



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0911926-4 A2



(22) Data do Depósito: 05/08/2009

(43) Data da Publicação Nacional: 18/08/2020

(54) **Título:** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ANTICORPOS E USOS DE UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DO MESMO.

(51) **Int. Cl.:** A61K 39/395; A61P 35/00; C07K 16/18; C12N 15/09; C12P 21/08.

(30) **Prioridade Unionista:** 05/08/2008 JP 2008-201928; 31/03/2009 JP 2009-087285.

(71) **Depositante(es):** TORAY INDUSTRIES, INC.

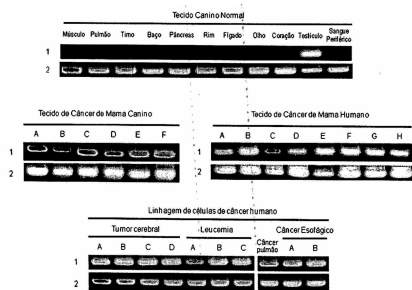
(72) **Inventor(es):** FUMIYOSHI OKANO; SHINICHI KOBAYASHI; TAKANORI SAITO; TAKAYOSHI IDO.

(86) **Pedido PCT:** PCT JP2009063882 de 05/08/2009

(87) **Publicação PCT:** WO 2010/016526 de 11/02/2010

(85) **Data da Fase Nacional:** 04/02/2011

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ANTICORPOS E USOS DE UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DO MESMO. A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica para tratamento e/ou prevenção de câncer, que compreende, como um ingrediente ativo, um anticorpo ou um fragmento do mesmo que tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-I ou um fragmento do mesmo que compreende 7 ou mais aminoácidos consecutivos.



**"COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ANTICORPOS E USOS DE UM
ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DO MESMO"**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a um uso médico inovador de
5 anticorpos para CAPRIN-1 ou fragmentos dos mesmos como, por exemplo,
agentes terapêuticos e/ou preventivos para câncer.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

O câncer é a principal causa de morte. O tratamento atualmente
realizado para câncer é principalmente terapia cirúrgica, que pode ser
10 combinada com radioterapia ou quimioterapia. Apesar do desenvolvimento de
novos métodos cirúrgicos e da descoberta de novos agentes anticâncer nos
últimos anos, os resultados do tratamento desta doença não são
consideravelmente aprimorados atualmente, exceto para alguns cânceres.
Através de um progresso recente da biologia molecular e da imunologia do
15 câncer, os anticorpos que são especificamente reativos a cânceres, antígenos
de câncer reconhecidos por células T citotóxicas, bem como os genes que
codificam os antígenos de câncer foram identificados, e as expectativas para
imunoterapias específicas que têm como alvo os antígenos de câncer foram
elevadas (Tsuyoshi AKIYOSHI, "*Gan To Kagaku-Ryoho* (Cancer and
20 Chemotherapy)," 1997, vol. 24, pp. 551-519 (*Jp*) (Cancer and Chemotherapy
Publishers, Inc., Japão)).

Em métodos de tratamento para o câncer, com a finalidade de
reduzir efeitos colaterais, é desejável que peptídeos, polipeptídeos ou proteínas
reconhecidos como antígenos de câncer estejam ausentes em quase todas as
25 células normais, mas especificamente presentes em células cancerígenas. Em
1991, Boon *et al.*, do Instituto Ludwig na Bélgica, isolaram o antígeno MAGE 1
de melanoma humano reconhecido por células T CD8-positivas pelo método de
clonagem por expressão de cDNA com o uso de uma linhagem de célula de

câncer autóloga e células T reativas ao câncer (Bruggen P. *et al.*, Science, 254:1643-1647 (1991)). Posteriormente, o método SEREX (identificação sorológica de antígenos por clonagem de expressão recombinante) foi relatado, sendo que os antígenos tumorais reconhecidos por anticorpos produzidos
5 através da resposta a um câncer autólogo no corpo de um paciente com câncer podem ser identificados com o uso da técnica de clonagem de expressão de gene (Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 92:11810-11813 (1995); e documento de patente nº US 5.698.396). Por meio do método SEREX, alguns antígenos de
10 câncer, que não são substancialmente expressos em células normais, mas são especificamente expressos em células cancerígenas, foram isolados (Int. J. Cancer, 72: 965-971 (1997); Cancer Res., 58: 1034-1041 (1998); Int. J. Cancer, 29: 652-658 (1998); Int. J. Oncol., 14: 703-708 (1999); Cancer Res., 56: 4766-4772 (1996); e Hum. Mol. Genet 6: 33-39, 1997). Adicionalmente, os ensaios clínicos de terapias celulares que usam imunócitos que especificamente
15 reagem com antígenos de câncer, que são alguns dos antígenos de câncer isolados, e imunoterapias específicas de câncer que usam vacinas que compreendem antígenos de câncer ou similares foram conduzidos.

Nesse ínterim, nos últimos anos, uma variedade de medicamentos com base em anticorpos para tratamento de câncer que têm
20 como alvo proteínas de antígeno em células cancerígenas começaram a surgir. Tais medicamentos usados como agentes terapêuticos específicos de câncer exibem eficácia de droga até um certo ponto e, dessa forma, eles foram ganhando atenção. Entretanto, a maioria das proteínas de antígeno-alvo são também expressas em células normais. Como um resultado da administração
25 de anticorpo, não somente células cancerígenas, mas também células normais nas quais um antígeno-alvo foi expresso podem ser danificadas, ocasionando assim um efeito colateral (ou adverso), que se torna problemático. Por conseguinte, espera-se que, se for possível identificar os antígenos de câncer

que são expressos especificamente na superfície de uma célula cancerígena, e usar como medicamentos os anticorpos tendo como alvo tais antígenos, então, o tratamento com medicamentos baseados em anticorpos que pode ocasionar menos efeitos colaterais poderia ser concretizado.

5 A proteína 1 citoplasmática e associada à proliferação (CAPRIN-1) é uma proteína intracelular que é expressa quando células normais em fase de repouso são ativadas ou se submetem à divisão celular. A CAPRIN-1 é também conhecida por estar envolvida na regulação do transporte e da tradução de mRNAs através da formação de grânulos de estresse
10 citoplasmático com RNA em uma célula. A CAPRIN-1 tem diferentes nomes, tais como proteína 1 de membrana ancorada a GPI e proteína componente de membrana do marcador 1 de superfície (M11S1), se esta proteína for conhecida como uma proteína de membrana. Estes diferentes nomes são derivados da publicação (J. Biol. Chem., 270: 20717-20723, 1995) de que
15 sequência gênica de CAPRIN-1 tem originalmente uma região de ligação a GPI e CAPRIN-1 é uma proteína de membrana expressa em células cancerígenas de cólon. Foi posteriormente relatado que a sequência gênica de CAPRIN-1 descrita na publicação mencionada não estava correta; isto é, uma alteração *frame-shift* ocorreu por deleção de um único nucleotídeo da sequência gênica
20 de CAPRIN-1 atualmente registrado no GenBank ou similares, de modo que 80 aminoácidos foram deletados da região C-terminal e o artefato resultante (74 aminoácidos) foi a porção de ligação a GPI da publicação; e um outro erro também estava presente na extremidade 5' da sequência gênica, resultando assim na deleção de 53 aminoácidos da região N-terminal (J. Immunol., 172:
25 2389-2400, 2004). Adicionalmente, foi relatado que a proteína codificada pela sequência gênica de CAPRIN-1 atualmente registrada no GenBank ou similares não é uma proteína de membrana celular (J. Immunol., 172: 2389-2400, 2004).

Além disso, com base no relatório de J. Biol. Chem., 270: 20717-20723, 1995, a CAPRIN-1 é uma proteína de membrana celular. Os documentos de patente US2008/0075722 e WO2005/100998 revelam que a CAPRIN-1 sob o nome de M11S1 pode ser usada para terapia de câncer como um alvo de medicamentos a base de anticorpos para a terapia de câncer e como uma das proteínas de membrana celular; entretanto, os Exemplos não contêm descrição da terapia de câncer que usa um anticorpo contra a proteína. Entretanto, conforme relatado em J. Immunol., 172:2389-2400, 2004, acreditava-se que, desde o depósito do documento US2008/0075722 até o presente momento, a CAPRIN-1 não era expressa na superfície de uma célula e, dessa forma, é óbvio que os conteúdos dos documentos US2008/0075722 e WO2005/100998 baseados somente nessa informação -incorreta- que a CAPRIN-1 é uma proteína de membrana celular não devem ser interpretados como conhecimento de técnica comum de pessoas versadas na técnica.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

PROBLEMA A SER RESOLVIDO PELA INVENÇÃO

Um objeto da presente invenção consiste em identificar proteínas de antígeno de câncer especificamente expressas na superfície de células cancerígenas e fornecer um uso de anticorpos que tem como alvo tais proteínas como agentes terapêuticos e/ou preventivos (ou profiláticos) para câncer.

MEIOS PARA RESOLVER PROBLEMA

Como um resultado de estudos intensos, os presentes inventores obtiveram agora cDNA que codifica uma proteína que se liga a um anticorpo presente no soro de um organismo contendo tumor através do método SEREX com o uso de bibliotecas de cDNA derivadas de tecido de testículo e soros de cães com câncer de mama. Com o uso dos genes caninos obtidos e dos genes homólogos a isto de humano, bovino, equino, camundongo e frango, as

proteínas CAPRIN-1 que têm sequências de aminoácido mostrada nos números pares da SEQ ID NOs: 2 a 30 (isto é, SEQ ID NOs com números pares: 2 a 30) e anticorpos contra as proteínas CAPRIN-1 foram preparados agora. Além disso, os presentes inventores concluíram que a CAPRIN-1 é especificamente expresso nas células de câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de esôfago, câncer de cólon, câncer gástrico e câncer de rim, e aquelas porções das proteínas CAPRIN-1 são especificamente expressas na superfície de tais células cancerígenas. Adicionalmente, os presentes inventores concluíram agora que os anticorpos contra as porções de CAPRIN-1 expressas em superfícies de célula cancerígena podem danificar (ou prejudicam) células cancerígenas que expressam CAPRIN-1. Estas revelações levam à conclusão da presente invenção.

Portanto, a presente invenção tem características conforme descrito abaixo.

A presente invenção fornece uma composição farmacêutica para tratamento e/ou prevenção de um câncer, que compreende, como um ingrediente ativo, um anticorpo ou um fragmento do mesmo que tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1, que tem uma sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma das sequências de numeração par das SEQ ID Nos: 2 a 30, ou uma sequência de aminoácido que tem 80% ou mais, de preferência 85% ou mais, com mais preferência 90% ou mais, e com preferência adicional 95% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido de qualquer uma das sequências de numeração par das SEQ ID NOs: 2 a 30, ou com um fragmento da proteína CAPRIN-1 que compreende 7 ou mais aminoácidos consecutivos.

Em uma modalidade da presente invenção, o câncer é câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de

esôfago, câncer de cólon, câncer gástrico (ou estomacal) ou câncer de rim.

Em uma outra modalidade da presente invenção, o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou policlonal.

Em uma outra modalidade da presente invenção, o anticorpo é um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia única ou um anticorpo biespecífico.

Em uma outra modalidade da presente invenção, o anticorpo é um anticorpo que tem uma reatividade imunológica a um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 37 ou SEQ ID NO: 136, ou uma sequência de aminoácido que tem 80% ou mais, de preferência 85% ou mais, com mais preferência 90% ou mais, e com preferência adicional 95% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido, ou com um fragmento do polipeptídeo.

Em uma outra modalidade da presente invenção, na composição farmacêutica para tratamento e/ou prevenção de um câncer que compreende o anticorpo como um ingrediente ativo, o anticorpo acima é um dentre os anticorpos (a) a (k) descritos abaixo e tem uma reatividade imunológica com uma proteína CAPRIN-1.

(a) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46.

(b) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostrada nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52.

(c) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e

42, e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 55, 56 e 57.

(d) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 60, 61 e 62.

(e) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostrada nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 65, 66 e 67.

(f) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ-ID NOs: 70, 71 e 72, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 74, 75 e 76.

(g) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 80, 81 e 82, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 84, 85 e 86.

(h) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 90, 91 e 92, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 94, 95 e 96.

(i) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 104, 105 e 106.

(j) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 110, 111

e 112, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 114, 115 e 116.

(k) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 120, 121 e 122, e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 124, 125 e 126.

EFEITOS DA INVENÇÃO

Os anticorpos contra CAPRIN-1 usada na presente invenção danificam (ou prejudicam) células cancerígenas. Portanto, tais anticorpos contra CAPRIN-1 são úteis para tratamento ou prevenção de cânceres.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 mostra os padrões de expressão de genes que codificam proteínas CAPRIN-1 em tecidos normais e linhagens de célula tumoral. Nesta Figura, a referência nº 1 mostra o padrão de expressão de cada gene que codifica CAPRIN-1, e a referência nº 2 mostra o padrão de expressão do gene GAPDH.

A Figura 2 mostra a atividade citotóxica de um anticorpo para CAPRIN-1 (ou anticorpo anti-CAPRIN-1) contra a linhagem da célula do câncer de mama que expressa o gene CAPRIN-1 (T47D). Nesta Figura, a referência nº 3 mostra a atividade após a adição do anticorpo anti-CAPRIN-1, a referência nº 4 mostra a atividade após adição de anticorpo de controle, e a referência nº 5 mostra a atividade na ausência de qualquer anticorpo.

A Figura 3 mostra a atividade citotóxica de um anticorpo para CAPRIN-1 (ou anticorpo anti-CAPRIN-1) contra a linhagem de célula do câncer de mama que expressa o gene CAPRIN-1 (MDA-MB-157). Nesta Figura, a referência nº 6 mostra a atividade após adição do anticorpo anti-CAPRIN-1, a referência nº 7 mostra a atividade após a adição de anticorpo de controle e a referência nº 8 mostra a atividade na ausência de qualquer anticorpo.

A Figura 4 mostra a citotoxicidade contra a linhagem celular MDA-MB-157 de câncer de mama que expressa CAPRIN-1, sendo que a citotoxicidade é exibida pelos anticorpos monoclonais para CAPRIN-1 (isto é, os anticorpos monoclonais nº1 a nº11), que são reativos com a superfície da célula cancerígena. Especificamente, esta Figura mostra os níveis de atividade após a adição do anticorpo monoclonal nº1 a CAPRIN-1 (referência nº 9), do anticorpo monoclonal nº2 a CAPRIN-1 (referência nº 10), do anticorpo monoclonal nº3 a CAPRIN-1 (referência nº 11), do anticorpo monoclonal nº4 a CAPRIN-1 (referência nº 12), do anticorpo monoclonal nº5 a CAPRIN-1 (referência nº 13), do anticorpo monoclonal nº6 a CAPRIN-1 (referência nº 14), do anticorpo monoclonal nº7 a CAPRIN-1 (referência nº 15), do anticorpo monoclonal nº8 a CAPRIN-1 (referência nº 16), do anticorpo monoclonal nº9 a CAPRIN-1 (referência nº 17), do anticorpo monoclonal nº10 a CAPRIN-1 (referência nº 18), e do anticorpo monoclonal nº11 a CAPRIN-1 (referência nº 19), do nível de atividade após a adição de um anticorpo monoclonal reativo com a própria proteína CAPRIN-1, mas não com a superfície da célula cancerígena (referência nº 20), e do nível de atividade após a adição de PBS em vez de cada anticorpo (referência nº 21).

