou aproximadamente 1.000 ml no total).

- Continuar a monitorar as células dos 4 x frascos T-225, até que as células tenham crescido à exaustão, com uma viabilidade final de 0%-15%. O sobrenadante da cultura de células está agora pronto para o processo de clarificação.

#### *Clarificação do sobrenadante*

- Ligar a centrífuga de bancada. Colocar os adaptadores do tubo de 500 ml nos compartimentos do rotor, fechar a tampa e ajustar a temperatura em 4°C (+/-) 4°C.

- Usando técnica asséptica, derramar o meio de todos os quatro frascos T-225 agora exauridos em 2 x tubos de centrífuga cônicos de 500 ml.

- Certificar-se de que os 2 x tubos de 500 ml estão equilibrados. Transferir o sobrenadante de um tubo para o outro, como necessário para equilibrá-los.

- Centrifugar o sobrenadante exaurido a 1.350 g (+/- 40 g) por 15 minutos a 2°C a 10°C.

- Após o término da centrifugação, decantar assepticamente o sobrenadante em uma garrafa de estocagem estéril de 1.000 ml e fechá-la com uma tampa estéril.

- Transferir assepticamente 1 ml para o tubo da microcentrífuga. Estocar o tubo da microcentrífuga com amostra a 2°C a 10°C (proteger da luz).

- A amostra clarificada do sobrenadante está pronta para avaliação de IgG com o uso do ensaio Easy-Titer®.

#### *Preparação do tampão*

##### *Tampão de ligação:*

- Adicionar aproximadamente 600 ml de H<sub>2</sub>O DI a um

bécher limpo.

- Adicionar 77,28 ml de solução de ácido bórico (4% p/v). Agitar em temperatura ambiente com uma barra de agitação limpa.

5 - Pesar 233,76 g de cloreto de sódio e colocar na solução durante agitação constante.

- Levar a solução até aproximadamente 950 ml com H<sub>2</sub>O DI e continuar agitação.

10 - Quando o cloreto de sódio tiver se dissolvido e a solução estiver transparente, ajustar o pH até  $9,0 \pm 0,2$  com hidróxido de sódio.

- Remover a solução para um cilindro graduado limpo de 1.000 ml e QS até 1.000 ml com H<sub>2</sub>O DI.

15 - Transferir o tampão completado para uma garrafa de estocagem apropriada. Esse tampão pode ser estocado por até 7 dias, antes de ser utilizado.

- Repetir todo o processo para preparar um adicional de 0,2 litro para 1,0 litro de tampão de ligação.

#### *Tampão de eluição*

20 - Pesar 1,725 g de fosfato de sódio monobásico e colocá-lo em um bécher limpo de 250 ml com uma barra de agitação limpa.

- Pesar 3,676 g de citrato de sódio e colocá-los no mesmo bécher limpo de 250 ml.

25 - Adicionar aproximadamente 175 ml de H<sub>2</sub>O DI e agitar em temperatura ambiente até ser dissolvido.

- Pesar 4,38 g de cloreto de sódio e colocá-los na solução durante agitação.

30 - Levar a solução até aproximadamente 225 ml com H<sub>2</sub>O DI e continuar a agitação.

- Quando o cloreto de sódio tiver se dissolvido e a solução estiver transparente, ajustar o pH até  $3,5 \pm 0,2$  com ácido clorídrico.

- Remover a solução para um cilindro graduado limpo de 5 250 ml e QS até 250 ml com H<sub>2</sub>O DI.

- Conectar uma unidade de filtro a vácuo de acetato estéril de 500 ml (0,2 µm) a um sistema de bomba a vácuo e esterilizar por filtração a solução.

- Remover o filtro e fechar o recipiente com uma tampa 10 estéril.

#### *Adsorção de anticorpo*

- Derramar o sobrenadante clarificado (~ 1 l) em uma bécher plástico limpo de 4.000 ml com uma barra de agitação limpa.

15 - Adicionar uma quantidade aproximadamente igual (~ 1 l) do tampão de ligação ao bécher plástico limpo de 4.000 ml que contém o sobrenadante clarificado. Adicionar uma barra de agitação limpa.

- Cobrir o bécher com um filme plástico e rotular 20 "Ligação de Anticorpo".

- Calcular a quantidade aproximada de Proteína A STREAMLINE® que será necessária usando os dados da Tabela 1.

**Tabela 1: Volume necessário de Resina de Proteína A**

Quantidade de IgG (µg /ml) no sobrenadante	Volume necessário de Resina de Proteína A em mililitros (ml)
>180 - ≤ 200	12,0
>160 - ≤ 180	11,0
>140 - ≤ 160	10,0

>120 - ≤ 140	9,0
>100 - ≤ 120	8,0
>80 - ≤ 100	7,0
>60 - ≤ 80	6,0
>40 - ≤ 60	4,5
>20 - ≤ 40	3,5
≤ 20	2,0

- Fixar um conjunto limpo de coluna descartável e válvula reguladora a um suporte em anel e prender. Fechar a válvula reguladora.

5 - Misturar uma quantidade apropriada de glóbulos de Proteína A STREAMLINE invertendo-se a garrafa várias vezes. Retirar o volume necessário e colocá-lo na coluna descartável.

10 - Lavar os glóbulos de Proteína A STREAMLINE com 10 ml de H<sub>2</sub>O DI. Abrir a válvula reguladora e permitir que a H<sub>2</sub>O DI seja drenada. Fechar a válvula reguladora. Repetir com um adicional de 10 ml de H<sub>2</sub>O DI.

15 - Lavar os glóbulos de Proteína A STREAMLINE com 10 ml de tampão de ligação. Abrir a válvula reguladora e permitir que o tampão de ligação seja drenado. Fechar a válvula reguladora. Repetir com um adicional de 10 ml de tampão de ligação.

20 - Ressuspender os glóbulos de Proteína A STREAMLINE em aproximadamente 10 ml do sobrenadante clarificado e solução de tampão de ligação (da proveta de 4.000 ml) e transferir os glóbulos para o bécher de 4.000 ml que contém o sobrenadante transparente e a solução de tampão de ligação. Repetir, como for necessário, para transferir quaisquer glóbulos restantes. Quando completado, descartar a coluna e

a válvula reguladora.

- Permitir que a mistura seja misturada vigorosamente a 2°C a 10°C por aproximadamente 18 horas.

5 - Quando a mistura estiver completa, desligar a placa de agitação e remover a proveta de "Ligação de Anticorpo" com o sobrenadante tamponado e a suspensão de glóbulos de volta para a área da bancada do laboratório. Permitir que os glóbulos de Proteína A STREAMLINE se depositem no fundo do bécher (aproximadamente 5 minutos).

10 - Fixar um conjunto limpo de coluna descartável e válvula reguladora a um suporte em anel e prender. Fechar a válvula reguladora.

- Rotular uma garrafa limpa de 250 ml ou um recipiente adequado com "Ligação Pós-Lavagem da Coluna".

15 - Rotular uma proveta plástica limpa com "Ligação Pós-Sobrenadante".

- Decantar o sobrenadante da proveta de 4.000 ml no bécher plástico limpo e rotulado de 2 litros, deixando os glóbulos no fundo da proveta de 4.000 ml. Cobrir o bécher de 2.000 ml que contém a solução de "Ligação Pós-Sobrenadante" com filme plástico limpo e estocar a 2°C a 10°C.

25 - Adicionar aproximadamente 15 ml de tampão de ligação na proveta decantada de 4.000 ml rotulada "Ligação de Anticorpo". Ressuspender os glóbulos de Proteína A STREAMLINE e transferi-los para a coluna. Abrir a válvula reguladora e permitir que o tampão de ligação seja drenado no recipiente "Ligação Pós-Lavagem da Coluna". Fechar a válvula reguladora quando drenada.

30 - Transferir quaisquer glóbulos restantes de Proteína

A STREAMLINE no bécher "Ligação de Anticorpo" por adição de tampão de ligação adicional, misturar e transferir para a coluna, como nas etapas precedentes. Fechar a válvula reguladora quando drenada.

- 5 - Calcular a quantidade aproximada de tampão de ligação necessária para lavar os glóbulos de Proteína A STREAMLINE na coluna com os usos dos dados da Tabela 2.

**Tabela 2: Volume de tampão de ligação para lavagem da coluna**

Quantidade de IgG ( $\mu\text{g} / \text{ml}$ ) no sobrenadante	Volume necessário de tampão de ligação em mililitros (ml)
> 180 - $\leq$ 200	5 lavagens totais de coluna com 15,0 ml cada
> 160 - $\leq$ 180	5 lavagens totais de coluna com 15,0 ml cada
> 140 - $\leq$ 160	5 lavagens totais de coluna com 12,5 ml cada
> 120 - $\leq$ 140	5 lavagens totais de coluna com 12,5 ml cada
> 100 - $\leq$ 120	5 lavagens totais de coluna com 12,5 ml cada
> 80 - $\leq$ 100	5 lavagens totais de coluna com 10,0 ml cada
> 60 - $\leq$ 80	5 lavagens totais de coluna com 10,0 ml cada
> 40 - $\leq$ 60	5 lavagens totais de coluna com 7,5 ml cada
> 20 - $\leq$ 40	5 lavagens totais de coluna com 5,0 ml cada

≤ 20	5 lavagens totais de coluna com 5,0 ml cada
------	--

- Lavar os glóbulos de Proteína A STREAMLINE na coluna com o volume apropriado de tampão de ligação pelo número apropriado de lavagens, continuando a coletar o efluente no recipiente "Ligação Pós-Lavagem da Coluna".

5 - Quando completado, fechar a válvula reguladora. Estocar o recipiente "Ligação Pós-Lavagem da Coluna" a 2°C a 10°C.

10 - Determinar os Volumes Totais de Tampão de Eluição e Tampão de Neutralização necessários para eluir os glóbulos de Proteína A STREAMLINE na coluna a partir da Tabela 3.

<u>Tabela 3: Determinação da quantidade de tampão de eluição e tampão de neutralização</u>				
Quantidade de IgG (µg /ml) no sobrenadante	Volume Total de tampão de eluição necessário (ml)	Volume Total de tampão de neutralização necessário (ml)	Volume de tampão de eluição necessário por fração (ml)	Volume Total de tampão de neutralização necessário por fração (ml)
> 180 - ≤ 200	72	7,2	12	1,2
> 160 - ≤ 180	66	6,6	11	1,1
> 140 - ≤ 160	60	6,0	10	1,0
> 120 - ≤ 140	54	5,4	9	0,9
> 100 - ≤ 120	48	4,8	8	0,8
> 80 - ≤ 100	42	4,2	7	0,7
> 60 - ≤ 80	36	3,6	6	0,6
> 40 - ≤ 60	27	2,7	4,5	0,45
> 20 - ≤ 40	21	2,1	3,5	0,35
≤ 20	12	1,2	2	0,2

- Rotular 9 tubos de centrífuga cônicos estéreis "Anticorpo Eluído", Fração # (1 até 9).