As Figuras 5a a 5c mostram o efeito antitumoral dos anticorpos monoclonais para CAPRIN-1 (isto é, os anticorpos monoclonais nº1 a nº11) reativos com a superfície de uma célula cancerígena, em camundongos Balb/c nos quais o carcinoma de camundongo a linhagem celular CT26 que expressa a CAPRIN-1 foi transplantado. Estas Figuras mostram os tamanhos de tumor de camundongo após a administração do anticorpo monoclonal nº1 em CAPRIN-1 (referência nº 22), do anticorpo monoclonal nº2 em CAPRIN-1 (referência nº 23), do anticorpo monoclonal nº3 em CAPRIN-1 (referência nº 24), do anticorpo monoclonal nº4 em CAPRIN-1 (referência nº 25), do anticorpo monoclonal nº5 em CAPRIN-1 (referência nº 26), do anticorpo monoclonal nº6

em CAPRIN-1 (referência nº 27), do anticorpo monoclonal nº7 em CAPRIN-1 (referência nº 28), do anticorpo monoclonal nº8 em CAPRIN-1 (referência nº 29), do anticorpo monoclonal nº9 em CAPRIN-1 (referência nº 30), do anticorpo monoclonal nº10 em CAPRIN-1 (referência nº 31), e do anticorpo monoclonal nº11 em CAPRIN-1 (referência nº 32), do tamanho de tumor de camundongo após a administração de um anticorpo monoclonal reativo com a própria proteína CAPRIN-1, mas não com a superfície da célula cancerígena (referência nº 33), e o tamanho de tumor de camundongo após a administração de PBS em vez de cada anticorpo (referência nº 34).

As Figuras 6a a 6c mostram o efeito antitumoral de anticorpos monoclonais em CAPRIN-1 (isto é, anticorpos monoclonais nº1 a nº11) reativos com a superfície de uma célula cancerígena, em camundongos Balb/c nos quais a linhagem celular N1E de carcinoma de camundongo que expressa CAPRIN-1 foi transplantada. Estas Figuras mostram os tamanhos de tumor de camundongo após a administração do anticorpo monoclonal nº1 a CAPRIN-1 (referência nº 35), do anticorpo monoclonal nº2 a CAPRIN-1 (referência nº 36), do anticorpo monoclonal nº3 a CAPRIN-1 (referência nº 37), do anticorpo monoclonal nº4 a CAPRIN-1 (referência nº 38), do anticorpo monoclonal nº5 a CAPRIN-1 (referência nº 39), do anticorpo monoclonal nº6 a CAPRIN-1 (referência nº 40), do anticorpo monoclonal nº7 contra CAPRIN-1 (referência nº 41), do anticorpo monoclonal nº8 contra CAPRIN-1 (referência nº 42), do anticorpo monoclonal nº9 contra CAPRIN-1 (referência nº 43), do anticorpo monoclonal nº10 a CAPRIN-1 (referência nº 44), e do anticorpo monoclonal nº11 contra CAPRIN-1 (referência nº 45), o tamanho de tumor de camundongo após a administração de um anticorpo monoclonal reativo com a própria proteína CAPRIN-1, mas não com a superfície da célula cancerígena (referência nº 46), e o tamanho de tumor de camundongo após a administração de PBS em vez de cada anticorpo (referência nº 47).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme descrito abaixo, a atividade antitumoral de anticorpos para o polipeptídeo mostrado em qualquer uma das SEQ ID NOs com números pares: 2 a 30 (isto é, SEQ ID NOs: 2, 4, 6...28 e 30) usadas na presente
5 invenção pode ser avaliada através do exame *in vivo* da inibição de crescimento tumoral em um animal com tumor, ou através do exame *in vitro* para determinar se a atividade citotóxica mediada por complemento ou imunócito contra células tumorais que expressam o polipeptídeo é exibida ou não.

10 Além disso, as sequências de nucleotídeo de polinucleotídeos que codificam as proteínas consistem nas sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID NOs com números pares: 2 a 30 são mostradas nas SEQ ID NOs com números ímpares: 1 a 29 (isto é, SEQ ID NOs: 1, 3, 5...27 e 29), respectivamente.

15 As sequências de aminoácido mostradas nas SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12 e 14 na Listagem de Sequência revelada de acordo com a presente invenção são as sequências de aminoácido das proteínas CPRIN-1, que foram isoladas, através do método SEREX com o uso de bibliotecas de cDNA derivadas de tecido de testículo canino e soros de cães com câncer de mama,
20 como polipeptídeos capazes de se ligar a anticorpos especificamente que existem nos soros de cães com tumor; as sequências de aminoácido mostrada nas SEQ ID NOs: 2 e 4 são as sequências de aminoácido das proteínas CPRIN-1 isoladas como homólogos humanos dos ditos polipeptídeos caninos; a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 16 é a sequência de
25 aminoácido da proteína isolada como um homólogo bovino do dito polipeptídeo canino; a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 18 é a sequência de aminoácido da proteína isolada como um homólogo equino do dito polipeptídeo canino; as sequências de aminoácido mostrada nas SEQ ID NOs

(com números pares): 20 a 28 são as sequências de aminoácido das proteínas CPRIN-1 isoladas como homólogos de camundongos dos ditos polipeptídeos caninos; e a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 30 é a sequência de aminoácido das proteínas isoladas como um homólogo de frango do dito polipeptídeo canino (vide, Exemplo 1 descrito abaixo). A CAPRIN-1 é conhecida por ser expressa quando a ativação ou divisão celular de células normais na fase de repouso ocorre.

Sabe-se que a CAPRIN-1 não é expressa na superfície de células. Entretanto, como um resultado do exame juntamente com a presente invenção, foi revelado agora que certas porções de proteína CAPRIN-1 são expressas nas superfícies de várias células cancerígenas. De acordo com a presente invenção, um anticorpo que se liga a uma porção na proteína CAPRIN-1 expressa em superfícies de célula cancerígena é, de preferência, usado. Os exemplos dos peptídeos parciais na proteína CAPRIN-1 expressa nas superfícies de célula cancerígena incluem polipeptídeos que consistem em uma sequência de 7 ou mais aminoácidos consecutivos na região do resíduo de aminoácido nº (ou aminoácidos (aa)) 50 a 98 ou resíduo de aminoácido nº (aa) 233 a 305 em uma sequência de aminoácido mostrada em qualquer uma dentre as SEQ ID NOs com números pares: 2 a 30, com exceção de SEQ ID NOs: 6 e 18, na Listagem de Sequência. Os exemplos específicos das mesmas incluem a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 37 ou 136 (de preferência, a região da sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 137 ou 138 na sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 136), ou uma sequência de aminoácido que tem 80% ou mais, de preferência, 85% ou mais, com mais preferência, 90% ou mais, e com preferência adicional, 95% ou mais identidade de sequência com as ditas sequências de aminoácido. Os anticorpos da presente invenção incluem todos os anticorpos capazes de se ligar aos peptídeos acima e que têm atividade antitumoral.

Os anticorpos para CAPRIN-1 úteis na presente invenção conforme descrito acima podem ser quaisquer tipos dos mesmos, desde que exibam atividade antitumoral. Os exemplos dos mesmos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos sintéticos, anticorpos multiespecíficos, anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia única (scFV), e fragmentos dos mesmos tais como Fab e F(ab')₂. Estes anticorpos e fragmentos dos mesmos podem ser preparados por métodos conhecidos por elementos versados na técnica. Na presente invenção, os anticorpos capazes de se ligar especificamente a uma proteína CAPRIN-1 são desejáveis. Tais anticorpos são, de preferência, anticorpos monoclonais; entretanto, desde que os anticorpos homogêneos possam ser estavelmente produzidos, os anticorpos policlonais também podem ser usados. Além disso, se o indivíduo for um humano, um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado é desejável com a finalidade de impedir ou inibir a imunorrejeção.

A expressão "que se liga especificamente a uma proteína CAPRIN-1" conforme usado no presente documento significa que um anticorpo de interesse se liga especificamente à proteína CAPRIN-1 e não se liga substancialmente a outras proteínas.

Conforme descrito abaixo, a atividade antitumoral de um anticorpo usado na presente invenção pode ser avaliada através do exame *in vivo* da inibição de crescimento tumoral em um animal com tumor, ou do exame *in vitro* para determinar se a atividade citotóxica mediada por complemento ou imunócito contra células tumorais que expressam o polipeptídeo é exibida ou não.

Além do mais, os indivíduos em necessidade de tratamento e/ou prevenção de câncer de acordo com a presente invenção são mamíferos tais como humanos, animais domésticos, animais de fazenda ou animais

esportistas. O indivíduo preferencial é um humano.

A produção de antígenos, a produção de anticorpos, e as composições farmacêuticas, relacionadas a presente invenção, serão explicadas abaixo.

5 **PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS USADOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPO**

As proteínas ou fragmentos das mesmas usadas como antígenos de sensibilização para obter anticorpos para CAPRIN-1 usados na presente invenção não são limitadas em termos de origens tais como de animais incluindo, por exemplo, humanas, caninas, bovinas, equinas, de camundongos, 10 de ratos e de aves. Entretanto, tais proteínas ou fragmentos das mesmas são, de preferência, selecionadas em vista de compatibilidade com células parentais usadas para fusão celular. As proteínas derivadas de mamífero são geralmente preferenciais e proteínas derivadas de humano são particularmente preferenciais. Por exemplo, se a CAPRIN-1 é CAPRIN-1 humana, uma proteína 15 CAPRIN-1 humana, um peptídeo parcial da mesma, ou células capazes de expressar CAPRIN-1 humana podem ser usadas.

As sequências de nucleotídeo e as sequências de aminoácido de CAPRIN-1 humana e homólogos das mesmas podem ser obtidas, por exemplo, através do acesso ao GenBank (NCBI, EUA) e do uso do algoritmo BLAST ou 20 FASTA (Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA, 90:5873-5877, 1993; Altschul *et al.*, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997).

De acordo com a presente invenção, quando a sequência de nucleotídeo (SEQ ID NO: 1 ou 3) ou a sequência de aminoácido (SEQ ID NO: 2 ou 4) de CAPRIN-1 humana é usada como uma sequência base, os alvos são 25 os ácidos nucléicos ou proteínas que consistem em uma sequência que tem 70% a 100%, de preferência, 80% a 100%, com mais preferência, 90% a 100%, e com preferência adicional, 95% a 100% (por exemplo, 97% a 100%, 98% a 100%, 99% a 100%, ou 99,5% a 100%) de identidade de sequência com

a sequência de nucleotídeo ou a sequência de aminoácido do ORF ou porção madura da sequência base de nucleotídeo ou sequência de aminoácido. O termo "% de identidade de sequência" conforme usado no presente documento significa uma porcentagem (%) do número de aminoácidos idênticos (ou
5 nucleotídeos) para o número total de aminoácidos (ou nucleotídeos) no caso em que as duas sequências são alinhadas de tal modo que a similaridade máxima possa ser alcançada com ou sem a introdução de lacunas.

Os fragmentos de uma proteína CAPRIN-1 têm comprimentos na faixa do comprimento do aminoácido de um epítipo (ou um determinante
10 antigênico), que é a menor unidade de um antígeno reconhecido por um anticorpo, para menos que o comprimento total da proteína. O epítipo se refere a um fragmento de polipeptídeo que tem antigenicidade ou imunogenicidade em mamíferos e, de preferência, em humanos. A menor unidade de fragmento de polipeptídeo consiste em aproximadamente 7 a 12
15 aminoácidos e, por exemplo, 8 a 11 aminoácidos. Um exemplo específico da mesma é a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 137, ou SEQ ID NO: 138, ou uma sequência de aminoácido que tem 80% ou mais, de preferência, 85% ou mais, com mais preferência, 90% ou mais, e com preferência adicional, 95% ou mais de identidade de sequência com a dita
20 sequência de aminoácido.

Os polipeptídeos que compreende a proteína CAPRIN-1 humana supramencionada e os peptídeos parciais da mesma pode, ser sintetizados de acordo com os métodos de síntese química tal como o método Fmoc (método de fluorenilmetiloxycarbonil) ou o método tBoc (método t-butiloxycarbonil) (the
25 Japanese Biochemical Society (ed.), "Biochemical Experimentation Course (*Seikagaku Jikken Koza*) 1," Protein Chemistry IV, Chemical Modification and Peptide Synthesis, Kagaku-dojin Publishing Company, Inc. (Japão), 1981). Ademais, eles podem ser sintetizados por métodos gerais que usam uma

variedade de sintetizadores de polipeptídeo comercialmente disponíveis. Além disso, os polipeptídeos de interesse podem ser obtidos através da preparação de polinucleotídeos que codificam os polipeptídios acima que usam os métodos de engenharia genética conhecidos (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2nd edition, Current Protocols in Molecular Biology (1989), Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3rd edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons, etc.), que incorporam cada um dos polinucleotídeos em um vetor de expressão e introduzem o vetor em uma célula hospedeira, permitindo assim que a célula hospedeira produza o polipeptídeo. Através disto, os polipeptídeos desejados podem ser obtidos.

Os polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos supramencionados podem ser prontamente preparados por técnicas de engenharia genética conhecidas ou métodos gerais que usam sintetizadores de ácido nucléico comercialmente disponíveis. Por exemplo, o DNA que compreende a sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1 pode ser preparado por PCR com o uso de uma biblioteca de DNA ou cDNA de cromossomo humano como um modelo e um par de iniciadores projetados para permitir a amplificação da sequência de nucleotídeo mostrada na SEQ ID NO: 1. As condições de PCR podem ser apropriadamente determinadas. Por exemplo, tais condições podem compreender a condução de 30 ciclos das etapas de reação (como um ciclo) que consistem em: 94°C, 30 segundos (desnaturação); 55°C, 30 segundos a 1 minuto (recozimento); e 72°C, 2 minutos (alongamento) com o uso de uma polimerase de DNA termoestável (por exemplo, polimerase Taq) e um tampão de PCR que contém Mg^{2+} , seguido da reação a 72°C por 7 minutos após a conclusão dos 30 ciclos. Entretanto, a presente invenção não está limitada às condições de PCR exemplificadas acima. As técnicas e as condições de PCR são descritas, por

exemplo, em Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, 3rd edition, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology (1995), John Wiley & Sons (Capítulo 15, em particular).

Além disso, o DNA desejado pode ser isolado através da
 5 preparação de sondas e iniciadores apropriados com na informação sobre as
 sequências de aminoácido e nucleotídeo mostradas nas SEQ ID NOs: 1 a 30
 na Listagem de Sequência descrita no presente documento, e da triagem de
 um biblioteca de cDNA humano ou similares com o uso de tais sondas e
 iniciadores. De preferência, tal biblioteca de cDNA é produzida a partir de uma
 10 célula, órgão ou tecido no qual a proteína com qualquer uma das SEQ ID NOs
 com números pares: 2 a 30 é expressa. Os exemplos de célula ou tecido
 incluem células ou tecidos de testículos e de cânceres ou tumores, tais como
 leucemia, câncer de mama, linfoma, tumor cerebral, câncer de pulmão e câncer
 de cólon. As operações tais como a preparação de sondas ou iniciadores,
 15 construção de bibliotecas de cDNA, triagem de bibliotecas de cDNA, e
 clonagem de genes de interesse, conforme descrito acima, são conhecidas
 pelos elementos versados na técnica, e podem ser executadas de acordo com,
 por exemplo, os métodos descritos em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, 2nd
 edition, Current Protocols in Molecular Biology (1989) and Ausbel *et al.* (*ibid.*).
 20 Os DNAs que codificam proteína CAPRIN-1 humana e os peptídeos parciais da
 mesma podem ser obtidos a partir DNAs obtidos dessa forma.