- Colocar o volume apropriado de tampão de neutralização necessário por fração (como determinado a partir da Tabela "C" acima) e cada um dos 9 tubos da fração de "Anticorpo Eluído" e colocar de forma segura sob a saída da válvula reguladora da coluna.

- Eluir os glóbulos de Proteína A STREAMLINE na fração da coluna por fração com o volume apropriado de tampão de eluição necessário por fração (como determinado a partir da Tabela 3 acima), enquanto se coleta o eluído em cada um dos tubos de "Anticorpo Eluído" que contêm tampão de neutralização.

- Quando as eluições estiverem completas, misturar cada tubo da fração de "Anticorpo Eluído" gentilmente agitando-se várias vezes. Remover aproximadamente 50 µl da fração # 3 e colocar em uma tira de papel de teste de pH para assegurar que o eluído foi neutralizado até um pH aproximado entre 6,5 a 8,5. Se necessário, acrescentar mais tampão de neutralização ou tampão de eluição, como for necessário para levar o pH até essa faixa.

- Quando a avaliação do pH estiver completada, realizar uma varredura de absorbância da amostra de cada fração a 280 nm-400 nm para determinar a concentração aproximada de IgG no eluído, antes de proceder para o processo de diálise. Aceitar as frações como parte do pool de eluídos, caso o valor de A280-A400 seja  $\geq 0,200$ . Rejeitar as frações como parte do pool de eluídos, caso o valor de A280-A400 seja  $< 0,200$ .

- Rotular um tubo de centrífuga cônico estéril

"Anticorpo Eluído", "Pool de Eluídos", e combinar todas as frações que foram aceitas como parte do pool.

- Realizar uma varredura de absorbância de uma amostra do pool de eluídos para determinar a concentração aproximada de IgG no eluído, antes de proceder para o processo de diálise.

- Estimar o volume do pool de eluídos e calcular o total aproximado em mg de IgG.

- Volume do Pool de Eluídos: \_\_\_\_\_ ml x \_\_\_\_\_ IgG  
10 mg/ml = \_\_\_\_\_ Total em mg de IgG

#### Diálise do anticorpo

- Remover o tubo de "Anticorpo Eluído" de 2°C para 10°C.

- Calcular o comprimento aproximado de tubulação de diálise que será necessário para dialisar o eluído de anticorpo usando o volume aproximado de eluído e os dados da Tabela 4.

Tabela 4: Cálculo de comprimento necessário da tubulação de diálise						
Volume Aproximado de Eluente (ml)	Proporção Volume/comp. da tubulação de diálise	Comprimento aproximado necessário para amostra do eluente (cm)	Espaço entre o líquido e a tampa de 20% (cm)	Comprimento aproximado necessário para amostra mais Espaço entre o líquido e a tampa (cm)	Comprimento aproximado necessário para amarrar a tubulação (cm)	Comprimento total aproximado da tubulação de diálise necessária (cm)
39,6	2	20	4	24	15	63

36,3	2	18	4	22	15	59
33,0	2	17	3	20	15	55
29,7	2	15	3	18	15	51
26,4	2	13	3	16	15	47
23,1	2	12	2	14	15	43
19,8	2	10	2	12	15	39
14,85	2	7	1	9	15	33
11,55	2	6	1	7	15	29
6,6	2	3	1	4	15	23

- Cortar o comprimento necessário de tubulação de diálise (Membrana de Celulose Regenerada Spectra/Por® 2, valor de corte de peso molecular de 12.000-14.000 Dáltons (MWCO), diâmetro de 16 mm, Spectrum Laboratories Inc., N° 5 de Cat. 132678).

- Hidratar a tubulação da membrana de diálise em 1.000 ml de H<sub>2</sub>O DI por > 30 minutos.

- Calcular o volume aproximado de tampão de diálise necessário para dialisar o eluído de anticorpo com o uso dos dados da Tabela 5.

Quantidade de IgG (µg /ml) no sobrenadante	Volume final de anticorpo eluído em mililitros (ml)	Comprimento necessário da tubulação de diálise (cm)	Volume de tampão de diálise (1 X PBS) necessário em litros
> 180 - ≤ 200	39,6 ml	63 cm	3 trocas completas de 4,0 litros
> 160 - ≤ 180	36,3 ml	59 cm	3 trocas

			completas de 3,6 litros
> 140 - ≤ 160	33,0 ml	55 cm	3 trocas completas de 3,3 litros
> 120 - ≤ 140	29,7 ml	51 cm	3 trocas completas de 3,0 litros
> 100 - ≤ 120	26,4 ml	47 cm	3 trocas completas de 2,6 litros
> 80 - ≤ 100	23,1 ml	43 cm	3 trocas completas de 2,3 litros
> 60 - ≤ 80	19,8 ml	39 cm	3 trocas completas de 1,9 litro
> 40 - ≤ 60	14,85 ml	33 cm	3 trocas completas de 1,5 litro
> 20 - ≤ 40	11,55 ml	29 cm	3 trocas completas de 1,2 litro
≤ 20	6,6 ml	23 cm	3 trocas completas de 0,7 litro

- Colocar a quantidade apropriada de tampão de diálise em um bécher plástico com dimensões adequadas. Rotular o bécher "Anticorpo Dialisado". Adicionar uma barra de agitação limpa e colocar o bécher em uma placa de agitação

dentro de um refrigerador ou em uma sala refrigerada a 2°C a 10°C.

- Enxaguar a tubulação de diálise cuidadosamente em H<sub>2</sub>O DI. Amarrar dois nós terminais a aproximadamente 7 cm de uma extremidade da tubulação de diálise e fixar bem apertado.

- Adicionar aproximadamente 5 ml de H<sub>2</sub>O DI na tubulação de diálise.

- Preencher a tubulação de diálise com o anticorpo eluído do tubo de coleta "Anticorpo Eluído".

- Amarrar dois nós terminais a aproximadamente 7 cm da extremidade aberta restante da tubulação de diálise e fixar bem apertado. Assegurar que o espaço entre o líquido e a tampa (*headspace*) é aproximadamente aquele derivado da Tabela 4.

- Colocar a tubulação de diálise preenchida e fechada no reservatório de diálise com o volume apropriado de 1 X PBS (a partir da Tabela 5).

- Cobrir o bécher com filme plástico limpo. Ajustar a velocidade na placa de agitação de tal forma que a amostra de diálise gire livremente, mas não seja puxada para o vórtice do dialisado. A diálise deve ocorrer a 2°C a 10°C com 3 trocas de tampão no total em um período de 24 horas.

#### *Filtração do anticorpo*

- Rotular um tubo de coleta estéril "Anticorpo Dialisado".

- Remover a tubulação da amostra dialisada do bécher de diálise. Cortar a tubulação de diálise aberta em uma extremidade e transferir a amostra dialisada para o tubo de centrífuga de "Anticorpo Dialisado".

- Rotular outro tubo de coleta estéril "Anticorpo Dialisado".

- Selecionar uma seringa "Luer Lok" estéril com capacidade adequada para conter o volume dialisado final.

5 - Anexar um filtro de seringa Acrodisc® à abertura da seringa (Membrana de 0,2 µm HT Tuffryn®, ligação de "Low Protein", Gelman Laboratories, N° de Cat. 4192). Remover o êmbolo da seringa e, segurando a seringa voltada para cima, transferir o anticorpo monoclonal dialisado do tubo de  
10 "Anticorpo Dialisado" para a seringa. Recolocar o êmbolo.

- Manter o filtro de seringa Acrodisc® sobre tubo de coleta aberto, estéril e rotulado "Anticorpo Purificado", e pressionar o êmbolo da seringa para filtrar o anticorpo purificado no tubo de "Anticorpo Purificado".

15 - Após o término da filtração, tampar o tubo de "Anticorpo Purificado" e estocar a 2°C a 10°C.

- Determinar a concentração de anticorpo monoclonal purificado usando o procedimento A280.

### Exemplo 3

#### 20 Método geral para mapeamento de epitopos

##### *Abordagem geral*

O mapeamento de epitopos é realizado para identificar a seqüência de aminoácidos linear dentro de uma proteína antigênica (ou seja, o epitopo) que é reconhecida por um  
25 anticorpo monoclonal específico. Uma abordagem geral para mapeamento de epitopos exige a expressão protéica de comprimento total, além de vários fragmentos (ou seja, formas truncadas) da proteína, geralmente em um sistema de expressão heterólogo. Essas várias proteínas recombinantes  
30 são então usadas para determinar se o anticorpo monoclonal

específico é capaz de se ligar a uma ou mais das formas truncadas da proteína-alvo. Através do uso de truncamentos repetitivos e da geração de proteínas recombinantes com regiões superpostas de aminoácidos, é possível identificar a região que é reconhecida pelo anticorpo monoclonal sob 5 investigação. É empregada a análise *Western blot* ou ELISA para determinar se o anticorpo monoclonal específico sob investigação é capaz de se ligar a um ou mais dos fragmentos recombinantes da proteína. Essa abordagem pode, 10 ao final, identificar as regiões do peptídeo que contêm o epítipo e, em alguns casos, refinar o epítipo precisamente até uma seqüência de 8-11 aminoácidos.

#### *Projeto e criação da construção*

A primeira etapa no mapeamento de epítopos é o projeto 15 de truncamentos gênicos aninhados. Frequentemente, o gene é dividido em quatro partes iguais para análise posterior.

#### *Estratégia de clonagem gênica*

A estratégia de clonagem geral começa com a geração baseada em PCR de fragmentos gênicos clonados. A fim de 20 expressar eficientemente o fragmento clonado, especialmente quando são utilizadas pequenas regiões de aminoácidos, o fragmento clonado é expresso como uma proteína de fusão, ou seja, fundido a outra proteína transportadora que é expressa estavelmente no sistema. A proteína fluorescente 25 verde (GFP) é frequentemente usada como proteína transportadora. GFP é incluída como um parceiro de fusão para estabilizar os fragmentos de truncamento e melhorar a expressão durante a etapa subsequente de expressão protéica *in vitro*. GFP também permite o rastreamento da expressão da 30 proteína de fusão com o uso de anticorpos anti-GFP.

A clonagem para a criação da construção GFP-proteína é realizada com a utilização da abordagem mega-iniciador ou através do uso de clonagem de plasmídeo no vetor pScreen-GFP. Geralmente, os fragmentos de truncamento são fundidos a GFP e a seqüências de controle necessárias para a expressão protéica usando uma técnica denominada mega-iniciador.

O mega-iniciador é a união de dois ou mais fragmentos de DNA por anelamento de regiões homólogas na extremidade dos respectivos fragmentos e extensão do DNA anelado de fita simples com uma DNA polimerase termoestável. Esse processo cria um fragmento de DNA grande a partir de dois ou mais fragmentos menores, ligando-os por sua seqüência compartilhada. Esse fragmento grande é então amplificado usando PCR-padrão.

Caso o mega-iniciador não possa ser usado com sucesso, os fragmentos de truncamento podem ser clonados em um plasmídeo que contém GFP e seqüências de controle da expressão protéica. Essa clonagem cria as fusões GFP/fragmento necessárias para o mapeamento de epitopos. O restante do protocolo pode então proceder como descrito abaixo.

#### *Expressão de proteína*

As construções de expressão criadas, por exemplo, por mega-iniciador, são então introduzidas em um Sistema de Tradução Rápida (RTS). RTS é um sistema de expressão de proteína sem células derivado de lisados de *E. coli*. Esse sistema permite a expressão rápida (3-4 horas) de proteínas a partir de modelos de DNA.

Caso RTS não produza níveis adequados de expressão

protéica, então os fragmentos de truncamento serão clonados no plasmídeo proteína GFP-expressão. Esses plasmídeos de fusão são então transformados em uma cepa otimizada de *E. coli* para expressão protéica. A expressão protéica é induzida em uma cultura de crescimento de bactéria e, após o crescimento, as células são lisadas. As proteínas no lisado celular complexo são então separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE), e o restante do protocolo é igual ao apresentado abaixo.

#### 10 *Deteção de proteína e mapeamento de epitopos*

Os fragmentos protéicos produzidos por RTS são separados com o uso de PAGE, e transferidos para membranas de nitrocelulose. As proteínas ligadas à membrana são então expostas ao anticorpo sob investigação em solução. A ligação anticorpo/proteína é identificada com o uso de metodologias colorimétricas conhecidas na técnica.

A ligação de anticorpo da proteína de comprimento total e de algum subconjunto dos fragmentos truncados de proteína constitui um resultado positivo. Caso a ausência de uma seção específica da proteína elimine a ligação de anticorpo, então o epitopo se situa nesse fragmento.

Caso o anticorpo a ser mapeado não reconheça proteína ligada às membranas de nitrocelulose, então são usados métodos alternativos para a deteção de interações anticorpo/proteína como, por exemplo, ELISA ou imunoprecipitação. Métodos para a deteção de interações anticorpo/proteína são bem conhecidos na técnica.

#### *Refinamento da localização do epitopo*

Como o protocolo descrito acima irá somente limitar a localização do epitopo a até aproximadamente um quarto da

proteína, é necessário repetir o processo na quarta parte da proteína determinada como contendo o epitopo, a fim de especificar ainda mais a localização do epitopo. Para uma proteína muito grande, pode ser necessário repetir esse processo duas a três vezes para limitar o epitopo a até 8-15 aminoácidos.

#### Exemplo 4

##### Caracterização de epitopos para os anticorpos monoclonais de MCM2 27C5.6 e 26H6.19

10 O mapeamento de epitopos para Anticorpos monoclonais de MCM2 27C5.6 e 26H6.19 foi realizado basicamente como descrito no Exemplo 3. Especificamente, foi usada PCR para criar truncamentos do gene MCM2, seguido por RTS para gerar fragmentos recombinantes da proteína MCM2 e, finalmente, 15 *western blotting* para detectar a ligação de anticorpo a MCM2. GFP foi unida aos truncamentos do gene MCM2 em uma segunda rodada de PCR para assegurar uma expressão robusta e estável em RTS

A seqüência de codificação de comprimento total para 20 MCM2 (Id. de Seq. N°: 2; NM\_004526) tem um tamanho de 2.715 bp. No entanto, o cDNA que foi usado para expressar a proteína MCM2 recombinante e que foi usado para imunizar os camundongos durante a produção de anticorpos de MCM2 tinha um tamanho de gene de 2.688 bp (Id. de Seq. N°: 5). O cDNA 25 truncado de MCM2 usado tinha uma região de 27 bp faltando na extremidade 5' da proteína MCM2, especificamente o fragmento ATGGCGGAATCATCGGAATCCTTCACC (Id. de Seq. N°: 6). Foram realizadas as seguintes etapas seqüenciais a fim de mapear o epitopo do anticorpo MCM2-27C5.6:

30 Como o gene MCM2 era grande (> 1.000 bp), e para

minimizar o número de interações de PCR necessárias, o gene foi dividido igualmente em seis regiões [1-6] de aproximadamente 400 bp. Sequências superpostas, que contêm sequências homólogas para permitir mega-iniciador durante um segundo ciclo de PCR e sítios de restrição para uma segunda opção de subclonagem em plasmídeo pScreen-GFP, foram adicionadas ao gene de interesse durante a primeira PCR. A primeira rodada de PCR criou fragmentos da sequência de nucleotídeos truncada de MCM2 (Id. de Seq. N°: 5) incluindo: região [1] tinha 1-426 bp, região [1-2] tinha 1-888 bp, região [1-3] tinha 1-1377 bp, região [1-4] tinha 1-1.845 bp, região [1-5] tinha 1-2.241 bp, região [1-6] tinha 1-2.688 bp e, finalmente, a região [2-6] tinha 427 -2.688 bp. Regiões individuais (por exemplo, região [5]) não foram expressas para evitar epitopos perdidos que estavam presentes em sequência de junção entre regiões.

Os produtos da primeira rodada de PCR de MCM2 foram subclonados em pSCREEN-GFP (BamHI-XhoI), na medida em que os tamanhos dos fragmentos eram muito grandes para mega-iniciador. O único truncamento que não foi bem sucedido foi a região de comprimento total [1-6]. Os iniciadores originais usados para amplificar o gene de comprimento total e os truncamentos foram projetados para incluir sítios de restrição (extremidade 5' BAMHI; extremidade XHOI) para permitir a subclonagem direta em pSCREEN-GFP.

As fusões GFP-gene criadas foram usadas como modelo para a produção de proteína na reação RTS, usando o kit RTS 100 *E. coli* HY da Roche. Os produtos protéicos de RTS foram precipitados por acetona, carregados diretamente em um gel desnaturante de poliacrilimida e analisados por western

blotting. O western blot foi sondado diretamente com o anticorpo monoclonal 27C5.6 e anticorpos GFP.

Os produtos da primeira rodada de RTS foram sondados tanto com anticorpos GFP quanto com o anticorpo monoclonal de MCM2 27C5.6. Foi detectada uma banda positiva na região [1-3]. O processo acima foi repetido usando o fragmento englobado pela região [1-3] como seqüência de partida.

Uma segunda rodada de RTS produziu um resultado positivo para o anticorpo 27C5.6 na região MCM2-3Q3 (CQSAGPFVEVNMEETIYQNYQRIRIQESP (Id. de Seq. N°: 7), que corresponde aos resíduos de aminoácidos 355 a 382 do Id. de Seq. N°: 1). O processo acima foi repetido usando o fragmento englobado pela região MCM2-3Q3 como seqüência de partida.

Uma terceira rodada de RTS produziu um resultado positivo para o anticorpo 27C5.6 na região MCM2-3Q3.2 (IYQNYQRIRIQESP (Id. de Seq. N°: 3), que corresponde aos resíduos de aminoácidos 369 a 382 do Id. de Seq. N°: 1). Não foi obtido resultado positivo na região MCM2-3Q3.1 (CQSAGPFVEVNMEET (Id. de Seq. N°: 8), que corresponde aos resíduos de aminoácidos 355 a 368 do Id. de Seq. N°: 1) ou em MCM2-3Q3.2 (EVNMEETIYQNYQR (Id. de Seq. N°: 9), que corresponde aos resíduos de aminoácidos 362 a 375 do Id. de Seq. N°: 1 ).

## 25 Resultados

Os resultados iniciais mostraram que o epitopo para o anticorpo monoclonal de MCM2 27C5.6 está localizado dentro da região N-terminal da proteína MCM2. Truncamentos continuados da proteína MCM2 mostraram que o epitopo reconhecido por 27C5.6 está localizado dentro de uma região

de catorze aminoácidos, que corresponde especificamente aos  
resíduos de aminoácidos 369-382 do Id. de Seq. N°: 1  
(IYQNYQRIRIQESP (Id. de Seq. N°: 3)). Rodadas adicionais de  
RTS podem ser capazes de refinar ainda mais a localização  
5 do epitopo.

O processo idêntico descrito acima foi usado para  
identificar o epitopo para o anticorpo monoclonal de MCM2  
26H6.19. Os resultados iniciais indicaram que o epitopo  
estava localizado dentro da região do C-terminal da  
10 proteína MCM2. O epitopo foi preliminarmente definido a uma  
região de vinte e três aminoácidos, que corresponde  
especificamente aos resíduos de aminoácidos 688-710 do Id.  
de Seq. N°: 1 (PSNKEEEGLANGSAAEPAMPNTY (Id. de Seq. N°:  
4)). Análises adicionais refinaram o epitopo do anticorpo  
15 monoclonal de MCM2 26H6.19 a uma região de dez aminoácidos  
que compreende os resíduos de aminoácidos 683-692 do Id. de  
Seq. N°: 1 (HVRHHPSNKE (Id. de Seq. N°: 14)).

## LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

<110> Fischer, Timothy J.  
Malinowski, Douglas P.  
Taylor, Adriann J.