As células hospedeiras descritas acima podem ser quaisquer
 células, desde que possam expressar os polipeptídeos descritos acima. Um
 exemplo de célula hospedeira procariótica inclui, mas não se limita a,
 25 *Escherichia coli*. Os exemplos de células hospedeiras eucarióticas incluem,
 mas não se limitam a, células de mamífero tais como célula de rim de macaco
 (COS1), célula do ovário de hamster chinês (CHO), linhagem celular de rim de
 embrião humano (HEK293), e linhagem celular de pelo de embrião de

camundongo (NIH3T3), células de levedura tais como levedura germinante e células de levedura divisoras, células de bicho-da-seda e células de ovo *Xenopus*.

Quando as células procarióticas são usadas como células hospedeiras, um vetor de expressão que tem uma origem replicável em células procarióticas, um promotor, um sítio de ligação a ribossomo, um sítio multiclonagem, um terminante, um gene de resistência à droga, um gene complementar auxotrófico ou similares podem ser usados. Como vetores de expressão para *Escherichia coli*, os vetores pUC, pBluescriptII, sistemas de expressão pET, sistemas de expressão pGEX, e similares podem ser exemplificados. Um DNA que codifica o polipeptídeo acima é incorporado em tal vetor de expressão, uma célula hospedeira procariótica é transformada com o vetor e, então, a célula transformada obtida dessa forma é cultivada, de modo que o polipeptídeo codificada pelo DNA possa ser expresso na célula hospedeira procariótica. Neste instante, o polipeptídeo também pode ser expresso como uma proteína de fusão com outra proteína.

Quando células eucarióticas são usadas como células hospedeiras, vetores de expressão para células eucarióticas que têm um promotor, uma região de divisão, a poli(A) adição site, ou similares podem ser usados. Os exemplos de tais vetores de expressão incluem pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, vetor EBV, pRS, pcDNA3 e pYES2. Através de procedimentos similares àqueles mencionados acima, um DNA que codifica o polipeptídeo supramencionado é incorporado em tal vetor de expressão, uma célula hospedeira eucariótica é transformada com o vetor e, então, a célula transformada obtida dessa forma é cultivada, de modo que o polipeptídeo codificado pelo DNA acima possa ser expresso na célula hospedeira eucariótica. Quando pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, pEGFP-C1 ou similares é usado como um vetor de expressão, o polipeptídeo

acima pode ser expresso como uma proteína de fusão com um etiqueta, tal como etiqueta His (por exemplo, (His)₆ a (His)₁₀), etiqueta FLAG, etiqueta myc, etiqueta HA ou GFP.

Para introdução de um vetor de expressão em uma célula hospedeira, métodos conhecidos podem ser empregados, tal como eletroporação, um método de fosfato de cálcio, um método de lipossomo, um método de dextran DEAE, micro-injeção, infecção viral, lipofecção e ligação com um peptídeo permeável em membrana celular.

O isolamento e a purificação de um polipeptídeo de interesse de células hospedeiras podem ser executados com o uso de técnicas de isolamento conhecidas em combinação. Os exemplos de tais técnicas conhecidas incluem, mas não se limitam a, tratamento com o uso de um agente desnaturante tal como uréia ou um tensoativo, ultrassonicação, digestão enzimática, salinização, fracionamento e precipitação de solvente, diálise, centrifugação, ultrafiltração, filtração a gel, SDS-PAGE, eletroforese com foco isoelétrico, cromatografia com troca de íon, cromatografia hidrofóbica, cromatografia por afinidade e cromatografia de fase reversa.

ESTRUTURA DE ANTICORPO

Em geral, os anticorpos são glicoproteínas heteromultiméricas que compreendem pelo menos duas cadeias pesadas e duas cadeias leves. Nesse ínterim, os anticorpos exceto para IgM são glicoproteínas heterotetraméricas (aproximadamente, 150 kDa) que compreendem duas cadeias leves idênticas (L) e duas cadeias pesadas idênticas (H). Tipicamente, cada cadeia leve é conectada a uma cadeia pesada através de uma única ligação de dissulfeto covalente. Entretanto, o número de ligações de dissulfeto entre cadeias pesadas varia dentre diferentes isotipos de imunoglobulina. Cada cadeia pesada e cadeia leve também tem uma ligação de dissulfeto intracadeia. Cada cadeia pesada tem um domínio variável (região VH) em uma

extremidade da mesma, na qual algumas regiões constantes são ligadas em série. Cada cadeia leve tem um domínio variável (região VL) em uma extremidade da mesma e tem uma única região constante na extremidade oposta da mesma. A região constante de uma cadeia leve é alinhada com a primeira região constante de uma cadeia pesada e o domínio variável de cadeia leve é alinhado com o domínio variável de cadeia pesada. Uma região específica de um domínio variável de anticorpo, que é chamada de "região determinante complementar (CDR)" exibe variabilidade específica com a finalidade de conferir especificidade de ligação a um anticorpo. Uma porção relativamente conservada em uma região variável é chamada de "região estrutural (FR)". Um domínio variável de cadeia pesada ou de cadeia leve completo compreende 4 FRs conectados entre si através de 3 CDRs. Tais CDRs são chamados de "CDRH1," "CDRH2", e "CDRH3", respectivamente, em tal ordem a partir da terminação N em uma cadeia pesada. Similarmente para uma cadeia leve, eles são chamados "CDRL1," "CDRL2", e "CDRL3", respectivamente. O CDRH3 desempenha o papel mais importante em termos de especificidade de ligação de anticorpo-antígeno. Além disso, os CDRs em cada cadeia são retidos por regiões FR no estado em que elas estão próximas entre si, e contribuem para a formação de sítios de ligação de anticorpo-antígeno com CDRs em uma cadeia correspondente. As regiões constantes não contribuem diretamente com a ligação anticorpo-antígeno. Entretanto, eles exibem várias funções efetoras como a associação à citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC), fagocitose através da ligação com um receptor Fcγ, taxa de meia-vida/resolução por meio de um receptor Fc neonatal (FcRn), e citotoxicidade dependente de complemento (CDC) por meio de um componente C1q na cascata complemento.

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

O termo "anticorpo anti-CAPRIN-1" usado na presente invenção

refere-se a um anticorpo que tem uma reatividade imunológica com uma proteína CAPRIN-1 de tamanho normal ou um fragmento da mesma.

O termo "reatividade imunológica" usado na presente invenção indica as características de uma ligação de anticorpo *in vivo* a um antígeno de CAPRIN-1. A função de danificação do tumor (por exemplo, morte, inibição, ou regressão) pode ser expressa como um resultado dessa ligação. Especificamente, qualquer tipo de anticorpo pode ser usado na presente invenção contanto que o anticorpo possa se ligar a uma proteína CAPRIN-1 para danificar um tumor ou um câncer como leucemia, linfoma, câncer de mama, tumor cerebral, câncer de pulmão, câncer esofágico, câncer gástrico, câncer dos rins, ou câncer de cólon.

Exemplos desses anticorpos incluem anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos sintéticos, anticorpos multiespecíficos, anticorpos de ser humano, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos, anticorpos de cadeia única, e fragmentos de anticorpo (por exemplo, Fab e $F(ab')_2$). Além disso, exemplos de classes de imunoglobulina arbitrárias desses anticorpos incluem IgG, IgE, IgM, IgA, IgD, e IgY, e exemplos de subclasses de imunoglobulina arbitrárias incluem IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, e IgA2.

Os anticorpos podem ser adicionalmente modificados por meio de acetilação, formilação, amidação, fosforilação, ou peguilação (PEG), em adição à glicosilação.

Exemplos de produção para uma variedade de anticorpos são descritos a seguir.

Em um caso em que um anticorpo de interesse é um anticorpo monoclonal, uma linhagem de células SK-BR-3 de câncer de mama que expressa CAPRIN-1 ou similares é administrada a camundongos para a imunização, seguido da extração do baço dos camundongos. As células são separadas de cada baço e, então, são fundidas com as células de mieloma de

camundongo. Os clones capazes de produzir um anticorpo tendo uma ação de inibição de crescimento de célula de câncer são selecionados a partir das células fundidas obtidas (hibridomas). Um hibridoma de produção de anticorpo monoclonal que tem uma ação de inibição de crescimento de célula de câncer
5 é isolado e submetido à cultura. Um anticorpo de interesse pode ser preparado por meio da purificação do sobrenadante de cultura através de um método de purificação por afinidade em geral.

Além disso, um hibridoma de produção de anticorpo monoclonal pode ser produzido da maneira descrita abaixo, por exemplo. Primeiramente,
10 um animal é imunizado com um antígeno sensibilizante através de um método conhecido. Em um método em geral, a imunização é executada mediante a injeção intraperitoneal ou subcutânea de um antígeno sensibilizante em um mamífero. Especificamente, um antígeno sensibilizante é diluído com, ou suspenso em PBS (solução salina tamponada com fosfato), solução salina
15 fisiológica, ou similares com uma quantidade resultante adequada. Caso seja desejado, uma quantidade adequada de um adjuvante convencional (por exemplo, adjuvante completo de Freund) é misturada com isto. Após a realização da emulsificação, o resultante é administrado a um mamífero várias vezes a cada 4 a 21 dias. Além disso, um carreador apropriado pode ser usado
20 para a imunização com um antígeno sensibilizante.

Conforme descrito acima, após a imunização de um mamífero e a confirmação de um aumento a um nível de anticorpo desejado em soro, imunócitos são coletados do mamífero e submetidos à fusão celular. Particularmente, os exemplos preferenciais de imunócitos são o esplenócitos.

25 As células de mieloma de mamífero são usadas como células-mãe relevantes submetidas à fusão com os imunócitos acima. Para essas células de mieloma, os vários exemplos a seguir de linhagens celulares conhecidas são usados de preferência: P3U1 (P3-X63Ag8U1), P3

(P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123, 1548 a 1550), P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1 a 7), NS-1 (Kohler. G. e Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976). 6, 511 a 519), MPC-11 (Margulies. d. H. *et al.*, Cell (1976) 8, 405 a 415), SP2/0 (Shulman, M. *et al.*, Nature (1978) 276, 269 e 270), FO (de St. Groth, S. F. *et al.*, J. Immunol. Methods (1980) 35, 1 a 21), S194 (Trowbridge, I. 58. J. Exp. Med. (1978) 148, 313 a 323), e R210 (Galfre, G. *et al.*, Nature (1979) 277, 131 a 133).

Basicamente, a fusão celular de imunócitos e de células de mieloma descrita acima pode ser executada de acordo com um método conhecido como o método de Kohler e Milstein *et al.* (Kohler, G. e Milstein, C. Methods Enzymol. (1981) 73, 3 a 46).

Mais especificamente, a fusão celular descrita acima é executada na presença de um promotor de fusão celular em uma solução de cultura contendo nutrientes convencionais, por exemplo. Exemplos de um promotor de fusão para ser usado incluem polietileno glicol ("peg") e vírus Sendai (HVJ: vírus hemaglutinante do Japão). Caso seja desejado, um adjuvante como dimetilsulfoxida pode ser, adicionalmente, adicionado para aprimorar a eficiência de fusão.

A proporção de imunócitos usada nessas células de mieloma usadas pode ser determinada arbitrariamente. Por exemplo, a razão entre os imunócitos em relação às células de mieloma é, de preferência, 1:1 a 10:1. Exemplos de uma solução de cultura que pode ser usada na fusão celular descrita acima incluem uma solução de cultura RPMI1640 e uma solução de cultura MEM adequada para o crescimento das linhagens celulares de mieloma acima bem como outras soluções de cultura convencionais usadas para esse tipo de cultura celular. Adicionalmente, uma substituição de soro, como um soro fetal de bezerro (FCS), pode ser usada em combinação a isso.

Para a fusão celular, os imunócitos acima e as células de mieloma

são suficientemente misturados em quantidades predeterminadas na solução de cultura. Uma solução PEG (por exemplo, com peso molecular médio: aproximadamente 1000 a 6000) que foi aquecida previamente para aproximadamente 37°C é adicionada a isso a uma concentração de, em geral, 30% a 60% (w/v), seguido de mistura. Isto resulta na formação de hibridomas de interesse. Subsequentemente, etapas operacionais de adição sequencial de uma solução de cultura adequada e a remoção do sobrenadante por meio de centrifugação são executadas repetidamente para remover o(s) agente(s) de fusão celular e similares que não são preferenciais para o crescimento dos hibridomas.

Os hibridomas obtidos dessa maneira são submetidos à cultura em uma solução de cultura de seleção convencional como uma solução de cultura HAT (uma solução de cultura que compreende hipoxantina, aminopterina, e timidina) para seleção. A cultura nessa solução de cultura HAT é continuamente executada durante um período de tempo suficiente (em geral, de vários dias a várias semanas) para a morte das células (células não fundidas) além dos hibridomas de interesse. Em seguida, um método de diluição limitador convencional é empregado para triar os hibridomas que produzem anticorpos de interesse e para executar uma clonagem única.

Adicionalmente, também é possível obter hibridomas de produzem anticorpo de ser humano tendo uma atividade desejada (por exemplo, atividade de inibição de crescimento celular) da maneira a seguir, assim como obter os hibridomas acima por meio da imunização de animais não-humanos com antígenos. Os linfócitos de ser humano (por exemplo, linfócitos de ser humano infectados pelo vírus EB) são sensibilizados *in vitro* com uma proteína, células que expressam proteína, ou um lisado dos mesmos, e linfócitos sensibilizados são fundidos com células de mieloma derivadas de ser humano que têm a capacidade de se dividir permanentemente (por

exemplo, U266) (nº de registro TIB196).

Os hibridomas de produção de anticorpo monoclonal produzidos conforme mencionado acima podem ser subcultivados em uma solução de cultura convencional. Além disso, eles podem ser conservados em nitrogênio líquido durante um longo período de tempo.

Especificamente, a imunização é executada com o uso de um antígeno desejado ou células que expressam um antígeno desejado, como antígeno(s) sensibilizante(s) de acordo com um método de imunização convencional. Os imunócitos obtidos são fundidos com células mãe conhecidas através de um método de fusão celular convencional. Então, as células de produção de anticorpo monoclonal (hibridomas) são triadas por meio de um método de triagem convencional. Dessa forma, a produção de anticorpos pode ser executada.

Outros exemplos de anticorpos que podem ser usados na presente invenção incluem anticorpos policlonais. Por exemplo, os anticorpos policlonais podem ser usados da maneira descrita abaixo.

O soro é obtido mediante a imunização de pequenos animais como camundongos, camundongos para a produção de anticorpo de ser humano, ou coelhos com uma proteína CAPRIN-1 de ocorrência natural, uma proteína CAPRIN-1 recombinante que foi expressa como uma proteína fundida com GST ou similares em um microorganismo como *Escherichia coli*, ou um peptídeo parcial do mesmo. O soro é purificado através de uma precipitação de sulfato de amônio, cromatografia em coluna de proteína A/proteína G, cromatografia por troca iônica DEAE, cromatografia em coluna por afinidade com uma coluna à qual uma proteína CAPRIN-1 ou um peptídeo sintético é acoplado, ou uma técnica similar para a preparação de anticorpos policlonais. Nos exemplos descritos a seguir, um anticorpo policlonal de coelho foi produzido, e efeitos antitumorais do mesmo foram confirmados, como um

anticorpo estando contra um peptídeo parcial (com a sequência mostrada na SEQ ID NO: 37) de um domínio em uma sequência de aminoácidos de proteína CAPRIN-1 que é expressa nas superfícies de célula de câncer.