<120> ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS PARA SEU USO NA DETECÇÃO DE  
DOENÇA CERVICAL

<130> 46143/310882

<150> 60/675,305

<151> 2005-04-27

<150> 60/718,082

<151> 2005-09-16

<160> 14

<170> FastSEQ para Windows Versão 4.0

<210> 1

<211> 904

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

Lys	Tyr	Asp	Arg	Ile	Thr	Asn	His	Ile	His	Val	Arg	Ile	Ser	His	Leu
		275					280							285	
Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Gln	Leu	His	Leu	Asn	Gln
		290					295					300			
Leu	Ile	Arg	Thr	Ser	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Pro
305					310						315				320
Gln	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Tyr	Asn	Cys	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe	Val	Leu
				325						330					335
Gly	Pro	Phe	Cys	Gln	Ser	Gln	Asn	Gln	Glu	Val	Lys	Pro	Gly	Ser	Cys
			340					345						350	
Pro	Glu	Cys	Gln	Ser	Ala	Gly	Pro	Phe	Glu	Val	Asn	Met	Glu	Glu	Thr
		355					360						365		
Ile	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg	Ile	Arg	Ile	Gln	Glu	Ser	Pro	Gly	Lys
		370				375						380			
Val	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Pro	Arg	Ser	Lys	Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala
385					390						395				400
Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Cys	Lys	Pro	Gly	Asp	Glu	Ile	Glu	Leu	Thr	Gly
				405					410						415
Ile	Tyr	His	Asn	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	Leu	Asn	Thr	Ala	Asn	Gly	Phe
			420					425						430	
Pro	Val	Phe	Ala	Thr	Val	Ile	Leu	Ala	Asn	His	Val	Ala	Lys	Lys	Asp
		435					440						445		
Asn	Lys	Val	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Thr	Asp	Glu	Asp	Val	Lys	Met	Ile
		450				455						460			
Thr	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Gln	Gln	Ile	Gly	Glu	Lys	Ile	Phe	Ala	Ser
465					470							475			480
Ile	Ala	Pro	Ser	Ile	Tyr	Gly	His	Glu	Asp	Ile	Lys	Arg	Gly	Leu	Ala
				485						490					495
Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Glu	Pro	Lys	Asn	Pro	Gly	Gly	Lys	His	Lys
			500					505						510	
Val	Arg	Gly	Asp	Ile	Asn	Val	Leu	Leu	Cys	Gly	Asp	Pro	Gly	Thr	Ala
		515					520						525		
Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Lys	Tyr	Ile	Glu	Lys	Val	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile
		530				535						540			
Phe	Thr	Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Ser	Ala	Val	Gly	Leu	Thr	Ala	Tyr	Val
545					550						555				560
Gln	Arg	His	Pro	Val	Ser	Arg	Glu	Trp	Thr	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Leu
				565					570						575
Val	Leu	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Cys	Leu	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Lys	Met
			580					585						590	
Asn	Asp	Gln	Asp	Arg	Thr	Ser	Ile	His	Glu	Ala	Met	Glu	Gln	Gln	Ser
		595					600						605		
Ile	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Val	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Cys
		610				615						620			
Thr	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Pro	Ser
625					630						635				640
Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Asn	Val	Asp	Leu	Thr	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg
				645						650					655
Phe	Asp	Ile	Leu	Cys	Val	Val	Arg	Asp	Thr	Val	Asp	Pro	Val	Gln	Asp
			660					665						670	
Glu	Met	Leu	Ala	Arg	Phe	Val	Val	Gly	Ser	His	Val	Arg	His	His	Pro
		675					680						685		
Ser	Asn	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala	Ala	Glu	Pro
		690				695						700			
Ala	Met	Pro	Asn	Thr	Tyr	Gly	Val	Glu	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Val	Leu
705					710						715				720
Lys	Lys	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Ala	Lys	Glu	Arg	Val	His	Pro	Lys	Leu	Asn
			725							730					735
Gln	Met	Asp	Gln	Asp	Lys	Val	Ala	Lys	Met	Tyr	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys
			740					745							750



Asp	Asp	Glu	Asp	Val	Glu	Glu	Leu	Thr	Ala	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ala		
		100					105					110					
gag	cgg	gcc	atg	cgg	cag	cgt	gac	cgg	gag	gct	ggc	cgg	ggc	ctg	ggc	444	
Glu	Arg	Ala	Met	Arg	Gln	Arg	Asp	Arg	Glu	Ala	Gly	Arg	Gly	Leu	Gly		
	115					120					125						
cgc	atg	cgc	cgt	ggg	ctc	ctg	tat	gac	agc	gat	gag	gag	gac	gag	gag	492	
Arg	Met	Arg	Arg	Gly	Leu	Leu	Tyr	Asp	Ser	Asp	Glu	Glu	Asp	Glu	Glu		
130					135					140					145		
cgc	cct	gcc	cgc	aag	cgc	cgc	cag	gtg	gag	cgg	gcc	acg	gag	gac	ggc	540	
Arg	Pro	Ala	Arg	Lys	Arg	Arg	Gln	Val	Glu	Arg	Ala	Thr	Glu	Asp	Gly		
				150						155				160			
gag	gag	gac	gag	gag	atg	atc	gag	agc	atc	gag	aac	ctg	gag	gat	ctc	588	
Glu	Glu	Asp	Glu	Glu	Met	Ile	Glu	Ser	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Asp	Leu		
			165					170					175				
aaa	ggc	cac	tct	gtg	cgc	gag	tgg	gtg	agc	atg	gcg	ggc	ccc	cgg	ctg	636	
Lys	Gly	His	Ser	Val	Arg	Glu	Trp	Val	Ser	Met	Ala	Gly	Pro	Arg	Leu		
		180					185					190					
gag	atc	cac	cac	cgc	ttc	aag	aac	ttc	ctg	cgc	act	cac	gtc	gac	agc	684	
Glu	Ile	His	His	Arg	Phe	Lys	Asn	Phe	Leu	Arg	Thr	His	Val	Asp	Ser		
	195					200					205						
cac	ggc	cac	aac	gtc	ttc	aag	gag	cgc	atc	agc	gac	atg	tgc	aaa	gag	732	
His	Gly	His	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	Arg	Ile	Ser	Asp	Met	Cys	Lys	Glu		
210					215					220					225		
aac	cgt	gag	agc	ctg	gtg	gtg	aac	tat	gag	gac	ttg	gca	gcc	agg	gag	780	
Asn	Arg	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Asn	Tyr	Glu	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu		
				230					235					240			
cac	gtg	ctg	gcc	tac	ttc	ctg	cct	gag	gca	ccg	gcg	gag	ctg	ctg	cag	828	
His	Val	Leu	Ala	Tyr	Phe	Leu	Pro	Glu	Ala	Pro	Ala	Glu	Leu	Leu	Gln		
			245					250					255				
atc	ttt	gat	gag	gct	gcc	ctg	gag	gtg	gta	ctg	gcc	atg	tac	ccc	aag	876	
Ile	Phe	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Met	Tyr	Pro	Lys		
		260					265					270					
tac	gac	cgc	atc	acc	aac	cac	atc	cat	gtc	cgc	atc	tcc	cac	ctg	cct	924	
Tyr	Asp	Arg	Ile	Thr	Asn	His	Ile	His	Val	Arg	Ile	Ser	His	Leu	Pro		
	275					280					285						
ctg	gtg	gag	gag	ctg	cgc	tcg	ctg	agg	cag	ctg	cat	ctg	aac	cag	ctg	972	
Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Arg	Gln	Leu	His	Leu	Asn	Gln	Leu		
290					295					300				305			
atc	cgc	acc	agt	ggg	gtg	gtg	acc	agc	tgc	act	ggc	gtc	ctg	ccc	cag	1020	
Ile	Arg	Thr	Ser	Gly	Val	Val	Thr	Ser	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Pro	Gln		
				310					315					320			
ctc	agc	atg	gtc	aag	tac	aac	tgc	aac	aag	tgc	aat	ttc	gtc	ctg	ggt	1068	
Leu	Ser	Met	Val	Lys	Tyr	Asn	Cys	Asn	Lys	Cys	Asn	Phe	Val	Leu	Gly		
			325					330					335				
cct	ttc	tgc	cag	tcc	cag	aac	cag	gag	gtg	aaa	cca	ggc	tcc	tgt	cct	1116	
Pro	Phe	Cys	Gln	Ser	Gln	Asn	Gln	Glu	Val	Lys	Pro	Gly	Ser	Cys	Pro		

340	345	350	
gag tgc cag tcg gcc ggc ccc ttt gag gtc aac atg gag gag acc atc			1164
Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile			
355	360	365	
tat cag aac tac cag cgt atc cga atc cag gag agt cca ggc aaa gtg			1212
Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val			
370	375	380	385
gcg gct ggc cgg ctg ccc cgc tcc aag gac gcc att ctc ctc gca gat			1260
Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp			
	390	395	400
ctg gtg gac agc tgc aag cca gga gac gag ata gag ctg act ggc atc			1308
Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile			
	405	410	415
tat cac aac aac tat gat ggc tcc ctc aac act gcc aat ggc ttc cct			1356
Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro			
	420	425	430
gtc ttt gcc act gtc atc cta gcc aac cac gtg gcc aag aag gac aac			1404
Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn			
	435	440	445
aag gtt gct gta ggg gaa ctg acc gat gaa gat gtg aag atg atc act			1452
Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr			
450	455	460	465
agc ctc tcc aag gat cag cag atc gga gag aag atc ttt gcc agc att			1500
Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile			
	470	475	480
gct cct tcc atc tat ggt cat gaa gac atc aag aga ggc ctg gct ctg			1548
Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala Leu			
	485	490	495
gcc ctg ttc gga ggg gag ccc aaa aac cca ggt ggc aag cac aag gta			1596
Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys Val			
	500	505	510
cgt ggt gat atc aac gtg ctc ttg tgc gga gac cct ggc aca gcg aag			1644
Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala Lys			
515	520	525	
tcg cag ttt ctc aag tat att gag aaa gtg tcc agc cga gcc atc ttc			1692
Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile Phe			
530	535	540	545
acc act ggc cag ggg gcg tcg gct gtg ggc ctc acg gcg tat gtc cag			1740
Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val Gln			
	550	555	560
cgg cac cct gtc agc agg gag tgg acc ttg gag gct ggg gcc ctg gtt			1788
Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu Val			
	565	570	575
ctg gct gac cga gga gtg tgt ctc att gat gaa ttt gac aag atg aat			1836
Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met Asn			
	580	585	590

gac	cag	gac	aga	acc	agc	atc	cat	gag	gcc	atg	gag	caa	cag	agc	atc	1884
Asp	Gln	Asp	Arg	Thr	Ser	Ile	His	Glu	Ala	Met	Glu	Gln	Gln	Ser	Ile	
	595					600					605					
tcc	atc	tcg	aag	gct	ggc	atc	gtc	acc	tcc	ctg	cag	gct	cgc	tgc	acg	1932
Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Val	Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Cys	Thr	
610					615					620					625	
gtc	att	gct	gcc	gcc	aac	ccc	ata	gga	ggg	cgc	tac	gac	ccc	tcg	ctg	1980
Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	
				630					635					640		
act	ttc	tct	gag	aac	gtg	gac	ctc	aca	gag	ccc	atc	atc	tca	cgc	ttt	2028
Thr	Phe	Ser	Glu	Asn	Val	Asp	Leu	Thr	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg	Phe	
			645					650						655		
gac	atc	ctg	tgt	gtg	gtg	agg	gac	acc	gtg	gac	cca	gtc	cag	gac	gag	2076
Asp	Ile	Leu	Cys	Val	Val	Arg	Asp	Thr	Val	Asp	Pro	Val	Gln	Asp	Glu	
		660					665					670				
atg	ctg	gcc	cgc	ttc	gtg	gtg	ggc	agc	cac	gtc	aga	cac	cac	ccc	agc	2124
Met	Leu	Ala	Arg	Phe	Val	Val	Gly	Ser	His	Val	Arg	His	His	Pro	Ser	
	675					680					685					
aac	aag	gag	gag	gag	ggg	ctg	gcc	aat	ggc	agc	gct	gct	gag	ccc	gcc	2172
Asn	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Ala	Asn	Gly	Ser	Ala	Ala	Glu	Pro	Ala	
690					695					700					705	
atg	ccc	aac	acg	tat	ggc	gtg	gag	ccc	ctg	ccc	cag	gag	gtc	ctg	aag	2220
Met	Pro	Asn	Thr	Tyr	Gly	Val	Glu	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Val	Leu	Lys	
				710					715					720		
aag	tac	atc	atc	tac	gcc	aag	gag	agg	gtc	cac	ccg	aag	ctc	aac	cag	2268
Lys	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Ala	Lys	Glu	Arg	Val	His	Pro	Lys	Leu	Asn	Gln	
				725				730						735		
atg	gac	cag	gac	aag	gtg	gcc	aag	atg	tac	agt	gac	ctg	agg	aaa	gaa	2316
Met	Asp	Gln	Asp	Lys	Val	Ala	Lys	Met	Tyr	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	
		740					745					750				
tct	atg	gcg	aca	ggc	agc	atc	ccc	att	acg	gtg	cgg	cac	atc	gag	tcc	2364
Ser	Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Ile	Pro	Ile	Thr	Val	Arg	His	Ile	Glu	Ser	
	755					760					765					
atg	atc	cgc	atg	gcg	gag	gcc	cac	gcg	cgc	atc	cat	ctg	cgg	gac	tat	2412
Met	Ile	Arg	Met	Ala	Glu	Ala	His	Ala	Arg	Ile	His	Leu	Arg	Asp	Tyr	
770					775					780					785	
gtg	atc	gaa	gac	gac	gtc	aac	atg	gcc	atc	cgc	gtg	atg	ctg	gag	agc	2460
Val	Ile	Glu	Asp	Asp	Val	Asn	Met	Ala	Ile	Arg	Val	Met	Leu	Glu	Ser	
				790					795					800		
ttc	ata	gac	aca	cag	aag	ttc	agc	gtc	atg	cgc	agc	atg	cgc	aag	act	2508
Phe	Ile	Asp	Thr	Gln	Lys	Phe	Ser	Val	Met	Arg	Ser	Met	Arg	Lys	Thr	
			805					810						815		
ttt	gcc	cgc	tac	ctt	tca	ttc	cgg	cgt	gac	aac	aat	gag	ctg	ttg	ctc	2556
Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ser	Phe	Arg	Arg	Asp	Asn	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	
		820					825					830				

ttc ata ctg aag cag tta gtg gca gag cag gtg aca tat cag cgc aac 2604  
 Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg Asn  
 835 840 845

cgc ttt ggg gcc cag cag gac act att gag gtc cct gag aag gac ttg 2652  
 Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp Leu  
 850 855 860 865

gtg gat aag gct cgt cag atc aac atc cac aac ctc tct gca ttt tat 2700  
 Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe Tyr  
 870 875 880

gac agt gag ctc ttc agg atg aac aag ttc agc cac gac ctg aaa agg 2748  
 Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys Arg  
 885 890 895

aaa atg atc ctg cag cag ttc tga ggccctatgc catccataag gattccttgg 2802  
 Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe \*  
 900

gattctgggt tggggtggtc agtgcctct gtgctttatg gacacaaaac cagagcactt 2862  
 gatgaactcg ggtactagg gtcagggctt atagcaggat gtctggctgc acctggcatg 2922  
 actgtttggt tctccaagcc tgctttgtgc ttctcacctt tgggtgggat gccttgccag 2982  
 tgtgtcttac ttggttgctg aacatcttgc cacctccgag tgctttgtct ccaactcagta 3042  
 ccttgatca gagctgctga gttcaggatg cctgcgtgtg gtttaggtgt tagccttctt 3102  
 acatggatgt caggagagct gctgcctct tggcgtgagt tgcgtattca ggctgctttt 3162  
 gctgcctttg gccagagagc tggttgaaga tgtttgtaat cgttttcagt ctctgcagg 3222  
 tttctgtgcc cctgtggtgg aagagggcac gacagtgcca ggcagcgtt ctgggctcct 3282  
 cagtcgcagg ggtgggatgt gagtcatgcg gattatccac tcgccacagt tatcagctgc 3342  
 cattgctccc tgtctgtttc cccactctct tatttggtgca ttcggtttgg tttctgtagt 3402  
 ttttaatttt aataaagttg aataaaatat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 3453

<210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Seqüência de aminoácidos para o epitopo de MCM2 do anticorpo monoclonal 27C5.6

<400> 3  
 Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro  
 1 5 10

<210> 4  
 <211> 23  
 <212> PRT  
 <213> Seqüência artificial

<220>  
 <223> Seqüência de aminoácidos para o epitopo de MCM2 do anticorpo monoclonal 26H6.19 (preliminar)

<400> 4  
 Pro Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly Ser Ala Ala Glu  
 1 5 10 15  
 Pro Ala Met Pro Asn Thr Tyr  
 20

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 2688

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência de nucleotídeos para o gene MCM2 truncado

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(2688)

&lt;223&gt; Gene MCM2 truncado desprovido de 27 bp na extremidade 5'

&lt;400&gt; 5

atg gca tcc agc ccg gcc cag cgt cgg cga ggc aat gat cct ctc acc	48
Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr	
1 5 10 15	
tcc agc cct ggc cga agc tcc cgg cgt act gat gcc ctc acc tcc agc	96
Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser	
20 25 30	
cct ggc cgt gac ctt cca cca ttt gag gat gag tcc gag ggg ctc cta	144
Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu	
35 40 45	
ggc aca gag ggg ccc ctg gag gaa gaa gag gat gga gag gag ctc att	192
Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile	
50 55 60	
gga gat ggc atg gaa agg gac tac cgc gcc atc cca gag ctg gac gcc	240
Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala	
65 70 75 80	
tat gag gcc gag gga ctg gct ctg gat gat gag gac gta gag gag ctg	288
Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu	
85 90 95	
acg gcc agt cag agg gag gca gca gag cgg gcc atg cgg cag cgt gac	336
Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp	
100 105 110	
cgg gag gct ggc cgg ggc ctg ggc cgc atg cgc cgt ggg ctc ctg tat	384
Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr	
115 120 125	
gac agc gat gag gag gac gag gag cgc cct gcc cgc aag cgc cgc cag	432
Asp Ser Asp Glu Glu Asp Glu Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg Gln	
130 135 140	
gtg gag cgg gcc acg gag gac ggc gag gag gac gag gag atg atc gag	480
Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu	
145 150 155 160	
agc atc gag aac ctg gag gat ctc aaa ggc cac tct gtg cgc gag tgg	528
Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp	
165 170 175	
gtg agc atg gcg ggc ccc cgg ctg gag atc cac cac cgc ttc aag aac	576
Val Ser Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn	
180 185 190	

ttc	ctg	cgc	act	cac	gtc	gac	agc	cac	ggc	cac	aac	gtc	ttc	aag	gag	624
Phe	Leu	Arg	Thr	His	Val	Asp	Ser	His	Gly	His	Asn	Val	Phe	Lys	Glu	
		195					200					205				
cgc	atc	agc	gac	atg	tgc	aaa	gag	aac	cgt	gag	agc	ctg	gtg	gtg	aac	672
Arg	Ile	Ser	Asp	Met	Cys	Lys	Glu	Asn	Arg	Glu	Ser	Leu	Val	Val	Asn	
	210					215					220					
tat	gag	gac	ttg	gca	gcc	agg	gag	cac	gtg	ctg	gcc	tac	ttc	ctg	cct	720
Tyr	Glu	Asp	Leu	Ala	Ala	Arg	Glu	His	Val	Leu	Ala	Tyr	Phe	Leu	Pro	
	225				230					235					240	
gag	gca	ccg	gcg	gag	ctg	ctg	cag	atc	ttt	gat	gag	gct	gcc	ctg	gag	768
Glu	Ala	Pro	Ala	Glu	Leu	Leu	Gln	Ile	Phe	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu	Glu	
			245						250					255		
gtg	gta	ctg	gcc	atg	tac	ccc	aag	tac	gac	cgc	atc	acc	aac	cac	atc	816
Val	Val	Leu	Ala	Met	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Asp	Arg	Ile	Thr	Asn	His	Ile	
			260					265					270			
cat	gtc	cgc	atc	tcc	cac	ctg	cct	ctg	gtg	gag	gag	ctg	cgc	tcg	ctg	864
His	Val	Arg	Ile	Ser	His	Leu	Pro	Leu	Val	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	
		275					280					285				
agg	cag	ctg	cat	ctg	aac	cag	ctg	atc	cgc	acc	agt	ggg	gtg	gtg	acc	912
Arg	Gln	Leu	His	Leu	Asn	Gln	Leu	Ile	Arg	Thr	Ser	Gly	Val	Val	Thr	
	290					295					300					
agc	tgc	act	ggc	gtc	ctg	ccc	cag	ctc	agc	atg	gtc	aag	tac	aac	tgc	960
Ser	Cys	Thr	Gly	Val	Leu	Pro	Gln	Leu	Ser	Met	Val	Lys	Tyr	Asn	Cys	
	305				310					315					320	
aac	aag	tgc	aat	ttc	gtc	ctg	ggt	cct	ttc	tgc	cag	tcc	cag	aac	cag	1008
Asn	Lys	Cys	Asn	Phe	Val	Leu	Gly	Pro	Phe	Cys	Gln	Ser	Gln	Asn	Gln	
			325						330					335		
gag	gtg	aaa	cca	ggc	tcc	tgt	cct	gag	tgc	cag	tcg	gcc	ggc	ccc	ttt	1056
Glu	Val	Lys	Pro	Gly	Ser	Cys	Pro	Glu	Cys	Gln	Ser	Ala	Gly	Pro	Phe	
			340					345					350			
gag	gtc	aac	atg	gag	gag	acc	atc	tat	cag	aac	tac	cag	cgt	atc	cga	1104
Glu	Val	Asn	Met	Glu	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg	Ile	Arg	
		355				360						365				
atc	cag	gag	agt	cca	ggc	aaa	gtg	gcg	gct	ggc	cgg	ctg	ccc	cgc	tcc	1152
Ile	Gln	Glu	Ser	Pro	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Pro	Arg	Ser	
	370					375					380					
aag	gac	gcc	att	ctc	ctc	gca	gat	ctg	gtg	gac	agc	tgc	aag	cca	gga	1200
Lys	Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Cys	Lys	Pro	Gly	
	385				390					395					400	
gac	gag	ata	gag	ctg	act	ggc	atc	tat	cac	aac	aac	tat	gat	ggc	tcc	1248
Asp	Glu	Ile	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Tyr	His	Asn	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	
			405					410						415		
ctc	aac	act	gcc	aat	ggc	ttc	cct	gtc	ttt	gcc	act	gtc	atc	cta	gcc	1296
Leu	Asn	Thr	Ala	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Phe	Ala	Thr	Val	Ile	Leu	Ala	
			420					425					430			