Um camundongo para a produção de anticorpo de ser humano conhecido usado na presente invenção, por exemplo, é um KM Mouse (Kirin Pharma/Medarex) ou um XenoMouse (Amgen) (por exemplo, WO02/43478 e WO02/092812). Quando esses camundongos são imunizados com as proteínas CAPRIN-1 ou fragmentos da mesma, os anticorpos policlonais de ser humano completos podem ser obtidos a partir do sangue. Além disso, os anticorpos monoclonais de ser humano podem ser produzidos por meio de um método de fusão de esplenócitos coletados junto a camundongos imunizados com células de mieloma.

A preparação de antígeno pode ser executada de acordo com um método como um método no qual se faz uso de células animais (Publicação de Patente JP (Kohyo) nº 2007-530068) ou um método que faz uso de um baculovírus (por exemplo, WO98/46777). Se a imunogenicidade de um antígeno for baixa, um antígeno será ligado a uma macromolécula tendo imunogenicidade, como a albumina. Então, o antígeno pode ser usado na imunização.

Adicionalmente, é possível usar um anticorpo recombinante genético produzido mediante a clonagem de um gene de anticorpo a partir de um hibridoma, incorporando o clone em um vetor adequado, introduzindo o vetor em um hospedeiro, e usando uma técnica de recombinante genético. (Consulte, por exemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado no Reino Unido pela MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990.) Especificamente, o cDNA de uma região variável (região V) de um anticorpo é sintetizado do mRNA de um hibridoma com o uso de uma transcriptase reversa. Após a obtenção de um

DNA que codifica uma região V de um anticorpo de interesse, esse DNA é ligado ao DNA desejado que codifica uma região constante de anticorpo (região C). O resultante é incorporado em um vetor de expressão. Alternativamente, o DNA que codifica uma região V de anticorpo pode ser
5 incorporado a um vetor de expressão que compreende o DNA de uma região C de anticorpo. Esse DNA é incorporado em um vetor de expressão de uma maneira tal que ele é expresso sob controle de uma região de controle de expressão como um intensificador ou um promotor. Em seguida, as células hospedeiras são transformadas com esse vetor de expressão, permitindo por
10 meio disso que o anticorpo seja expresso.

Os anticorpos anti-CAPRIN-1 da presente invenção são, de preferência, anticorpos monoclonais. Entretanto, eles podem ser anticorpos policlonais, anticorpos modificados por gene (como anticorpos quiméricos e anticorpos humanizados), e similares.

15 Os anticorpos monoclonais incluem anticorpos monoclonais de ser humano e anticorpos monoclonais de animal não humano (por exemplo, anticorpos monoclonais de camundongo, anticorpos monoclonais de rato, anticorpos monoclonais de coelho, e anticorpos monoclonais de galinha). Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos mediante a cultura de
20 hibridomas obtidos por meio da fusão de células de mieloma e esplenócitos dos mamíferos não humanos (por exemplo, camundongos ou camundongos para a produção de anticorpo de ser humano) imunizados com as proteínas CAPRIN-1. Nos exemplos descritos a seguir, os anticorpos monoclonais de camundongo foram produzidos e os efeitos antitumorais dos mesmos foram
25 confirmados. Esse anticorpo monoclonal compreende uma região (VH) variável de cadeia pesada que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 113, ou SEQ ID NO: 123 e uma região (VL) variável de cadeia

leve que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117, ou SEQ ID NO: 127. Aqui, a região VH compreende: CDR1 representado pela

5 sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 90, SEQ. ID Nº: 100, SEQ ID NO: 110, ou SEQ ID NO: 120; CDR2 representado pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 111, ou SEQ ID NO: 121; e CDR3 representado pela sequência de aminoácidos da

10 SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 112, ou SEQ ID NO: 122. A região VL compreende: CDR1 representado pela sequência de aminoácidos da SEQ-ID NO: 44, SEQ-ID NO: 50, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 114, ou SEQ ID NO: 124; CDR2 representado pela sequência de aminoácidos da SEQ ID NO: 45,

15 SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 115, ou SEQ ID NO: 125; e CDR3 representado pela sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 116, ou SEQ ID NO: 126.

20

Um anticorpo quimérico é um anticorpo produzido pela combinação de sequências de diferentes animais. Um exemplo do mesmo é um anticorpo que consiste em regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia

25 pesada de anticorpo de camundongo e regiões constantes de cadeia leve e cadeia pesada de anticorpo de ser humano. Esse anticorpo quimérico pode ser produzido por meio de um método conhecido. Por exemplo, ele pode ser obtido mediante a ligação de um DNA que codifica uma região V de anticorpo a um

DNA que codifica uma região C de anticorpo de ser humano, incorporando o resultante a um vetor de expressão, e introduzindo o vetor a um hospedeiro para a produção de anticorpos.

Os anticorpos policlonais incluem anticorpos obtidos mediante a
5 imunização de animais que produzem anticorpo de ser humano (por exemplo, camundongos) com as proteínas CAPRIN-1.

Um anticorpo humanizado é um anticorpo modificado, e ele é, às vezes, chamado de "anticorpo de ser humano reconformado". Sabe-se que um anticorpo humanizado é construído mediante o transplante das CDRs de um
10 anticorpo derivado de animal imunizado para regiões que determinam a complementaridade de um anticorpo de ser humano. Além disso, uma técnica de recombinante genético geral então é conhecida.

Especificamente, uma sequência de DNA determinada de maneira a permitir que o anticorpo de camundongo CDRs seja ligado às
15 regiões de estrutura de anticorpo de ser humano (FRs) é sintetizada pelo método PCR com o uso de vários oligonucleotídeos preparados de tal maneira que os oligonucleotídeos tenham porções que se sobreponham entre si em uma extremidade de cada um dos mesmos. Um anticorpo humanizado pode ser obtido mediante a ligação do DNA obtido acima ao DNA que codifica uma
20 região constante de anticorpo de ser humano, incorporando o resultante a um vetor de expressão, e introduzindo o vetor em um hospedeiro para a produção de anticorpos (consulte os documentos EP-A-239400 e WO96/02576). As FRs de anticorpo de ser humano ligadas entre si por meio de CDRs são selecionadas presumindo-se que regiões determinantes de complementaridade
25 podem formar um sítio de ligação de antígeno satisfatório. Se necessário, os aminoácidos nas regiões de estrutura de uma região variável de anticorpo podem ser substituídos de uma maneira que regiões determinantes de complementaridade em um anticorpo de ser humano reconformado formem um

sítio de ligação de antígeno adequado (Sato K. *et al.*, Cancer Research 1993, 53: 851 a 856). Além disso, as regiões de estrutura podem ser substituídas por regiões de estrutura a partir de um anticorpo de ser humano diferente (consulte o documento WO99/51743).

5 As regiões de estrutura de anticorpo de ser humano ligadas entre si através de CDRs são selecionadas presumindo-se que as regiões determinantes de complementaridade podem formar sítios de ligação de antígeno satisfatórios. Se necessário, os aminoácidos nas regiões de estrutura de uma região variável de anticorpo podem ser substituídos de tal maneira que
10 as regiões determinantes de complementariedade em anticorpo de ser humano reconformado formem sítios de ligação de antígeno adequados (Sato K. *et al.*, Cancer Research 1993, 53: 851 a 856).

 Após a produção de um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado, os aminoácidos em uma região variável (por exemplo, FR) ou
15 uma região constante podem ser substituídos, por exemplo, por diferentes aminoácidos.

 Aqui, a substituição de aminoácido é uma substituição, por exemplo, menor que 15, menor que 10, de não mais de 8, não mais de 7, não mais de 6, não mais de 5, não mais de 4, não mais de 3, ou não mais que 2
20 aminoácidos, de preferência de 1 a 5 aminoácidos, e com mais preferência 1 ou 2 aminoácidos. Um anticorpo substituído deve ser funcionalmente equivalente a um anticorpo não-substituído. A substituição é, de preferência, uma substituição de aminoácido conservadora, que é uma substituição entre os aminoácidos que têm características similares em termos de carga, cadeias
25 laterais, polaridade, aromaticidade, e similares. Por exemplo, aminoácidos caracteristicamente similares podem ser classificados de acordo com os seguintes tipos: aminoácidos básicos (arginina, lisina, e histidina); aminoácidos ácidos (ácido aspártico e ácido glutâmico); aminoácidos polares não

carregados (glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, cisteína, e tirosina); aminoácidos não polares (leucina, isoleucina, alanina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano, e metionina); aminoácidos de cadeia ramificada (treonina, valina, isoleucina); e aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina, 5 triptofano, e histidina).

Um exemplo de um modificador de anticorpo é um anticorpo ligado a uma molécula como polietileno glicol ("peg"). Com relação aos modificadores de anticorpo da presente invenção, as substâncias que se ligam a um anticorpo não são limitadas. Esse modificador de anticorpo pode ser 10 obtido mediante a modificação química de um anticorpo obtido. Um método dessa modificação já foi estabelecido no campo relacionado a presente invenção.

A expressão "funcionalmente equivalentes" usada na presente invenção indica uma situação em que um anticorpo de interesse tem uma 15 atividade biológica ou bioquímica similar a de um anticorpo da presente invenção. Especificamente, esse anticorpo tem uma função de danificar tumores e causar essencialmente nenhuma reação de rejeição quando aplicado a seres humanos. Um exemplo dessa atividade é a atividade de inibição do crescimento ou da atividade de ligação da célula.

20 Um método conhecido para preparar um polipeptídeo funcionalmente equivalente a um dado polipeptídeo que é bem conhecido dos versado na técnica é um método que compreende introduzir uma mutação em um polipeptídeo. Por exemplo, um versado na técnica pode introduzir adequadamente uma mutação em um anticorpo da presente invenção com o 25 uso de um método de mutagênese em sítio específico (Hashimoto-Gotoh, T. *et al.*, (1995) *Gene* 152, 271 a 275; Zoller, MJ., e Smith, M. (1983) *Methods Enzymol.* 100, 468 a 500; Kramer, W. *et al.*, (1984) *Nucleic Acids Res.* 12, 9441 a 9456; Kramer, W. e Fritz, HJ., (1987) *Methods Enzymol.* 154, 350 a 367;

Kunkel, TA., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 488 a 492; ou Kunkel (1988) Methods Enzymol. 85, 2763 a 2766) ou um método similar. Dessa forma, uma funcionalidade de anticorpo equivalente ao anticorpo da presente invenção pode ser preparada.

5 Um anticorpo supracitado capaz de reconhecer um epítopo de uma proteína CAPRIN-1 reconhecida por um anticorpo anti-CAPRIN-1 pode ser obtido através de um método conhecido pelos versados na técnica. Por exemplo, ele pode ser obtida através de: um método que compreende determinar um epítopo de uma proteína CAPRIN-1 reconhecida por um
10 anticorpo anti-CAPRIN-1 através de um método geral (por exemplo, mapeamento de epítopo) e produzir um anticorpo com o uso de um polipeptídeo que tem uma sequência de aminoácidos contida no epítopo como um imunógeno; ou um método que compreende determinar um epítopo de um anticorpo produzido através de um método geral e selecionar um anticorpo que
15 tem um epítopo idêntico a um epítopo de um anticorpo anti-CAPRIN-1. Aqui, o termo "epítopo" refere-se a um fragmento de polipeptídeo que tem antigenicidade ou imunogenicidade em mamíferos e, de preferência, em seres humanos. A menor unidade do mesmo consiste de aproximadamente 7 a 12 aminoácidos e, de preferência, 8 a 11 aminoácidos.

20 A constante de afinidade K_a (k_{on}/k_{off}) de um anticorpo da presente invenção é, de preferência, de pelo menos $10^7 M^{-1}$, pelo menos $10^8 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^8 M^{-1}$, pelo menos $10^9 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, pelo menos $10^{10} M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^{10} M^{-1}$, pelo menos $10^{11} M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^{11} M^{-1}$, pelo menos $10^{12} M^{-1}$, ou pelo menos $10^{13} M^{-1}$.

25 Um anticorpo da presente invenção pode ser conjugado com um agente antitumoral. A ligação entre um anticorpo e um agente antitumoral pode ser executada através de um espaçador que tem um grupo reativo a um grupo amino, um grupo carboxila, um grupo hidróxi, um grupo tiol, ou similares (por

exemplo, um grupo succinato de imidila, um grupo formila, um grupo 2-piridilditio, um grupo maleimidila, um grupo alcóxicarbonila, ou um grupo hidróxi).

Os exemplos de agente anti-tumor incluem o seguinte agente anti-

- 5 tumor conhecidos em referências ou similares: paclitaxel, doxorubicina, daunorubicina, ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil, tiotepa, busulfano, improsulfano, piposulfano, benzodopa, carboquone, meturedopa, uredopa, altretamina, trietilenemelamina, trietilenefosforamida, trietilenetiofosforamida, trimetilolomelamina, bulatacina, bulatacinona, camptotecina, briostatina,
- 10 calistatina, criptoficina 1, criptoficina 8, dolastatina, duocarmicina, eleuterobina, pancratistatina, sarcodictina, espongistatina, clorambucila, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, cloridrato de óxido de mecloretamina, melfalano, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostarda de uracila, carmustina, clorozotocina, fotemustina,
- 15 lomustina, nimustina, ranimustina, caliqueamicina, dinemicina, clodronato, esperamicina, aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicina, cactinomicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, detorbicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, ADRIAMICINA, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicina C, ácido
- 20 micofenólico, nogalamicina, olivomicina, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimexa, zinostatina, zorubicina, denopterina, pteropterina, trimetrexato, fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina, ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina,
- 25 floxuridina, andrógenos como calusterona, propionato de dromostanolona, epitiostanol, mepitiostanol, testolactona, aminoglutetimida, mitotana, trilostana, ácido frolínico, aceglatona, glicosídeo de aldofosfamida, ácido aminolevulínico, eniluracil, amsacrina, bestrabucil, bisantreno, edatraxato, defofamina,

demecolcina, diaziquona, elfornitina, acetato de eliptínio, epotilona, etoglucid, lentinano, lonidamina, maitansina, ansamitocina, mitoguazona, mitoxantrona, mopidanmol, nitraerina, pentostatina, phenamet, pirarubicina, losoxantrona, ácido podofilínico, 2-etilhidrazida, procarbazona, razoxana, rizoxina, 5 esquizofilano, espirogermânio, ácido tenuazônico, triaziquona, roridina A, anguidina, uretano, vindesina, dacarbazina, manomustina, mitobronitol, mitolactol, pipobromano, gacitosina, docetaxel, clorambucil, gemcitabina, 6-tioguanina, mercaptopurina, cisplatina, oxaliplatina, carboplatina, vinblastina, etoposídeo, ifosfamida, mitoxantrona, vincristina, vinorelbina, novantrona, 10 teniposídeo, edatrexato, daunomicina, aminopterina, xeloda, ibandronato, irinotecan, inibidor de topoisomerase, difluorometilornitina (DMFO), ácido retinóico, capecitabina e sais farmacologicamente aceitáveis ou derivados dos mesmos.

Alternativamente, também é possível ligar um isótopo radioativo, 15 como ^{211}At , ^{131}I , ^{125}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{153}Sm , ^{212}Bi , ^{32}P , ^{175}Lu , ou ^{176}Lu conhecidos em referências e similares a um anticorpo da presente invenção. É desejável que tais isótopos radioativos sejam eficazes para tratamento ou diagnóstico de tumores.