aac	cac	gtg	gcc	aag	aag	gac	aac	aag	ggt	gct	gta	ggg	gaa	ctg	acc	1344
Asn	His	Val	Ala	Lys	Lys	Asp	Asn	Lys	Val	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Thr	
		435					440					445				
gat	gaa	gat	gtg	aag	atg	atc	act	agc	ctc	tcc	aag	gat	cag	cag	atc	1392
Asp	Glu	Asp	Val	Lys	Met	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Gln	Gln	Ile	
	450					455					460					
gga	gag	aag	atc	ttt	gcc	agc	att	gct	cct	tcc	atc	tat	ggg	cat	gaa	1440
Gly	Glu	Lys	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Ser	Ile	Tyr	Gly	His	Glu	
465					470					475					480	
gac	atc	aag	aga	ggc	ctg	gct	ctg	gcc	ctg	tcc	gga	ggg	gag	ccc	aaa	1488
Asp	Ile	Lys	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Glu	Pro	Lys	
				485					490					495		
aac	cca	ggt	ggc	aag	cac	aag	gta	cgt	ggt	gat	atc	aac	gtg	ctc	ttg	1536
Asn	Pro	Gly	Gly	Lys	His	Lys	Val	Arg	Gly	Asp	Ile	Asn	Val	Leu	Leu	
			500					505					510			
tgc	gga	gac	cct	ggc	aca	gcg	aag	tcg	cag	ttt	ctc	aag	tat	att	gag	1584
Cys	Gly	Asp	Pro	Gly	Thr	Ala	Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Lys	Tyr	Ile	Glu	
		515					520					525				
aaa	gtg	tcc	agc	cga	gcc	atc	ttc	acc	act	ggc	cag	ggg	gcg	tcg	gct	1632
Lys	Val	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Ser	Ala	
	530					535					540					
gtg	ggc	ctc	acg	gcg	tat	gtc	cag	cgg	cac	cct	gtc	agc	agg	gag	tgg	1680
Val	Gly	Leu	Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Arg	His	Pro	Val	Ser	Arg	Glu	Trp	
545					550					555					560	
acc	ttg	gag	gct	ggg	gcc	ctg	gtt	ctg	gct	gac	cga	gga	gtg	tgt	ctc	1728
Thr	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Cys	Leu	
				565					570					575		
att	gat	gaa	ttt	gac	aag	atg	aat	gac	cag	gac	aga	acc	agc	atc	cat	1776
Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Lys	Met	Asn	Asp	Gln	Asp	Arg	Thr	Ser	Ile	His	
			580					585					590			
gag	gcc	atg	gag	caa	cag	agc	atc	tcc	atc	tcg	aag	gct	ggc	atc	gtc	1824
Glu	Ala	Met	Glu	Gln	Gln	Ser	Ile	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Val	
		595				600						605				
acc	tcc	ctg	cag	gct	cgc	tgc	acg	gtc	att	gct	gcc	gcc	aac	ccc	ata	1872
Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Cys	Thr	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	
	610					615					620					
gga	ggg	cgc	tac	gac	ccc	tcg	ctg	act	ttc	tct	gag	aac	gtg	gac	ctc	1920
Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Asn	Val	Asp	Leu	
625					630					635					640	
aca	gag	ccc	atc	atc	tca	cgc	ttt	gac	atc	ctg	tgt	gtg	gtg	agg	gac	1968
Thr	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg	Phe	Asp	Ile	Leu	Cys	Val	Val	Arg	Asp	
				645				650						655		
acc	gtg	gac	cca	gtc	cag	gac	gag	atg	ctg	gcc	cgc	ttc	gtg	gtg	ggc	2016
Thr	Val	Asp	Pro	Val	Gln	Asp	Glu	Met	Leu	Ala	Arg	Phe	Val	Val	Gly	
			660				665						670			
agc	cac	gtc	aga	cac	cac	ccc	agc	aac	aag	gag	gag	gag	ggg	ctg	gcc	2064

Ser	His	Val	Arg	His	His	Pro	Ser	Asn	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Ala		
		675					680					685					
aat	ggc	agc	gct	gct	gag	ccc	gcc	atg	ccc	aac	acg	tat	ggc	gtg	gag	2112	
Asn	Gly	Ser	Ala	Ala	Glu	Pro	Ala	Met	Pro	Asn	Thr	Tyr	Gly	Val	Glu		
	690					695					700						
ccc	ctg	ccc	cag	gag	gtc	ctg	aag	aag	tac	atc	atc	tac	gcc	aag	gag	2160	
Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Ala	Lys	Glu		
705				710						715					720		
agg	gtc	cac	ccg	aag	ctc	aac	cag	atg	gac	cag	gac	aag	gtg	gcc	aag	2208	
Arg	Val	His	Pro	Lys	Leu	Asn	Gln	Met	Asp	Gln	Asp	Lys	Val	Ala	Lys		
				725					730					735			
atg	tac	agt	gac	ctg	agg	aaa	gaa	tct	atg	gcg	aca	ggc	agc	atc	ccc	2256	
Met	Tyr	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Ile	Pro		
			740					745					750				
att	acg	gtg	cgg	cac	atc	gag	tcc	atg	atc	cgc	atg	gcg	gag	gcc	cac	2304	
Ile	Thr	Val	Arg	His	Ile	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Met	Ala	Glu	Ala	His		
		755					760					765					
gcg	cgc	atc	cat	ctg	cgg	gac	tat	gtg	atc	gaa	gac	gac	gtc	aac	atg	2352	
Ala	Arg	Ile	His	Leu	Arg	Asp	Tyr	Val	Ile	Glu	Asp	Asp	Val	Asn	Met		
	770					775					780						
gcc	atc	cgc	gtg	atg	ctg	gag	agc	ttc	ata	gac	aca	cag	aag	ttc	agc	2400	
Ala	Ile	Arg	Val	Met	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Asp	Thr	Gln	Lys	Phe	Ser		
785					790					795					800		
gtc	atg	cgc	agc	atg	cgc	aag	act	ttt	gcc	cgc	tac	ctt	tca	ttc	cgg	2448	
Val	Met	Arg	Ser	Met	Arg	Lys	Thr	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ser	Phe	Arg		
				805					810					815			
cgt	gac	aac	aat	gag	ctg	ttg	ctc	ttc	ata	ctg	aag	cag	tta	gtg	gca	2496	
Arg	Asp	Asn	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Leu	Lys	Gln	Leu	Val	Ala		
			820					825					830				
gag	cag	gtg	aca	tat	cag	cgc	aac	cgc	ttt	ggg	gcc	cag	cag	gac	act	2544	
Glu	Gln	Val	Thr	Tyr	Gln	Arg	Asn	Arg	Phe	Gly	Ala	Gln	Gln	Asp	Thr		
		835					840					845					
att	gag	gtc	cct	gag	aag	gac	ttg	gtg	gat	aag	gct	cgt	cag	atc	aac	2592	
Ile	Glu	Val	Pro	Glu	Lys	Asp	Leu	Val	Asp	Lys	Ala	Arg	Gln	Ile	Asn		
		850				855					860						
atc	cac	aac	ctc	tct	gca	ttt	tat	gac	agt	gag	ctc	ttc	agg	atg	aac	2640	
Ile	His	Asn	Leu	Ser	Ala	Phe	Tyr	Asp	Ser	Glu	Leu	Phe	Arg	Met	Asn		
865					870					875					880		
aag	ttc	agc	cac	gac	ctg	aaa	agg	aaa	atg	atc	ctg	cag	cag	ttc	tga	2688	
Lys	Phe	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys	Met	Ile	Leu	Gln	Gln	Phe	*		
				885					890					895			

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência artificial

<220>

<223> Seqüência de nucleotídeos 5' omitida da seqüência de nucleotídeos truncada de MCM2

<400> 6

atggcggaat catcggaatc cttcacc

27

<210> 7

<211> 28

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Fragmento de MCM2 que corresponde aos resíduos de aminoácidos 355 a 382 do Id. de Seq. N°: 1

<400> 7

Cys	Gln	Ser	Ala	Gly	Pro	Phe	Glu	Val	Asn	Met	Glu	Glu	Thr	Ile	Tyr
1				5					10					15	
Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg	Ile	Arg	Ile	Gln	Glu	Ser	Pro				
			20				25								

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Fragmento de MCM2 que corresponde aos resíduos de aminoácidos 355 a 368 do Id. de Seq. N°: 1

<400> 8

Cys	Gln	Ser	Ala	Gly	Pro	Phe	Glu	Val	Asn	Met	Glu	Glu	Thr
1				5					10				

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Fragmento de MCM2 que corresponde aos resíduos de aminoácidos 362 a 375 do Id. de Seq. N°: 1

<400> 9

Glu	Val	Asn	Met	Glu	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg
1				5					10				

<210> 10

<211> 2718

<212> DNA

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Seqüência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo imunogênico MCM2 rotulado com hexa-histidina

<221> característica variada

<222> (2698)...(2715)

<223> Seqüência de nucleotídeos que codifica o rótulo de hexa-histidina

<400> 10

```

atggcatcca gcccgccca gcgtcggcga ggcaatgac ctctcacctc cagccctggc 60
cgaagctccc ggcgtactga tgccctcacc tccagccctg gccgtgacct tccaccattt 120
gaggatgagt ccgaggggct cctaggcaca gaggggcccc tggaggaaga agaggatgga 180
gaggagctca ttggagatgg catggaaagg gactaccgcg ccatcccaga gctggacgcc 240
tatgaggccg agggactggc tctggatgat gaggacgtag aggagctgac ggccagtcat 300
agggaggcag cagagcgggc catgcggcag cgtgaccggg aggctggccg gggcctgggc 360
cgcatgcgcc gtgggctcct gtatgacagc gatgaggagg acgaggagcg ccctgcccgc 420
aagcgccgcc aggtggagcg ggccacggag gacggcgagg aggacgagga gatgattgag 480
agcatcgaga acctggagga tctcaaaggc cactctgtgc gcgagtgggt gagcatggcg 540
ggccccggc tggagatcca ccaccgcttc aagaacttcc tgcgcactca cgctcgacagc 600
cacggccaca acgtcttcaa ggagcgcac agcgacatgt gcaaagagaa ccgtgagagc 660
ctggtggtga actatgagga cttggcagcc agggagcacg tgctggccta cttcctgcct 720
gaggcaccgg cggagctgct gcagatcttt gatgaggctg ccctggaggt ggtactggcc 780
atgtaccca agtacgacc catcaccaac cacatccatg tccgcatctc ccacctgcct 840
ctggtggagg agctgcgctc gctgaggcag ctgcatctga accagctgat ccgcaccagt 900
ggggtggtga ccagctgcac tggcgtcctg ccccagctca gcatggtcaa gtacaactgc 960
aacaagtgca atttcgtcct gggctccttc tgccagctcc agaaccagga ggtgaaacca 1020
ggctcctgtc ctgagtgcc a gtcggccggc ccctttgagg tcaacatgga ggagaccatc 1080
tatcagaact accagcgtat ccgaatccag gagagtcag gcaaagtggc ggctggccgg 1140
ctgccccgct ccaaggacgc cattctcctc gcagatctgg tggacagctg caagccagga 1200
gacgagatag agctgactgg catctatcac aacaactatg atggctccct caaactgcc 1260
aatggcttcc ctgtctttgc cactgtcacc ctagccaacc acgtggccaa gaaggacaac 1320
aaggttgctg taggggaact gaccgatgaa gatgtgaaga tgatcactag cctctccaag 1380
gatcagcaga tcggagagaa gatctttgcc agcattgctc cttccatcta tggatcatgaa 1440
gacatcaaga gaggcctggc tctggccctg ttcggagggg agcccaaaaa cccaggtggc 1500
aagcacaagg tacgtggtga tatcaacgtg ctcttgtgcg gagaccctgg cacagcgaag 1560
tcgcagttc tcaagtatat tgagaaagtg tccagccgag ccatcttcac cactggccag 1620
ggggcgtcgg ctgtgggctt cacggcgtat gtccagcggc accctgtcag cagggagtgg 1680
accttgagg ctggggccct ggttctggct gaccgaggag tgtgtctcat tgatgaattt 1740
gacaagatga atgaccagga cagaaccagc atccatgagg ccatggagca acagagcatc 1800
tccatctcga aggctggcat cgtcacctcc ctgcaggctc gctgcacggg cattgctgcc 1860
gccaaccca taggagggcg ctacgacccc tcgctgactt tctctgagaa cgtggacctc 1920
acagagcca tcatctcacg ctttgacatc ctgtgtgtgg tgagggacac cgtggaccca 1980
gtccaggacg agatgctggc ccgcttcgtg gtgggcagcc acgtcagaca ccaccccagc 2040
aacaaggagg aggaggggct ggccaatggc agcgtgctg agcccgccat gcccaacacg 2100
tatggcgtgg agcccctgcc ccaggaggtc ctgaagaagt acatcatcta cgccaaggag 2160
agggctccacc cgaagctcaa ccagatggac caggacaagg tggccaagat gtacagtgac 2220
ctgaggaaag aatctatggc gacaggcagc atccccatta cggtgcgcca catcgagtcc 2280
atgatccgca tggcggaggc ccacgcgcgc atccatctgc gggactatgt gatcgaagac 2340
gacgtcaaca tggccatccg cgtgatgctg gagagcttca tagacacaca gaagttcagc 2400
gtcatgcgca gcatgcgcaa gacttttggc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat 2460
gagctgttgc tcttcatact gaagcagtta gtggcagagc aggtgacata tcagcgcac 2520
cgcttgggg cccagcagga cactattgag gtccctgaga aggacttggg ggataaggct 2580
cgtcagatca acatccacaa cctctctgca ttttatgaca gtgagctctt caggatgaac 2640
aagttcagcc acgacctgaa aaggaaaatg atcctgcagc agttcctcga ggggtggtcat 2700
catcatcatc atcattga 2718

```

<210> 11

<211> 905

<212> PRT

<213> Seqüência artificial

<220>

<223> Seqüência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo imunogênico MCM2 rotulado com hexa-histidina

## &lt;223&gt; Rótulo de hexa-histidina

&lt;400&gt; 11

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu  
 35 40 45  
 Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile  
 50 55 60  
 Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp  
 100 105 110  
 Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr  
 115 120 125  
 Asp Ser Asp Glu Glu Asp Glu Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg Gln  
 130 135 140  
 Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp  
 165 170 175  
 Val Ser Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn  
 180 185 190  
 Phe Leu Arg Thr His Val Asp Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu  
 195 200 205  
 Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn  
 210 215 220  
 Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu  
 245 250 255  
 Val Val Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile  
 260 265 270  
 His Val Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr  
 290 295 300  
 Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys  
 305 310 315 320  
 Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln  
 325 330 335  
 Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe  
 340 345 350  
 Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg  
 355 360 365  
 Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser  
 370 375 380  
 Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala  
 420 425 430  
 Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr  
 435 440 445  
 Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile



&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência de nucleotídeos que codifica o polipeptídeo MCM2-FLAG

&lt;400&gt; 12

```

atggcatcca gcccgccca gcgctggcga ggcaatgatc ctctcacctc cagccctggc 60
cgaagctccc ggcgtactga tgcctcacc tccagccctg gccgtgacct tccaccattt 120
gaggatgagt ccgaggggct cctaggcaca gaggggcccc tggaggaaga agaggatgga 180
gaggagctca ttggagatgg catggaaagg gactaccgcg ccatcccaga gctggacgcc 240
tatgaggccg agggactggc tctggatgat gaggacgtag aggagctgac ggccagtcat 300
agggaggcag cagagcgggc catgcggcag cgtgaccggg aggctggccg gggcctgggc 360
cgcatgcgcc gtgggctcct gtatgacagc gatgaggagg acgaggagcg ccttgcccgc 420
aagcgcgcc aggtggagcg ggccacggag gacggcgagg aggacgagga gatgattgag 480
agcatcgaga acctggagga tctcaaaggc cactctgtgc gcgagtgggt gagcatggcg 540
ggccccggc tggagatcca ccaccgcttc aagaacttcc tgcgcaactc cgtcgacagc 600
cacggccaca acgtcttcaa ggagcgcata agcgacatgt gcaaagagaa ccgtgagagc 660
ctggtgggtga actatgagga cttggcagcc agggagcacg tgctggccta cttcctgcct 720
gaggcaccgg cggagctgct gcagatcttt gatgaggctg ccctggaggt ggtactggcc 780
atgtaccca agtacgaccg catcaccaac cacatccatg tccgcatctc ccacctgcct 840
ctggtggagg agctgcgctc gctgaggcag ctgcatctga accagctgat ccgaccagt 900
ggggtgggtga ccagctgcac tggcgtcctg cccagctca gcatggtaaa gtacaactgc 960
aacaagtgca atttcgtcct gggtcctttc tgccagctcc agaaccagga ggtgaaacca 1020
ggctcctgct ctgagtgccg gtcggccggc ccctttgagg tcaacatgga ggagaccatc 1080
tatcagaact accagcgtat ccgaatccag gagagtccag gcaaagtggc ggctggccgg 1140
ctgccccgct ccaaggacgc cattctcctc gcagatctgg tggacagctg caagccagga 1200
gacgagatag agctgactgg catctatcac acaactatg atggctccct caaactgcc 1260
aatggcttcc ctgtctttgc cactgtcatc ctagccaacc acgtggccaa gaaggacaac 1320
aaggttgctg taggggaact gaccgatgaa gatgtgaaga tgatcactag cctctccaag 1380
gatcagcaga tcggagagaa gatctttgcc agcattgctc cttccatcta tggcatgaa 1440
gacatcaaga gaggcctggc tctggccctg ttcggagggg agcccaaaaa cccaggtggc 1500
aagcacaagg tacgtggtga tatcaacgtg ctcttgctgc gagaccctgg cacagcgaag 1560
tcgcagtttc tcaagtatat tgagaaagtg tccagccgag ccatcttcac cactggccag 1620
ggggcgctcg ctgtgggctt cacggcgtat gtccagcggc accctgtcag cagggagtgg 1680
accttgagg ctggggccct ggttctggct gaccgaggag tgtgtctcat tgatgaattt 1740
gacaagatga atgaccagga cagaaccagc atccatgagg ccatggagca acagagcatc 1800
tccatctcga aggctggcat cgtcacctcc ctgcaggctc gctgcacggt cattgctgcc 1860
gccaaccca taggagggcg ctacgacccc tcgctgactt tctctgagaa cgtggacctc 1920
acagagcca tcatctcacg ctttgacatc ctgtgtgtgg tgagggacac cgtggacca 1980
gtccaggagc agatgctggc ccgcttcgtg gtgggcagcc acgtcagaca ccaccccagc 2040
aacaaggagg aggaggggct ggccaatggc agcgtgctg agcccgccat gcccaacacg 2100
tatggcgtgg agcccctgcc ccaggaggct ctgaagaagt acatcatcta cgccaaggag 2160
agggtccacc cgaagctcaa ccagatggac caggacaagg tggccaagat gtacagtgc 2220
ctgaggaag aatctatggc gacaggcagc atccccatta cggctgcggca catcgagtcc 2280
atgatccgca tggcggaggc ccacgcgcgc atccatctgc gggactatgt gatcgaagac 2340
gacgtcaaca tggccatccg cgtgatgctg gagagcttca tagacacaca gaagttcagc 2400
gatgctgca gcatgcgcaa gacttttgcc cgctaccttt cattccggcg tgacaacaat 2460
gagctgttgc tcttcatact gaagcagtta gtggcagagc aggtgacata tcagcgcaac 2520
cgctttggg cccagcagga cactattgag gtcccctgaga aggacttggg ggataaggct 2580
cgtcagatca acatccaaa cctctctgca ttttatgaca gtgagctctt caggatgaac 2640
aagttcagcc acgacctgaa aaggaaaatg atcctgcagc agttcctcga ggactacaaa 2700
gacgacgag acaagtag

```

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 905

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência de aminoácidos para o polipeptídeo MCM2-FLAG

&lt;400&gt; 13

Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser  
 20 25 30  
 Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu  
 35 40 45  
 Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile  
 50 55 60  
 Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala  
 65 70 75 80  
 Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu  
 85 90 95  
 Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp  
 100 105 110  
 Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr  
 115 120 125  
 Asp Ser Asp Glu Glu Asp Glu Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg Gln  
 130 135 140  
 Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp  
 165 170 175  
 Val Ser Met Ala Gly Pro Arg Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn  
 180 185 190  
 Phe Leu Arg Thr His Val Asp Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu  
 195 200 205  
 Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn  
 210 215 220  
 Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro  
 225 230 235 240  
 Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu  
 245 250 255  
 Val Val Leu Ala Met Tyr Pro Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile  
 260 265 270  
 His Val Arg Ile Ser His Leu Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu  
 275 280 285  
 Arg Gln Leu His Leu Asn Gln Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr  
 290 295 300  
 Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys  
 305 310 315 320  
 Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu Gly Pro Phe Cys Gln Ser Gln Asn Gln  
 325 330 335  
 Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe  
 340 345 350  
 Glu Val Asn Met Glu Glu Thr Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg  
 355 360 365  
 Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser  
 370 375 380  
 Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly  
 385 390 395 400  
 Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser  
 405 410 415  
 Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala  
 420 425 430  
 Asn His Val Ala Lys Lys Asp Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr  
 435 440 445  
 Asp Glu Asp Val Lys Met Ile Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile  
 450 455 460  
 Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência de aminoácidos para o epítipo de MCM2 do anticorpo monoclonal 26H6.19 (refinado)

&lt;400&gt; 14

His Val Arg His His Pro Ser Asn Lys Glu  
 1 5 10

&lt;210&gt; 15

&lt;211&gt; 895

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Sequência artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Sequência de aminoácido para proteína MCM2 truncada codificada pela sequência de nucleotídeo de ID. de SEQ. N°: 5