Um anticorpo da presente invenção é um anticorpo que tem uma 20 reatividade imunológica com CAPRIN-1 ou um anticorpo capaz de reconhecer especificamente CAPRIN-1. Tal anticorpo deve ser um anticorpo que tem uma estrutura que permite que um animal em questão, ao qual o anticorpo é administrado, impeça completa ou quase completamente uma reação de rejeição. Se o animal em questão é um ser humano, os exemplos dos 25 anticorpos acima incluem anticorpos humanos, anticorpos humanizados, anticorpos quiméricos (por exemplo, anticorpos quiméricos humano-camundongo), anticorpos de cadeia única e anticorpos biespecíficos. Tal anticorpo é um anticorpo recombinante que tem regiões variáveis de cadeia

pesada e cadeia leve derivadas de anticorpo humano, um anticorpo recombinante que tem regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve, sendo que cada uma consiste em regiões determinantes de complementaridade derivadas de anticorpo animal não-humano (CDR1, CDR2, e CDR3) e regiões de estrutura derivadas de anticorpo humano, ou um anticorpo recombinante que tem regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve derivadas de anticorpo animal não-humano e regiões constantes de cadeia pesada e cadeia leve derivadas de anticorpo humano. Os primeiros dois anticorpos são preferenciais.

O anticorpo recombinante acima pode ser produzido da maneira descrita abaixo. O DNA que codifica um anticorpo monoclonal contra CAPRIN-1 humana (por exemplo, um anticorpo monoclonal humano, um anticorpo monoclonal de camundongo, um anticorpo monoclonal de rato, um anticorpo monoclonal de coelho, ou um anticorpo monoclonal de frango) é clonado a partir de uma célula produtora de anticorpo, como um hibridoma. Os DNAs que codificam uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada do anticorpo são produzidos por um método RT-PCR ou similares com o uso do clone obtido como um modelo. Então, as sequências de uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada ou as sequências de CDR1, CDR2, e CDR3 são determinadas pelo sistema de numeração Kabat EU (Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Edição, Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)).

Ademais, tais DNAs que codificam regiões variáveis ou DNAs que codificam CDRs são produzidos por uma técnica recombinante de gene (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) ou um Sintetizador de DNA. Aqui, o hibridoma produtor de anticorpo monoclonal humano acima pode ser produzido através

da imunização de um animal produtor de anticorpo humano (por exemplo, um camundongo) com CAPRIN-1 humano e através da fusão de esplenócitos a partir do baço removido do animal com células de mieloma. Além do já mencionado, se necessário, os DNAs que codificam regiões variáveis e regiões

5 constantes de cadeia pesada ou cadeia leve derivadas de anticorpo humano são produzidos através de uma técnica recombinante de gene ou um sintetizador de DNA.

No caso de um anticorpo humanizado, é produzido o DNA no qual as sequências de codificação de CDR em um DNA que codifica uma região

10 variável de cadeia pesada ou de cadeia leve derivada de anticorpo humano foram substituídas por sequências correspondentes de codificação de CDR de um anticorpo proveniente de animal não-humano –(por exemplo, –um camundongo, um rato ou um frango). O DNA obtido, com forme mencionado acima, é ligado ao DNA que codifica uma região constante de uma cadeia

15 pesada e cadeia leve derivada de anticorpo humano. Portanto, o DNA que codifica um anticorpo humanizado pode ser produzido.

No caso de um anticorpo quimérico, o DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada e de cadeia leve de anticorpo proveniente de animal não-humano (por exemplo, um camundongo, um rato, ou um frango) é

20 ligado ao DNA que codifica uma região constante de cadeia pesada ou de cadeia leve derivada de anticorpo humano. Portanto, o DNA que codifica um anticorpo quimérico pode ser produzido.

Um anticorpo de cadeia única é um anticorpo no qual uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve são

25 linearmente ligadas entre si por meio de um ligante. O DNA que codifica um anticorpo de cadeia única pode ser produzido através da ligação do DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada, do DNA que codifica um ligante e um DNA que codifica uma região variável de cadeia leve. Aqui, uma região

variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve são aquelas provenientes de um anticorpo humano ou aquelas provenientes de um anticorpo humano no qual somente os CDRs foram substituídos por CDRs de um anticorpo proveniente de um animal não-humano (por exemplo, um camundongo, um rato ou um frango). Ademais, o ligante consiste em 12 a 19 aminoácidos. Um exemplo do mesmo é (G₄S)₃ que consiste em 15 aminoácidos (G. B. Kim *et al.*, Protein Engineering Design e Selection 2007, 20 (9): 425 a 432).

Um anticorpo biespecífico (diacorpo) é um anticorpo capaz de se ligar especificamente a dois diferentes epítopos nos quais, por exemplo, o DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada A, o DNA que codifica uma região variável de cadeia leve B, o DNA que codifica uma região-variável-de-cadeia pesada B, e o DNA que codifica uma região variável de cadeia leve A são ligados entre si em tal ordem (desde que o DNA que codifica uma região variável de cadeia leve B e o DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada B estejam ligados entre si por meio do DNA que codifica um ligante descrito acima). Portanto, o DNA que codifica um anticorpo biespecífico pode ser produzido. Aqui, tanto uma região variável de cadeia pesada quanto uma região variável de cadeia leve são aquelas provenientes de um anticorpo humano ou aquelas provenientes de um anticorpo humano nas quais somente os CDRs foram substituídos por CDRs de um anticorpo proveniente de animal não-humano (por exemplo, um camundongo, um rato ou um frango).

O DNA recombinante produzido, conforme mencionado acima, é incorporado em um ou em uma pluralidade de vetor(es) apropriado(s). Cada um de tais vetores é introduzido em uma célula hospedeira (por exemplo, uma célula de mamífero, uma célula de levedura ou uma célula de inseto) para (co)expressão. Portanto, um anticorpo recombinante pode ser produzido (P. J. Delves., ANTIBODY PRODUCTION ESSENTIAL TECHNIQUES., 1997 WILEY,

P. Shepherd e C. Dean., Monoclonal Antibodies, 2000 OXFORD UNIVERSITY PRESS; J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: Principles e Practice., 1993 ACADEMIC PRESS).

Os exemplos de um anticorpo da presente invenção produzido
5 pelo método acima incluem os seguintes anticorpos (a) a (k).

(a) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 40, 41, e 42 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 44, 45, e 46 (e preferencialmente um anticorpo
10 composto por uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 43 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 47).

(b) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 40, 41, e 42 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências
15 mostradas em SEQ ID NOs: 50, 51, e 52 (e preferencialmente um anticorpo composto por uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 43 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 53).

(c) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 40, 41, e
20 42 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 55, 56, e 57 (e preferencialmente um anticorpo composto por uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 43 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 58).

(d) Um anticorpo que compreende uma região variável de cadeia
25 pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 40, 41, e 42 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 60, 61, e 62 (e preferencialmente um anticorpo composto por uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 43 e uma

região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 63).

(e) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 40, 41 e 42 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 65, 66 e 67 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 43 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 68).

(f) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 70, 71 e 72 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 74, 75 e 76 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 73 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 77).

(g) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 80, 81 e 82 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 84, 85 e 86 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 83 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 87).

(h) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 90, 91 e 92 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 94, 95 e 96 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 93 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 97).

(i) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 100, 101 e 102 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências

mostradas em SEQ ID NOs: 104, 105 e 106 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 103 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 107).

(j) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 110, 111 e 112 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 114, 115 e 116 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 113 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 117).

(k) Um anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 120, 121 e 122 e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas em SEQ ID NOs: 124, 125 e 126 (e, de preferência, um anticorpo composto de uma região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 123 e uma região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 127).

Aqui, as sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 70, 71 e 72, sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 80, 81 e 82, sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 90, 91 e 92, sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 110, 111 e 112 ou sequências de aminoácido mostradas em SEQ ID NOs: 120, 121 e 122 correspondem a CDR1, CDR2 e CDR3 de regiões variáveis de cadeia pesada de anticorpo de camundongo, respectivamente.

Além disso, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 60, 61

e 62, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 65, 66 e 67, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 74, 75 e 76, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 84, 85 e 86, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 94, 95 e 96, as
5 sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 104, 105 e 106, as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 114, 115 e 116, ou as sequências de aminoácidos mostradas nas SEQ ID NOs: 124, 125 e 126 correspondem a CDR1, CDR2 e CDR3 de regiões variáveis de cadeia leve de anticorpo de camundongo, respectivamente.

10 Além disso, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo com cadeia única ou um anticorpo bi específico da presente invenção é, por exemplo, o anticorpo a seguir (i) ou (ii) (um exemplo de anticorpo (a) é descrito abaixo).

(i) Um anticorpo que compreende: uma região variável de cadeia
15 pesada que compreende as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 40, 41 e 42 e uma sequência de aminoácido de uma região de estrutura derivada de anticorpo humano; e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 44, 45 e 46 e as sequências de aminoácidos da região de estrutura derivada de anticorpo humano (e, de
20 preferência, um anticorpo que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 43 em uma região variável de cadeia pesada e a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 47 em uma região variável de cadeia leve).

(ii) Um anticorpo que compreende: uma região variável de cadeia pesada que compreende as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 40,
25 41, e 42 e as sequências de aminoácidos das regiões de estrutura derivadas de anticorpo humano; uma região constante de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácido derivada de anticorpo humano; uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências de

aminoácidos das SEQ ID NOs: 44, 45 e 46 e as sequências de aminoácidos das regiões de estrutura derivadas de anticorpo humano; e uma região constante de cadeia leve que compreende uma sequência de aminoácido derivada de anticorpo humano (e, de preferência, um anticorpo que
 5 compreende: uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 43; uma região constante de cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácido derivada de anticorpo humano; uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID N°: 47 e uma região constante de cadeia leve que
 10 compreende uma sequência de aminoácido derivada de anticorpo humano).

Além disso, as sequências de regiões variáveis e constantes de cadeia leve e cadeia pesada de anticorpo humano podem ser obtidas a partir de, por exemplo, NCBI (USA: GenBank, UniGene, etc.). Por exemplo, as sequências a seguir podem ser usadas como sequências de referências para
 15 as regiões correspondentes: a sequência com número de registro J00228 para uma região constante de cadeia pesada de IgG1 humano; a sequência com número de registro J00230 para uma região constante de cadeia pesada de IgG2 humano; a sequência com número de registro X03604 para uma região constante de cadeia pesada de IgG3 humano; uma sequência com número de
 20 registro K01316 para uma região constante de cadeia pesada de IgG4 humano; a sequência com número de registro V00557, X64135 ou X64133 para uma região constante κ de cadeia leve humana; e a sequência com número de registro X64132 ou X64134 para uma região constante λ de cadeia leve humana.

25 Os anticorpos acima, de preferencial, têm atividade citotóxica, exibindo, por isto, efeitos antitumorais.

Além disso, as sequências específicas acima de cadeia pesada e regiões variáveis de cadeia leve e CDRs em um anticorpo são meramente

descritas para exemplificação. É claro que a presente invenção não é limitada a sequências particulares. Um hibridoma capaz de produzir um anticorpo humano diferente ou um anticorpo animal não-humano (por exemplo, um anticorpo de camundongo) em oposição a CAPRIN-1 humano é produzido. Um anticorpo monoclonal produzido pelo hibridoma é coletado. Então, é determinado se o anticorpo obtido é ou não um anticorpo de interesse com o uso de, como indicadores, atividade de ligação imunológica e atividade citotóxica em relação a um CAPRIN-1 humano. Dessa forma, um hibridoma que produz anticorpo monoclonal de interesse é identificado. Portanto, conforme descrito acima, os DNAs que codificam as regiões variáveis de cadeia leve e de cadeia pesada de um anticorpo de interesse são produzidos a partir do hibridoma para a determinação da sequência. Os DNAs são usados para a produção de anticorpos diferentes.

Adicionalmente, o anticorpo acima da presente invenção pode ser qualquer um dentre os anticorpos (i) a (iv) acima que têm uma substituição, deleção ou adição de um ou diversos (e, de preferência, 1 ou 2) aminoácido(s), particularmente uma sequência de região de estrutura e/ou uma sequência de região constante, contanto que a mesma tenha propriedade específica de CAPRIN-1 especificamente reconhecível. Aqui, o termo "diversos aminoácidos" indica 2 a 5 e, de preferência, 2 ou 3 aminoácidos.

Ademais, de acordo com a presente invenção, o DNA que codifica o anticorpo acima da presente invenção, o DNA que codifica uma cadeia pesada ou cadeia leve do anticorpo, ou DNA que codifica uma região variável de cadeia leve ou cadeia pesada do anticorpo também é fornecido. Por exemplo, no caso do anticorpo (a), os exemplos de tais DNAs incluem: DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada que compreende sequências de nucleotídeo que codificam as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 40, 41 e 42; e o DNA que codifica uma região variável de cadeia

leve que compreende as sequências de nucleotídeo que codificam as sequências de aminoácidos das SEQ ID NOs: 44, 45 e 46.

As Regiões que determinam a complementaridade (CDRs) codificada pelos DNAs das sequências acima são regiões que determinam a especificidade do anticorpo. Portanto, as sequências que codificam as outras regiões (isto é, regiões constantes e regiões de estrutura) em um anticorpo podem ser sequências de um anticorpo diferente. Aqui, os anticorpos diferentes incluem os anticorpos provenientes de organismos não humanos. Entretanto, tendo em vista a redução dos efeitos colaterais, os anticorpos derivados de humanos são preferenciais. Isto é, no caso acima, as regiões de DNA que codificam as regiões de estrutura e regiões constantes de cadeias leve e pesada de preferência compreendem as sequências de nucleotídeo que codificam as sequências de aminoácidos relevantes a partir de um anticorpo humano.

Adicionalmente, os exemplos diferentes de DNA que codificam um anticorpo da presente invenção, como anticorpo (a), incluem DNA que codifica uma região variável de cadeia pesada que compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 43 e o DNA no qual uma região que codifica uma região variável de cadeia leve compreende uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 47. Aqui, um exemplo de uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 43 é a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 48. Além disso, um exemplo de uma sequência de nucleotídeo que codifica a sequência de aminoácido da SEQ ID NO: 47 é a sequência de nucleotídeo da SEQ ID NO: 49. Ainda, os DNAs acima que codificam a cadeia pesada e as regiões constantes de cadeia leve, de preferência, compreendem as sequências de nucleotídeo que codificam as sequências de aminoácidos derivadas de anticorpo humano correspondentes.

O DNA da presente invenção pode ser obtido por, por exemplo, os métodos supramencionados ou pelos métodos a seguir. Primeiramente, o RNA total é preparado a partir de um hibridoma para um anticorpo da presente invenção com o uso de um kit de extração de RNA comercialmente disponível.

5 Então, o cDNA é sintetizado com uma transcriptase reversa com o uso de indicadores aleatórios e similares. A seguir, o cDNA que codifica um anticorpo é ampliado por um método de PCR com o uso de, como indicadores, oligonucleotídeos que têm as sequências conservadas em diversas regiões de genes conhecidos de cadeia leve e cadeia pesada de anticorpo de camundongo. As sequências que codificam as regiões constantes podem ser
10 obtidas pela ampliação de sequências conhecidas por um método de PCR. A sequência de nucleotídeo do DNA pode ser determinada por um método geral que envolve, por exemplo, a incorporação em um plasmídeo ou fago para a determinação da sequência.

15 Acredita-se que os efeitos antitumorais de um anticorpo anti-CAPRIN-1 usado na presente invenção nas células de câncer que expressam CAPRIN-1 são exibidas através de mecanismos de citotoxicidade descritos abaixo.