&lt;400&gt; 1

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

				325					330					335		
Glu	Val	Lys	Pro	Gly	Ser	Cys	Pro	Glu	Cys	Gln	Ser	Ala	Gly	Pro	Phe	
			340					345					350			
Glu	Val	Asn	Met	Glu	Glu	Thr	Ile	Tyr	Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg	Ile	Arg	
		355					360					365				
Ile	Gln	Glu	Ser	Pro	Gly	Lys	Val	Ala	Ala	Gly	Arg	Leu	Pro	Arg	Ser	
	370					375					380					
Lys	Asp	Ala	Ile	Leu	Leu	Ala	Asp	Leu	Val	Asp	Ser	Cys	Lys	Pro	Gly	
385					390					395				400		
Asp	Glu	Ile	Glu	Leu	Thr	Gly	Ile	Tyr	His	Asn	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ser	
			405					410					415			
Leu	Asn	Thr	Ala	Asn	Gly	Phe	Pro	Val	Phe	Ala	Thr	Val	Ile	Leu	Ala	
			420					425					430			
Asn	His	Val	Ala	Lys	Lys	Asp	Asn	Lys	Val	Ala	Val	Gly	Glu	Leu	Thr	
	435					440						445				
Asp	Glu	Asp	Val	Lys	Met	Ile	Thr	Ser	Leu	Ser	Lys	Asp	Gln	Gln	Ile	
	450					455					460					
Gly	Glu	Lys	Ile	Phe	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Ser	Ile	Tyr	Gly	His	Glu	
465					470					475					480	
Asp	Ile	Lys	Arg	Gly	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Phe	Gly	Gly	Glu	Pro	Lys	
			485						490					495		
Asn	Pro	Gly	Gly	Lys	His	Lys	Val	Arg	Gly	Asp	Ile	Asn	Val	Leu	Leu	
			500					505					510			
Cys	Gly	Asp	Pro	Gly	Thr	Ala	Lys	Ser	Gln	Phe	Leu	Lys	Tyr	Ile	Glu	
	515						520					525				
Lys	Val	Ser	Ser	Arg	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr	Gly	Gln	Gly	Ala	Ser	Ala	
	530					535					540					
Val	Gly	Leu	Thr	Ala	Tyr	Val	Gln	Arg	His	Pro	Val	Ser	Arg	Glu	Trp	
545					550					555					560	
Thr	Leu	Glu	Ala	Gly	Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Arg	Gly	Val	Cys	Leu	
			565						570					575		
Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	Lys	Met	Asn	Asp	Gln	Asp	Arg	Thr	Ser	Ile	His	
			580					585					590			
Glu	Ala	Met	Glu	Gln	Gln	Ser	Ile	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Val	
		595				600						605				
Thr	Ser	Leu	Gln	Ala	Arg	Cys	Thr	Val	Ile	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ile	
	610					615						620				
Gly	Gly	Arg	Tyr	Asp	Pro	Ser	Leu	Thr	Phe	Ser	Glu	Asn	Val	Asp	Leu	
625				630						635					640	
Thr	Glu	Pro	Ile	Ile	Ser	Arg	Phe	Asp	Ile	Leu	Cys	Val	Val	Arg	Asp	
			645						650					655		
Thr	Val	Asp	Pro	Val	Gln	Asp	Glu	Met	Leu	Ala	Arg	Phe	Val	Val	Gly	
			660					665					670			
Ser	His	Val	Arg	His	His	Pro	Ser	Asn	Lys	Glu	Glu	Glu	Gly	Leu	Ala	
	675					680						685				
Asn	Gly	Ser	Ala	Ala	Glu	Pro	Ala	Met	Pro	Asn	Thr	Tyr	Gly	Val	Glu	
	690					695					700					
Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Val	Leu	Lys	Lys	Tyr	Ile	Ile	Tyr	Ala	Lys	Glu	
705					710					715					720	
Arg	Val	His	Pro	Lys	Leu	Asn	Gln	Met	Asp	Gln	Asp	Lys	Val	Ala	Lys	
			725						730					735		
Met	Tyr	Ser	Asp	Leu	Arg	Lys	Glu	Ser	Met	Ala	Thr	Gly	Ser	Ile	Pro	
			740					745					750			
Ile	Thr	Val	Arg	His	Ile	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Met	Ala	Glu	Ala	His	
	755					760						765				
Ala	Arg	Ile	His	Leu	Arg	Asp	Tyr	Val	Ile	Glu	Asp	Asp	Val	Asn	Met	
	770					775					780					
Ala	Ile	Arg	Val	Met	Leu	Glu	Ser	Phe	Ile	Asp	Thr	Gln	Lys	Phe	Ser	
785					790					795					800	
Val	Met	Arg	Ser	Met	Arg	Lys	Thr	Phe	Ala	Arg	Tyr	Leu	Ser	Phe	Arg	
			805						810					815		

Arg	Asp	Asn	Asn	Glu	Leu	Leu	Leu	Phe	Ile	Leu	Lys	Gln	Leu	Val	Ala
			820					825					830		
Glu	Gln	Val	Thr	Tyr	Gln	Arg	Asn	Arg	Phe	Gly	Ala	Gln	Gln	Asp	Thr
		835					840					845			
Ile	Glu	Val	Pro	Glu	Lys	Asp	Leu	Val	Asp	Lys	Ala	Arg	Gln	Ile	Asn
	850					855					860				
Ile	His	Asn	Leu	Ser	Ala	Phe	Tyr	Asp	Ser	Glu	Leu	Phe	Arg	Met	Asn
865					870					875					880
Lys	Phe	Ser	His	Asp	Leu	Lys	Arg	Lys	Met	Ile	Leu	Gln	Gln	Phe	
				885					890					895	



PI0610975-6

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal que é capaz de se ligar especificamente a MCM2, ou uma variante ou fragmento desse, caracterizado pelo fato do anticorpo ser selecionado do grupo que consiste em:

(a) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 27C5.6, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6668;

(b) o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 26H6.19, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6667;

(c) um anticorpo monoclonal que tem as características de ligação do anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 27C5.6 ou 26H6.19;

(d) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo capaz de ligar o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 27C5.6 ou 26H6.19;

(e) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende a seqüência de aminoácidos apresentada em Id. de Seq. N°:3;

(f) um anticorpo monoclonal que se liga a um epitopo que compreende a seqüência de aminoácidos de Id. de Seq. N°:14

(g) um anticorpo monoclonal que compete em um ensaio de ligação competitiva com o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 27C5.6 ou 26H6.19; e,

(h) um anticorpo monoclonal que é um fragmento de ligação do antígeno de um anticorpo monoclonal de (a) - (g), em que o fragmento retém a capacidade de se ligar

especificamente a MCM2 ou uma variante ou fragmento desse.

2. Linha de células de hibridoma 27C5.6 caracterizada por ser depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6668.

5 3. Linha de células de hibridoma 26H6.19 caracterizada por ser depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6667.

4. Linha de células de hibridoma caracterizada por ser capaz de produzir um anticorpo monoclonal da  
10 reivindicação 1.

5. Kit para diagnóstico de doença cervical de alto grau caracterizado por compreender pelo menos um anticorpo monoclonal conforme definido na reivindicação 1.

6. Kit, de acordo com a reivindicação 5,  
15 caracterizado pelo fato do anticorpo monoclonal ser o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 27C5.6, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6668, ou o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 26H6.19, depositada com  
20 a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6667.

7. Kit, de acordo com a reivindicação 5  
caracterizado por compreender pelo menos dois anticorpos, em que um primeiro anticorpo é o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 27C5.6,  
25 depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6668 e um segundo anticorpo é o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 26H6.19, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6667.

8. Kit, de acordo com a reivindicação 7,  
30 caracterizado por também compreender um anticorpo que se

liga especificamente a Topo2A.

9. Kit, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que cada anticorpo é fornecido como um reagente de anticorpo separado.

5 10. Kit, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que todos os anticorpos são fornecidos como um coquetel de anticorpos.

11. Kit, de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o referido kit também  
10 compreende um reagente de bloqueio de peroxidase, um reagente de bloqueio de proteína, agentes químicos para a detecção de ligação de anticorpo às referidas proteínas biomarcadoras, uma contra-coloração, um agente de coloração azul e instruções para uso.

15 12. Kit, de acordo com a reivindicação 5 caracterizado por também compreender reagentes para coloração de Pap.

13. Kit, de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que os reagentes para coloração  
20 de Pap compreendem EA50 e Laranja G.

14. Método para diagnóstico de doença cervical de alto grau em um paciente caracterizado por compreender:

a) a obtenção de uma amostra cervical do paciente;

b) o contato da amostra com pelo menos um anticorpo  
25 monoclonal da reivindicação 1 que se liga especificamente a MCM2; and,

c) detecção da ligação do anticorpo a MCM2.

15. Método, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato do anticorpo monoclonal ser o  
30 anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de

hibridoma 27C5.6, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6668 ou o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 26H6.19, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6667.

5           16. Método, de acordo com a reivindicação 14 caracterizado por compreender o contato da amostra com pelo menos dois anticorpos monoclonais que se ligam especificamente a MCM2, em que um primeiro anticorpo é o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de  
10 hibridoma 27C5.6, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6668 e um segundo anticorpo é o anticorpo monoclonal produzido pela linha de células de hibridoma 26H6.19, depositada com a ATCC como depósito de Patente No. PTA-6667.

15           17. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de também compreender o contato da amostra com um anticorpo que se liga especificamente a Topo2A.

20           18. Método, de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato dos anticorpos fazerem contato com a amostra seqüencialmente como reagentes de anticorpo individuais ou simultaneamente como um coquetel de anticorpos.

25           19. Polipeptídeo isolado caracterizado pelo fato de compreender um epitopo para ligação a um anticorpo monoclonal de MCM2, em que o polipeptídeo compreende uma seqüência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste em:

30           (a) um polipeptídeo que compreende a seqüência de aminoácidos apresentada em Id. de Seq. N°:3 ou 14; e,

(b) um polipeptídeo que tem pelo menos 90% de identidade de seqüência a Id. de Seq. N°:3 ou 14, em que o polipeptídeo tem atividade antigênica.

20. Método para a produção de um anticorpo de MCM2 caracterizado pelo fato de compreender a imunização de um animal com um polipeptídeo conforme definido na reivindicação 19.

21. Método para a produção de um anticorpo monoclonal de MCM2 caracterizado por compreender:

10 (a) imunização de um animal com um polipeptídeo conforme definido na reivindicação 19 sob condições para despertar uma resposta imune;

(b) isolamento das células que produzem anticorpos do animal;

15 (c) fusão das células que produzem anticorpo com células imortalizadas em cultura para formar células de hibridoma que produzem anticorpo monoclonal;

(d) cultura das células de hibridoma; e,

(e) isolamento de anticorpos monoclonais da cultura.

ANTICORPOS MONOCLONAIS E MÉTODOS PARA SEU USO NA DETECÇÃO  
DE DOENÇA CERVICAL

São fornecidos métodos e composições para o diagnóstico de doença cervical de alto grau em uma amostra de paciente. As composições incluem novos anticorpos monoclonais e variantes e fragmentos desses, que se ligam especificamente a MCM2. Anticorpos monoclonais que têm as características de ligação de um anticorpo de MCM2 da invenção também são fornecidos. São também aqui reveladas linhas de células de hibridoma que produzem um anticorpo monoclonal de MCM2 da invenção. As composições têm uso na prática dos métodos para diagnóstico de doença cervical de alto grau que compreendem a detecção de superexpressão de MCM2 em uma amostra cervical de um paciente. Kits para a prática dos métodos da invenção são também fornecidos. Os polipeptídeos que compreendem a seqüência de aminoácidos para um epitopo de MCM2 e métodos de uso desses polipeptídeos na produção de anticorpos também são englobados pela presente invenção.