As citotoxicidades são a citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC) mediada por célula efetora contra células que expressam
20 CAPRIN-1, e citotoxicidade complemento-dependente (CDC) contra células que expressam CAPRIN-1.

Consequentemente, a atividade de um anticorpo anti-CAPRIN-1 usado na presente invenção pode ser avaliada através de determinação *ex vivo*
25 da atividade de ADCC ou atividade de CDC em células de câncer que expressam CAPRIN-1, como descrito especificamente nos exemplos mencionados abaixo.

Um anticorpo anti-CAPRIN-1 usado na presente invenção se liga

a uma proteína de CAPRIN-1 em uma célula de câncer e apresenta efeitos anti-tumor com base na atividade acima. Portanto, acredita-se que tal anticorpo seja útil no tratamento ou prevenção contra câncer. Especificamente, de acordo com a presente invenção, a composição farmacêutica para tratamento e/ou prevenção de câncer que compreende, como um ingrediente ativo, um anticorpo anti-CAPRIN-1, é fornecida. Quando um anticorpo anti-CAPRIN-1 é usado com o propósito de administração de um anticorpo em humanos (tratamento de anticorpo), o mesmo é, de preferência, usado sob a forma de um anticorpo humano ou um anticorpo humanizado, a fim de reduzir a imunogenicidade.

Além disso, conforme a afinidade de ligação entre um anticorpo anti-CAPRIN-1 e uma proteína CAPRIN-1 em uma superfície de célula de câncer se torna mais alta, a atividade antitumoral mais forte pode ser apresentada por um anticorpo anti-CAPRIN-1. Portanto, se um anticorpo anti-CAPRIN-1 que tem alta afinidade de ligação com uma proteína de CAPRIN-1 pode ser obtido, os efeitos antitumorais ainda mais fortes podem ser esperados para serem apresentados. Consequentemente, se torna possível utilizar tal anticorpo como uma composição farmacêutica para tratamento e/ou prevenção de câncer. Conforme descrito acima, para alta afinidade de ligação, a constante de afinidade K_a (k_{on}/k_{off}) é, de preferência, pelo menos $10^7 M^{-1}$, pelo menos $10^8 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^8 M^{-1}$, pelo menos $10^9 M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, pelo menos $10^{10} M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^{10} M^{-1}$, pelo menos $10^{11} M^{-1}$, pelo menos $5 \times 10^{11} M^{-1}$, pelo menos $10^{12} M^{-1}$ ou pelo menos $10^{13} M^{-1}$.

LIGAÇÃO A CÉLULAS QUE EXPRESSAM ANTÍGENO

A capacidade de um anticorpo de se ligar a um CAPRIN-1 pode ser especificada através de ensaio de ligação com o uso de, por exemplo, ELISA, um método *Western blot*, imunofluorescência ou análise por citometria de fluxo, conforme descrito nos Exemplos.

MARCAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Um anticorpo que reconhece CAPRIN-1 pode ser testado quanto à reatividade com CAPRIN-1 por um método imuno-histoquímico conhecido por pessoas versadas na técnica com o uso de uma sessão de tecido congelado fixado com paraformaldeído ou acetona ou uma seção de tecido incluído em parafina e fixado com paraformaldeído. Tal seção é preparada a partir de um tecido obtido a partir de um paciente durante a cirurgia ou um animal portador de tecido de xenotransplante é inoculado com uma célula natural ou linhagem de célula transfectada que expressa CAPRIN-1.

Para marcação imuno-histoquímica, um anticorpo reativo a CAPRIN-1 pode ser marcado por uma variedade de métodos. Por exemplo, o mesmo pode ser visualizado pela reação com um anti-anticorpo de bode conjugado com peroxidase de rábano silvestre de camundongo ou anti-anticorpo de coelho e de cabra.

COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

Um alvo da composição farmacêutica para tratamento e/ou prevenção de câncer da presente invenção não é particularmente limitado enquanto o alvo é um câncer (célula) que expressa o gene de CAPRIN-1.

Ambos os termos "tumor" e "câncer" usados na presente invenção referem-se a neoplasma maligno e, dessa forma, eles são usados de uma maneira permutável.

Um câncer que pode ser um alvo na presente invenção é u câncer que expressa um gene que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID de números pares: 2 a 30 ou uma sequência parcial que consiste em 7 ou mais aminoácidos consecutivos da dita sequência de aminoácido. Os exemplos preferenciais dos mesmos incluem câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, câncer de pulmão, linfoma, mastocitoma, câncer de esôfago e câncer de cólon.

Os exemplos destes cânceres específicos incluem, mas não se limitam a, adenocarcinoma de mama, adenocarcinoma de mama do tipo compósito, tumor de mama misto maligno, adenocarcinoma papilar intradutal, adenocarcinoma de pulmão, câncer de célula escamosa, câncer de célula
5 pequena, câncer de célula grande, glioma que é um tumor de tecido neuroepitelial, ependimoma, tumor neuronal, tumor neuroectodermal embrionário, schwannoma, neurofibroma, meningioma, leucemia linfocítica crônica, linfoma, linfoma gastrointestinal, linfoma digestivo, linfoma de célula média a célula pequena, câncer cecal, câncer de cólon ascendente, câncer de
10 cólon descendente, câncer de cólon transverso, câncer de cólon sigmóide e câncer retal.

Além disso, o animal objeto da presente invenção é um mamífero. Os exemplos dos mesmos incluem mamíferos como primatas, animais domésticos, animais de fazenda e animais de esporte. Os humanos, cachorros
15 e gatos são particularmente preferenciais.

Quando um anticorpo usado na presente invenção é usado como uma composição farmacêutica, o mesmo pode ser formulado por um método conhecido por pessoas versadas na técnica. Por exemplo, o mesmo pode ser parenteralmente usado na forma de uma injeção parenteral de: uma solução
20 asséptica que compreende água ou uma solução não-água farmacêuticamente aceitável; ou um líquido de suspensão. Por exemplo, em um caso possível, pode ser formulado com o uso combinado de um carreador ou meio farmacologicamente aceitável e especificamente água esterilizada, salino fisiológico, óleo vegetal, um emulsificador, uma suspensão, um tensoativo, um
25 estabilizador, um agente aromatizante, um excipiente, um veículo, um conservante ou um agente de ligação em uma maneira adequada através da mistura de uma forma de dosagem de unidade exigida para uma formulação farmacêutica geralmente aceitável. A quantidade de um ingrediente ativo em

uma formulação é determinada de forma que uma dosagem apropriada dentro da faixa indicada pode ser alcançada.

Uma composição asséptica com propósitos de injeção pode ser formulada de acordo com a prática de formulação geral com o uso de um
5 veículo, como água destilada para propósitos de injeção.

Os Exemplos de uma solução aquosa para propósitos de injeção incluem soluções isotônicas e fisiológicas salinas que compreendem glicose e outros adjuvantes como D-sorbitol, D-manose, D-manitol, e cloreto de sódio. Tal solução pode ser usada com um auxiliar de dissolução adequado. Os
10 exemplos de tais auxílios de dissolução incluem alcoóis como etanol e poliálcool, propileno glicol, polietileno glicol e tensoativos não iônicos como polisorbato 80^(TM) e HCO-60.

Os exemplos de líquidos oleosos incluem óleo de sésamo e óleo de soja. Tal líquido oleoso pode ser usado em combinação com um auxiliar de
15 dissolução como benzil benzoato ou benzil álcool. Além disso, o mesmo pode ser misturado com um agente tampão como uma solução de tampão fosfato, uma solução de tampão de acetato de sódio, um agente tranquilizante como cloridrato de procaína, um estabilizador como benzil álcool, fenol ou um antioxidante. Em geral, uma solução de injeção formulada é introduzida no
20 interior de um amplo adequado.

A composição farmacêutica acima é oralmente ou parenteralmente administrada. De preferência, a mesma é administrada de forma parenteral. Os exemplos específicos de formas de dosagem incluem agentes injetáveis, agentes administrados de forma intranasal, agentes
25 administrados de forma transpulmonar e agentes administrados de forma percutânea. Por exemplo, os agentes injetáveis podem ser administrados de forma sistêmica ou local através de uma injeção intravenosa, injeção intramuscular, injeção intraperitoneal ou injeção subcutânea.

Além disso, o método de administração pode ser determinado apropriadamente dependendo da idade, peso, gênero e sintomas do paciente. Uma dose única de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou um polinucleotídeo que codifica um anticorpo pode ser selecionado dentro de uma faixa de, por exemplo, 0,0001 mg a 1000 mg por kg do peso do corpo. Alternativamente, a dose pode ser selecionada dentro de uma faixa de, por exemplo, 0,001 a 100000 mg por corpo o paciente; entretanto, não é necessário se limitar ao mesmo. A dose e o método de administração são mudados dependendo da idade, peso, gênero e sintomas do paciente. Entretanto, as pessoas versadas na técnica podem selecionar de forma apropriada a dose e o método.

POLYPEPTÍDEO E DNA

De acordo com a presente invenção, os polipeptídeos e DNAs a seguir para anticorpos (a) a (k) descritos acima são adicionalmente fornecidos.

(i) Um polipeptídeo que compreende as sequências de aminoácidos das SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 113, e SEQ ID NO: 123, e DNA que codifica o polipeptídeo.

(ii) Um polipeptídeo que compreende as sequências de aminoácidos da SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117, e SEQ ID NO: 127, e DNA que codifica o polipeptídeo.

(iii) DNA que compreende as sequências de nucleotídeo de SEQ ID N°: 48, SEQ ID N°: 78, SEQ ID N°: 88, SEQ ID N°: 98, SEQ ID N°: 108, SEQ ID N°: 118 e SEQ ID N°: 128.

(iv) DNA que compreende as sequências de nucleotídeo de SEQ ID N°: 49, SEQ ID N°: 54, SEQ ID N°: 59, SEQ ID N°: 64, SEQ ID N°: 69, SEQ

ID N°: 79, SEQ ID N°: 89, SEQ ID N°: 99, SEQ ID N°: 109 SEQ ID N°: 119, e SEQ ID N°: 129.

(v) Um polipeptídeo CDR de cadeia pesada que compreende sequências de aminoácido selecionadas a partir do grupo que consiste em
5 sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 70, 71 e 72, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 80, 81 e 82, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 90, 91 e 92, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 110, 111 e 112, e sequências de aminoácido de
10 SEQ ID NOs: 120, 121, e 122 e DNA que codifica o polipeptídeo.

(vi) Um polipeptídeo CDR de cadeia leve que compreende sequências de aminoácido selecionadas a partir do grupo que consiste em
sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, sequências de aminoácido de
15 SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 60, 61 e 62, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 65, 66 e 67, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 74, 75 e 76, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 84, 85 e 86, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 94, 95 e 96, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 104,
20 105 e 106, sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 114, 115 e 116, e sequências de aminoácido de SEQ ID NOs: 124, 125 e 126, e DNA que codifica o polipeptídeo.

Estes polipeptídeos e DNAs podem ser produzidos através de uma técnica de gene recombinante conforme descrito acima.

25

EXEMPLOS

A presente invenção é doravante descrita em maiores detalhes com referência aos seguintes exemplos, embora o escopo da presente invenção não seja limitado aos mesmos.

**EXEMPLO 1: IDENTIFICAÇÃO DE NOVA PROTEÍNA DE ANTÍGENO DO CÂNCER ATRAVÉS
DO MÉTODO SEREX**

(1) Construção de biblioteca de cDNA

O RNA total foi extraído de um tecido de testículo de um cachorro
5 saudável através de um método Ácido guanídio-Fenol-Clorofórmio e, então, um
poliA RNA foi purificado de acordo com os protocolos incluídos com um Kit de
purificação de mRNA Oligotex-dT30 (Takara Shuzo Co., Ltd.).

Uma biblioteca de fago de cDNA de testículo canino foi sintetizada
com o uso do mRNA obtido deste modo (5 µg). A biblioteca de fago de cDNA
10 foi construída com o uso de um Kit de Síntese de cDNA, um Kit de Síntese
ZAP-cDNA e um Kit de Clonagem ZAP-cDNA GigapackIII Gold
(STRATAGENE) de acordo com os protocolos incluídos nos kits. O tamanho
da biblioteca de fago de cDNA obtida deste modo era $7,73 \times 10^5$ pfu/ml.

(2) Varredura de biblioteca de cDNA com o uso de soro

15 Foi realizada a imunovarredura com o uso da biblioteca de fago
de cDNA de testículo canino construída acima. Especificamente, *Escherichia*
coli hospedeiro (XL1-Blue MRF') foi infectado com o fago em uma placa de
agarose NZY (Φ90 × 15 mm) a fim de obter 2210 clones. As células de *E. coli*
foram cultivadas a 42°C por 3 a 4 horas para formar placas. A lâmina foi
20 coberta com uma membrana de nitrocelulose (Hybond C Extra: GE Healthcare
Bio-Science) impregnada com IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosídeo) a 37°C por
4 horas, de modo que a proteína fosse induzida, expressa e, então, transferida
para a membrana. Subsequentemente, a membrana foi coletada e, então,
imersa em TBS (10 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl e pH 7,5) que contém
25 0,5% de leite desnatado em pó, seguido por agitação de um dia para o outro a
4°C, suprimindo assim reação não específica. O filtro foi reagido com um soro
diluído 500 vezes de um paciente canino a temperatura ambiente por 2 a 3
horas.

Como o soro acima de um paciente canino, um soro coletado de um paciente canino com câncer de mama foi usado. Estes soros foram armazenados a -80°C e, então, submetidos a um pré-tratamento imediatamente antes do uso. Um método para o pré-tratamento de soro é como segue. Especificamente, *Escherichia coli* hospedeiro (XL1-Blue MRF') foi infectado com um fago λ ZAP Express no qual nenhum gene estranho foi inserido e, então, cultivado de um dia para o outro em um meio de lâmina NZY a 37°C . Subsequentemente, o tampão (0,2 M de NaHCO_3 e pH 8,3) que contém 0,5 M de NaCl foi adicionado à lâmina, sendo que a lâmina foi deixada para descansar a 4°C por 15 horas e, então, um sobrenadante foi coletado como um extrato de fago/*Escherichia coli*. Depois, o extrato de fago/*Escherichia coli* coletado deste modo foi aplicado a uma coluna NHS (GE Healthcare Bio-Science), de modo que uma proteína derivado de fago de *Escherichia coli* fosse imobilizada. O soro de um paciente canino foi aplicado à coluna de proteína imobilizada para reação e, então, *Escherichia coli* e um anticorpo absorvido para o fago foram removidos do soro. A fração de soro que atravessou a coluna foi diluída 500 vezes em TBS que contém 0,5% de leite desnatado em pó. O resultante foi usado como um material de imunovarredura.

Uma membrana, sobre a qual o soro tratado e a proteína de fusão foram transferidos, foi lavada 4 vezes com TBS-T (0,05% de Tween20/TBS) e, então, induzida a reagir com anti IgG de cão produzido em cabra (conjugado anti IgG-h de cão + I HRP produzido em cabra) (BETHYL Laboratories)) diluída 5000 vezes em TBS que contém 0,5% de leite desnatado em pó como um anticorpo secundário por 1 hora a temperatura ambiente. A detecção foi realizada através de uma enzima que fornece cor à reação com o uso de uma solução de reação NBT/BCIP (Roche). As colônias que tiveram sítios positivamente correspondentes para uma reação de coloração foram coletadas

da placa de agarose NZY ($\Phi 90 \times 15$ mm) e, então, lisadas em 500 μ l de um tampão SM (100 mM de NaCl, 10 mM de $MgClSO_4$, 50 mM de Tris-HCl, 0,01% de gelatina e pH 7,5). Até que as colônias positivas para coloração fossem unificadas, a varredura secundária e a varredura terciária foram repetidas de modo que 30.940 clones de fago que reagem com IgG de soro sofreram varredura por um método similar acima. Assim, 5 clones positivos foram isolados.

(3) Pesquisa de homologia para gene de antígeno isolado

Para análise de sequência de nucleotídeo dos 5 clones positivos isolados pelo método acima, um procedimento para conversão de vetores de fago em vetores de plasmídeo foi realizado. Especificamente, 200 μ l de uma solução foram preparados para conter *Escherichia coli* hospedeiro (XL1-Blue MRF') de modo que a absorbância OD_{600} fosse 1,0. A solução foi misturada com 250 μ l de uma solução de fago purificada e, então, com 1 μ l de um fago auxiliar ExAssist (STRATAGENE), seguido por 15 minutos de reação a 37°C. Três (3) ml de meio LB foram adicionados e, então, o cultivo foi realizado a 37°C por 2,5 a 3 horas. Imediatamente após o cultivo, a temperatura da solução foi mantida a 70°C através de banho-maria por 20 minutos, a centrifugação foi realizada a 4°C e 1000 $\times$ g por 15 minutos e, então, o sobrenadante foi coletado como uma solução de fagomídeo. Subsequentemente, 200 μ l de uma solução foram preparados para conter hospedeiro de fagomídeo *Escherichia coli* (SOLR) de modo que a absorbância OD_{600} fosse 1,0. A solução foi misturada com 10 μ l de uma solução de fago purificada, seguido por 15 minutos de reação a 37°C. A solução (50 μ l) foi semeada em meio de Agar LB que contém ampicilina (concentração final de 50 μ g/ml) e, então, cultivada de um dia para o outro a 37°C. A colônia única de SOLR transformada foi coletada e, então, cultivada em meio LB que contém ampicilina (concentração final: 50 μ g/ml) a 37°C. Um DNA de plasmídeo que

contém o inserto de interesse foi purificado com o uso de um Kit de Minipreparação de plasmídeo QIAGEN (QIAGEN).

O plasmídeo purificado foi submetido à análise da sequência de inserto de comprimento completo através de um método *primer walking* com o uso do iniciador T3 de SEQ ID NO: 31 e do iniciador T7 de SEQ ID NO: 32. Como resultado da análise de sequência, as sequências de gene de SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 11 e 13 foram obtidas. Um programa de pesquisa de homologia, pesquisa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), foi realizado com o uso das sequências de nucleotídeo dos genes e das sequências de aminoácido correspondentes (SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12 e 14). Como resultado desta pesquisa de homologia com genes conhecidos, foi revelado que todos dentre os 5 genes obtidos codificavam CAPRIN-1. Em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade da sequência dentre os 5 genes foi 100% em termos de sequência de nucleotídeo e 99% em termos de sequência de aminoácido. Além disso, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a sequência de identidade entre os genes e genes que codificam fatores humanos homólogos a isto (homólogos humanos) foi 94% em termos de sequência de nucleotídeo e 98% em termos de sequência de aminoácido. As sequências de nucleotídeo dos homólogos humanos são mostradas nas SEQ ID NOs: 1 e 3 e as sequências de aminoácido dos mesmos são mostradas nas SEQ ID NOs: 2 e 4. Além disso, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, identidade de sequência entre os genes caninos obtidos deste modo e um gene que codifica um homólogo de gado foi 94% em termos de sequência de nucleotídeo e 97% em termos de sequência de aminoácido. A sequência de nucleotídeo do homólogo de gado é mostrada na SEQ ID N°: 15 e a sequência de aminoácido do mesmo é mostrada na SEQ ID N°: 16. Em adição, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade de sequência entre os genes que codificam os homólogos humanos

e o gene que codifica o homólogo de gado foi 94% em termos de sequência de nucleotídeo e se situa entre 93% a 97% em termos de sequência de aminoácido. Além disso, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade de sequência entre os genes caninos obtidos e um

5 gene que codifica um homólogo de equino foi 93% em termos de sequência de nucleotídeo e 97% em termos de sequência de aminoácido. A sequência de nucleotídeo do homólogo de equino é mostrada na SEQ ID N°: 17 e a sequência de aminoácido do mesmo é mostrada na SEQ ID N°: 18. Em

10 adição, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade de sequência entre os genes que codificam os homólogos humanos e o gene que codifica o homólogo de equino foi 93% em termos de sequência de nucleotídeo e 96% em termos de sequência de aminoácido. Além disso, em

15 relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade de sequência entre os genes caninos obtidos e os genes que codificam homólogos de rato se situa de 87% a 89% em termos de sequência de nucleotídeo e se situa de 95%

20 a 97% em termos de sequência de aminoácido. As sequências de nucleotídeo dos homólogos de rato são mostradas nas SEQ ID NOs: 19, 21, 23, 25 e 27 e as sequências de aminoácido dos mesmos são mostradas nas SEQ ID NOs: 20, 22, 24, 26 e 28. Em adição, em relação às regiões a serem traduzidas em

25 proteínas, a identidade de sequência entre os genes que codificam os homólogos humanos e os genes que codificam os homólogos de rato se situa de 89% a 91% em termos de sequência de nucleotídeo e se situa de 95% a 96% em termos de sequência de aminoácido. Além disso, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade de sequência entre os

genes caninos obtidos e um gene que codifica um homólogo de frango foi 82% em termos de sequência de nucleotídeo e 87% em termos de sequência de aminoácido. A sequência de nucleotídeo do homólogo de frango é mostrada na SEQ ID N°: 29 e a sequência de aminoácido do mesmo é mostrada na SEQ

ID N°: 30. Em adição, em relação às regiões a serem traduzidas em proteínas, a identidade de sequência entre os genes que codificam os homólogos humanos e o gene que codifica o homólogo de frango se situa de 81% a 82% em termos de sequência de nucleotídeo e foi 86% em termos de sequência de aminoácido.

(4) Análise de expressão de genes em cada tecido

A expressão dos genes obtidos pelo método acima em tecidos caninos e humanos normais e linhagens de células diferentes foi analisada por um método de RT-PCR. A reação de transcrição reversa foi realizada da seguinte forma. Especificamente, o RNA total foi extraído de cada tecido (50 mg a 100 mg) e cada linha de células ($5 \text{ a } 10 \times 10^6$ células) usando um reagente TRIZOL (Invitrogen) de acordo com protocolos também incluídos. O cDNA foi sintetizado utilizando o RNA total e o Sistema de Síntese do Primeiro Filamento Sobrescrito para RT-PCR (Invitrogen) de acordo com protocolos também incluídos. O PCR foi realizado da seguinte forma utilizando iniciadores específicos para os genes obtidos (SEQ ID NOs: 33 e 34). Especificamente, o PCR foi realizado repetindo 30 vezes um ciclo de 94°C / 30 segundos, 60°C /30 segundos, e 72°C / 30 segundos usando um termociclador (BIO RAD) e uma solução de reação ajustada a uma quantidade total de 25 μl através da adição de cada reagente e um tampão anexado (0,25 μl de uma amostra preparada pela reação de transcrição reversa, os iniciadores acima (2 μM de cada), dNTP (0,2 mM cada), e 0,65 U de polimerase ExTaq (Takara Shuzo)). Além disso, os iniciadores de genes específicos mencionados acima foram utilizados para ampliar a região entre o nucleotídeo o número 206 e o nucleotídeo número 632 na sequência de nucleotídeos (gene canino CAPRIN-1) da SEQ ID NO: 5 e na região entre o nucleotídeo número 698 e o nucleotídeo número 1124 na sequência de nucleotídeos (gene humano CAPRIN-1), da SEQ ID NO: 1. Para o controle de comparação, os iniciadores específicos GAPDH (SEQ ID NO: 35

e 36) foram usadas ao mesmo tempo. Como resultado, como foi mostrado na Fig. 1, foi observada uma forte expressão no testículo no caso dos tecidos de cães saudáveis, enquanto que a expressão foi observada no câncer de mama em cães e tecidos de adenocarcinoma. Além disso, a expressão de homólogos humanos que são homólogos aos genes obtidos também foi confirmada. Como resultado, à semelhança dos genes caninos CAPRIN-1, a expressão poderia ser confirmada apenas no testículo em caso dos tecidos normais. No entanto, no caso das células cancerosas, a expressão foi detectada em vários tipos de linhas de células de câncer, como linhas de células de câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, câncer de pulmão e câncer de esôfago. A expressão foi confirmada em um número particularmente grande de linhas de células de câncer de mama. Com base nos resultados, foi confirmado que a expressão CAPRIN-1 não foi observada em tecidos normais, com exceção dos testículos enquanto CAPRIN-1 foi expressa em muitas células cancerosas e, particularmente nas linhas de células de câncer de mama.

Além disso, na Fig. 1, referência n.º 1, ao longo do eixo longitudinal indica o padrão de expressão de cada um dos genes identificados acima, e a referência n.º 2, ao longo do mesmo indica o padrão de expressão do gene GAPDH para o controle de comparação.

(5) Preparação de anticorpos policlonais contra o peptídeo derivado de CAPRIN-1.

Para obter uma ligação de anticorpo para o CAPRIN-1, o peptídeo derivado do CAPRIN-1 (Arg-Asn-Glu-Leu-Lys-Lys-Lys-Gly-Lys-Leu-Asp-Asp-Tyr-Gln (SEQ ID NO: 37)) foi sintetizado. O peptídeo (1 mg) como antígeno foi misturado com uma solução de adjuvante de Freund incompleto (IFA) em uma quantidade equivalente ao peptídeo. A mistura foi administrada por via subcutânea em um coelho quatro vezes a cada duas semanas. Posteriormente, o sangue foi coletado, de modo que foi obtido um anti-soro contendo um

anticorpo policlonal. Além disso, o anti-soro foi purificado usando um apoio de proteína G (GE Healthcare Biosciences) e, em seguida, foi obtido um anticorpo policlonal contra o peptídeo CAPRIN-1 derivado. Além disso, um anticorpo obtido pelo soro de purificação de coelhos foi designado como anticorpo de controle, sendo que nenhum antígeno foi administrado com o uso de um apoio de proteína G do modo descrito acima.

(6) Análise da expressão da proteína antígeno na célula cancerosa

Em seguida, analisou-se se a proteína CAPRIN- 1 foi expressa nas superfícies das células de 7 tipos de linhas celulares de câncer de mama (MDA-MB-157, T47D, MRK-nu-1, MDA-MB-231V, BT20, SK-BR-3 e MDA-MB-231T) em que a expressão do gene CAPRIN-1 foi fortemente confirmada. Cada linha celular humana do câncer de mama em que a expressão gênica foi confirmada (10^6 células), como foi descrito acima, foi centrifugada em 1.5-ml do tubo de micro centrífuga. O anticorpo policlonal contra o peptídeo CAPRIN-1 derivado (2µg)(5µl) preparada em (5) acima foi adicionado ali. O resultante foi novamente suspenso em PBS contendo 0,1% de soro fetal bovino (95 µl) e em seguida, deixado em repouso no gelo por 1 hora. Após a lavagem com PBS, o resultante foi suspenso em PBS contendo um anticorpo IgG de cabra anti coelho marcado FITC (Santa Cruz Biotechnology, Inc.)(5µl) e 0,1% de soro fetal bovino (FBS)(95 µl) e, em seguida, deixado em repouso no gelo por 1 hora. Após a lavagem com PBS, a intensidade de fluorescência foi medida utilizando FACSCalibur (Becton Dickinson e Company). Enquanto isso, um procedimento semelhante ao anterior foi realizado utilizando o anticorpo de controle preparado no (5) acima, ao invés do anticorpo policlonal contra um peptídeo CAPRIN- 1 derivado, de modo que um controle foi preparado. Como resultado, a intensidade de fluorescência foi pelo menos 30% mais forte em todas as células em que o anticorpo CAPRIN-1 anti-humano foi adicionado do

que nas células de controle. Especificamente, os seguintes acréscimos na intensidade de fluorescência foram confirmados: MDA-MB-157: 184%, T47D: 221%, MRK-nu-1: 115%, MDA-MB-231V: 82%, BT20: 32%, SK-BR-3: 279% e MDA-MB-231T: 80%. Com base no que foi exposto, foi confirmado que a

5 proteína CAPRIN-1 foi expressa nas superfícies das células da linha celular de câncer humano. Além disso, a taxa de aumento da intensidade de fluorescência é representada pela taxa de crescimento no meio de intensidade de fluorescência (valor MFI) nas células. Foi calculado pela seguinte equação.

A taxa de aumento no meio de intensidade de fluorescência (taxa de aumento da intensidade de fluorescência) (%) = ((valor MFI das células reagiram com um anticorpo CAPRIN- 1 anti-humano) - (controle do valor MFI)) / (controle do valor MFI) × 100

(7) Coloração imuno-histoquímica

(7) -1 expressão CAPRIN- 1 em tecidos caninos e de

15 camundongos normais

Os camundongos (Balb / c, do sexo feminino) e cães (cães da raça beagle, fêmea) foram exsanguinados sob anestesia com éter e anestesia com cetamina / isoflurano. Após a laparotomia, os órgãos (estômago, fígado, globo ocular, glândula timo, músculos, medula óssea, útero, intestino, esôfago,

20 coração, rins, glândulas salivares, intestino grosso (cólon), glândula mamária, cérebro, pulmões, pele, glândula adrenal, ovário, pâncreas, baço e bexiga) foram transferidos para cada prato de 10 cm, contendo PBS. Cada órgão foi aberto em PBS e, em seguida, submetido à fixação de perfusão durante a noite com um tampão de fosfato 0,1 M (pH 7,4) contendo paraformaldeído a 4%

25 (PFA). O perfusato foi descartado, a superfície do tecido de cada órgão foi lavado com PBS e, em seguida, foi adicionada uma solução de PBS contendo sacarose 10% a um tubo de centrifuga de 50 ml. Cada tecido foi então colocado em cada tubo e em seguida agitado com um rotor a 4 ° C por 2 horas.

Cada solução foi substituída por uma solução de PBS contendo sacarose 20% e, em seguida, deixou-se a 4 ° C até que os tecidos precipitassem. Cada solução foi substituída por uma solução de PBS contendo 30% de sacarose e, em seguida, deixou-se a 4° C até que os tecidos precipitassem. Cada tecido foi

5 removido e uma parte necessária foi retirada com um bisturi cirúrgico. Em seguida, um composto de OCT (Tissue-Tek) foi aplicado e espalhado sobre a superfície de cada tecido e, em seguida os tecidos foram colocados em Cryomold. O Cryomold foi colocado em gelo seco para um congelamento rápido. Os tecidos foram cortados em seções de 10 a 20 µm de espessura

10 utilizando um criostato (Leica) e, em seguida, as seções de tecido cortado foram secas ao ar nas lâminas de vidro por 30 minutos, utilizando um secador de cabelo, de modo que as lâminas de vidro em que as seções de tecido cortado foram colocadas foram preparadas. Em seguida, cada lâmina de vidro foi colocada em um frasco de coloração com PBS-T (salina contendo Tween20

15 a-0,05%), de modo que um processo envolvendo a troca com PBS-T foi realizado três vezes a cada 5 minutos. O excesso de água em torno de cada amostra foi removido utilizando Kimwipes e, em seguida, cada seção foi cercada usando DAKOPEN (DAKO). Como soluções de bloqueio, um reagente de bloqueio de camundongo Ig MOM (VECTASTAIN) foi aplicado no tecido do

20 camundongo e uma solução PBS-T contendo 10% FBS foi aplicada no tecido canino. Os resultantes foram deixados em repouso em uma câmara úmida à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, uma solução foi preparada para conter um anticorpo monoclonal (anticorpo monoclonal #6) contra CAPRIN- 1 com a região variável da cadeia pesada da SEQ ID NO: 73 e a

25 região variável da cadeia leve da SEQ ID NO: 77 e reagir com as superfícies das células cancerosas preparadas no Exemplo 4, em que o anticorpo foi secado na concentração de 10 µg / ml na solução de bloqueio. A solução foi aplicada em cada lâmina de vidro e depois foi deixada dentro de uma câmara

úmida a 4 ° C durante a noite. Depois de 3 lavagens, cada 10 minutos com PBS-T, o anticorpo anti-IgG marcado com biotina MOM (VECTASTAIN) diluído 250 vezes com a solução de bloqueio foi aplicado em cada lâmina de vidro e em seguida, foi colocado dentro de uma câmara úmida à temperatura ambiente por uma hora. Depois de 3 lavagens, cada 10 minutos com PBS-T, um reagente ABC avidina-biotina (Vectastain) foi aplicado e, em seguida, foi colocado dentro de uma câmara úmida à temperatura ambiente por 5 minutos. Depois de 3 lavagens, cada 10 minutos com PBS-T, uma solução de coloração DAB (DAB 10 mg + 30% H₂O₂ 10 µl/0,05 M Tris-HCl (pH 7,6) 50 ml) foi aplicada e, em seguida, as lâminas de vidro foram deixadas dentro de uma câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos. As lâminas de vidro foram lavadas com água destilada e, em seguida, foi aplicado um reagente hematoxilina (DAKO). Depois de serem deixadas à temperatura ambiente por 1 minuto, as lâminas de vidro foram lavadas com água destilada. As lâminas foram imersas em soluções a 70%, 80%, 90%, 95% e 100% de etanol nesta ordem de 1 minuto cada e, em seguida, deixados em xilol durante a noite.

As lâminas de vidro foram removidas, cobertas com lamínulas com Glycergel Mounting Medium (DAKO), e, em seguida, observou-se. Como resultado, a expressão de CAPRIN- 1 foi observada a um grau leve no interior das células em todas as glândulas salivares, rim, cólon, estômago e tecidos, mas a expressão CAPRIN- 1 nunca foi observada na superfície das células. Além disso, absolutamente nenhuma expressão CAPRIN-1 foi observada em tecidos de outros órgãos. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos quando o anticorpo monoclonal foi usado contra o CAPRIN- 1 tendo a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 103 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 107 (anticorpo monoclonal # 9).

(7) -2 Expressão CAPRIN- 1 em tecidos caninos com câncer de mama

Com o uso de 108 amostras de tecido de câncer mamário canino congelados de cães diagnosticados pelo diagnóstico patológico como tendo câncer de mama maligno, as lâminas de congelamento foram preparadas por um método semelhante ao método acima e a coloração imuno-histoquímica foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal #6 preparado no Exemplo 4. Como resultado, a expressão CAPRIN- 1 foi confirmada em 100 de 108 espécimes (92,5%). CAPRIN-1 foi, sobretudo, expressa na superfície das células cancerosas altamente atípicas. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos quando o anticorpo monoclonal # 9 produzido no Exemplo 4 foi utilizado.

(7) -3 Expressão CAPRIN- 1 NO tecido humano de câncer de mama

A coloração imuno-histoquímica foi realizada utilizando 188 amostras de tecido de câncer de mama de uma matriz de tecido de câncer de mama humano inserido em parafinã (BIOMAX). Após 3 horas de tratamento em 60 ° C, a matriz do tecido de câncer de mama humano foi adicionado a um frasco de coloração preenchido com e xileno, em seguida, a substituição de xileno foi realizada três vezes a cada 5 minutos. Em seguida, um procedimento semelhante foi realizado utilizando etanol e PBS-T, ao invés de xileno. A matriz de tecido de câncer de mama humano foi adicionada a um frasco de coloração com 10 mM tampão de citrato (pH6,0) contendo 0,05% de Tween20, tratado por 5 minutos a 125 ° C, e depois deixado à temperatura ambiente por 40 minutos ou mais. O excesso de água em torno de cada amostra foi removido utilizando Kimwipes, cada seção foi cercada usando DAKOPEN, e, em seguida, uma quantidade adequada de Peroxidase Block (DAKO) foi adicionado gota a gota. O resultante foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 5 minutos e então adicionado a um frasco de coloração com PBS-T. A substituição de PBS-T a foi realizada três vezes cada 5 minutos. Como uma solução de bloqueio, a

solução de PBS-T contendo 10% FBS foi aplicada e, em seguida, deixada dentro de uma câmara úmida à temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, uma solução foi preparada para conter o anticorpo monoclonal #6 que reage com as superfícies de células cancerosas preparadas no Exemplo 4 em uma concentração de 10 μ g / ml, ajustado com uma solução PBS-T contendo 5% de PBS. A solução foi aplicada e, em seguida, deixada durante a noite dentro de uma câmara úmida a 4 ° C. Depois de 3 lavagens, cada uma 10 minutos, com PBS-T, uma quantidade adequada de Polímero Conjugado Marcado com Peroxidase (DAKO) foi adicionado gota a gota, e, em seguida, as lâminas de vidro foram deixadas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos dentro de uma câmara úmida. Depois de 3 lavagens, cada uma 10 minutos, com PBS-T, uma solução de coloração DAB (DAKO) foi aplicada e, em seguida, deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. A solução de coloração DAB foi descartada e, em seguida, realizou-se 10 minutos de lavagem com PBS-T por 3 vezes. As lâminas de vidro foram lavadas com água destilada e imersas em soluções de 70%, 80%, 90%, 95% e 100% de etanol nesta ordem para cada 1 minuto e, em seguida, deixadas em repouso em xilol durante a noite. As lâminas de vidro foram removidas, cobertas com as lamínulas com Glycergel Mounting Medium (DAKO), e, em seguida, observou-se. Como resultado, uma forte expressão CAPRIN-1 foi observada em 138 (73%) do total de 188 amostras de tecido de câncer de mama. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos quando o anticorpo monoclonal # 9 preparado no Exemplo 4 foi utilizado.

(7) -4 Expressão CAPRIN-1 no tumor maligno do cérebro humano

Com o uso de 247 espécimes do tumor maligno do cérebro d matriz de tecido de tumor maligno do cérebro inserido em parafina (BIOMAX), a coloração imuno-histoquímica foi realizada por um método semelhante ao de (7) -3 acima, usando o anticorpo monoclonal #6 preparado no Exemplo 4.

Como resultado, uma forte expressão CAPRIN-1 foi observada em 227 (92%) do total de 247 amostras de tecido do tumor maligno cerebral. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos quando o anticorpo monoclonal # 9 preparado no Exemplo 4 foi utilizado.

5 (7) -5 Expressão CAPRIN- 1 em linfonodo metastático de câncer de mama humano

Com o uso de 150 amostras de tecido de linfonodos metastáticos de câncer de mama humano de matrizes de tecido de linfonodos metastáticos de câncer de mama inseridos em parafina (BIOMAX), a coloração imuno-
 10 histoquímica foi realizada por um método semelhante ao de (7) -3 acima, usando o anticorpo monoclonal #6 preparado no Exemplo 4. Como resultado, uma forte expressão CAPRIN-1 foi observada em 136 (90%) do total de 150 amostras de tecido de linfonodos metastáticos de câncer de mama humano. Especificamente, foi revelado que o CAPRIN-1 também é fortemente expresso
 15 em um tecido de câncer que tem metástase do câncer de mama. Além disso, resultados semelhantes foram obtidos quando o anticorpo monoclonal # 9 preparado no Exemplo 4 foi utilizado.

EXEMPLO 2: EFEITOS ANTI TUMOR (ATIVIDADE ADCC) DE ANTICORPO CONTRA CAPRIN-1 EM CÉLULAS CANCEROSAS

20 Em seguida, analisou-se se um anticorpo contra CAPRIN-1 seria capaz de danificar as células tumorais que expressam CAPRIN- 1. A avaliação foi realizada utilizando o anticorpo policlonal contra um peptídeo derivado de CAPRIN- 1 humano preparado no Exemplo 1. Dois tipos de linhas celulares do câncer de mama humano (T47D e MDA-MB-157) (10^6 células cada), em que
 25 a expressão CAPRIN- 1 foi confirmada, foram recolhidos separadamente em um tubo de centrífuga de 50 ml. O cromo 51(100 μ Ci) foi adicionado, seguido de incubação a 37 ° C por 2 horas. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com um meio RPMI1640 contendo 10% de soro fetal bovino e

adicionado ao poço (10^3 células por poço) em uma placa de 96 poços com fundo em V. Os anticorpos policlonais acima contra um peptídeo derivado humano CAPRIN- 1 foram adicionados ($1\mu\text{g}$ por poço). Além disso, os linfócitos separados do sangue periférico de coelho foram adicionados da mesma (2×10^5 células por poço), seguido pela cultura em condições de 37°C e $5\% \text{CO}_2$ por 4 horas. Após a cultura, o nível de cromo (Cr) 51 liberado pelas células danificadas do tumor foi determinado em cada sobrenadante da cultura. Em seguida, foi calculada a atividade ADCC do anticorpo policlonal contra um peptídeo humano derivado CAPRIN- 1 para células cancerosas. Como resultado, as atividades ADCC contra T47D (15,4%) e MDA-MB-157 (17,3%) foram confirmadas (Veja Figuras 2 e 3). Enquanto isso, substancialmente nenhuma atividade foi observada em um caso em que um processo semelhante ao anterior foi realizado com o anticorpo de controle preparado de sangue periférico de um coelho que não havia sido imunizado com um antígeno (Exemplo 1(5)) ou em um caso em que o anticorpo não foi adicionado (veja Figuras 2 e 3). Assim, revelou-se que as células tumorais que expressam CAPRIN- 1 podem ser danificadas por indução de atividade ADCC com o uso de um anticorpo contra CAPRIN- 1.

Além disso, para atividade citotóxica, um anticorpo contra CAPRIN-1 usado na presente invenção, os linfócitos de camundongos e 10^3 células incorporando cromo 51 de uma linha celular de leucemia foram misturados e cultivados por 4 horas. Depois disso, foi determinado o nível de cromo 51 liberado no meio. Em seguida, a atividade citotóxica da linha de células de leucemia foi calculada pela seguinte equação *.

* Equação: Atividade citotóxica (%) = $\left[\frac{\text{(nível de cromo 51 liberado de T47D ou MDA-MB-157 em que um anticorpo contra CAPRIN- 1 e os linfócitos de camundongos foram adicionados)}}{\text{(nível de cromo 51 lançado pelas células-alvo em que o ácido clorídrico foi adicionado)}} \right] \times 100$

EXEMPLO 3: PREPARAÇÃO DE NOVAS PROTEÍNAS DE ANTÍGENOS DE CÂNCER HUMANO

(1) Preparação de proteína recombinante

Uma proteína recombinante de um gene homólogo humano foi elaborada pelo seguinte método baseado no gene da SEQ ID NO: 1 obtida no

5 Exemplo 1. O PCR foi realizado repetindo 30 vezes um ciclo de 98 °C/ 10 segundos e 68 °C / 2,5 minutos usando um Termociclador (BIO RAD) e uma solução de reação ajustada a uma quantidade total de 50 µl através da adição de cada reagente e um tampão ligado (1µl de cDNA (que era de uma variedade derivada de tecido/ célula de cDNA preparada no Exemplo 1 e observada por
10 sua expressão RT-PCR), 2 tipos de iniciadores (0,4 µM cada; SEQ ID NO: 38 e 39), contendo sequências de clivagem por enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*, 0,2 mM dNTP, 1,25 U polimerase Primestar HS (Takara Shuzo)). Os 2 tipos acima de iniciadores foram utilizados para ampliar a região codificando a sequência de aminoácidos completa da SEQ ID NO: 2. Após o PCR, o DNA
15 amplificado foi submetido, assim, a 1% de eletroforese em gel de agarose, em seguida, um fragmento de DNA de cerca de 2,1 kbp foi purificado através de QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

O fragmento de DNA purificado foi ligado a um vetor de clonagem PCR-Blunt (Invitrogen) vetor foi transformado em *Escherichia coli* e, em
20 seguida, o plasmídeo foi coletado. Foi confirmado com base na sequência que o fragmento do gene amplificado combinou com a sequência alvo. O plasmídeo que combinou com a sequência de interesse foi tratado com enzimas de restrição *SacI* e *XhoI* e, em seguida, o resultante foi purificado através do QIAquick Gel Extraction Kit. Em seguida, a sequência do gene de interesse foi
25 inserida em um vetor de expressão pET30a (Novagen) por *Escherichia coli* tratada com enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*. Uma proteína His recombinante fundida pode ser produzida usando o vetor. O plasmídeo foi transformado em *Escherichia coli* BL21 (DE3) para expressão e, em seguida, a indução de

expressão foi realizada utilizando 1 mM IPTG, de modo que a proteína alvo foi expressa na *Escherichia coli*.

(2) Purificação de proteína recombinante

Cada *Escherichia coli* recombinante obtida acima expressando a

5 SEQ ID NO: 1 foi cultivada a 37 °C no meio LB contendo 30 µg/ml de canamicina até a absorbância a 600 nm atingir cerca de 0,7. Então o isopropil-β-D-1 tiogalactopiranosideo foi adicionado a uma concentração final de 1 mM, seguido de 4 horas de cultivo a 37 °C. Posteriormente, as células foram coletadas por 10 minutos em centrifugação a 4800 rpm. O sedimento celular foi
10 suspenso em uma solução salina de tampão fosfato e centrifugada a 4800 rpm por 10 minutos para lavar as células.

As células foram suspensas em tampão fosfato e, em seguida, submetidas a ultrassom em gelo. O lisado sonificado de *Escherichia coli* foi centrifugado a 6000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante obtido foi utilizado
15 como uma fração solúvel e o precipitado obtido foi utilizado como uma fração insolúvel.

A fração solúvel foi adicionada a uma coluna de quelato de níquel (estacionária: Chelating Sepharose (marca registrada) Fast Flow (GE Healthcare), capacidade da coluna: 5 ml, 50 mM de tampão ácido clorídrico (pH 8,0) como tampão equilibrado)) preparado de acordo com o método convencional . A fração não adsorvida foi lavada com tampão de 50 mM de ácido clorídrico (pH 8,0) em uma quantidade 10 vezes a capacidade da coluna e 20 mM de tampão fosfato (pH 8,0) contendo 20 mM de imidazol. Imediatamente após a lavagem, 6 leitos (*beds*) foram eluídos com 20 mM de
25 tampão fosfato (pH 8,0) contendo 100 mM de imidazol. Uma fração de eluição de 20 mM de tampão fosfato (pH 8,0) contendo 100 mM de imidazol (para o qual a eluição da proteína de interesse foi confirmada pela coloração Coomassie) foi adicionada a uma forte coluna de troca aniônica

(transportadora: Q Sepharose (marca registrada) Fast Flow (GE Healthcare), capacidade da coluna: 5 ml, e 20 mM de tampão fosfato (pH 8,0) como tampão equilibrado).

5 A fração não absorvida foi lavada com 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) em uma quantia de 10 vezes a capacidade da coluna e 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) contendo 200 mM de cloreto de sódio. Imediatamente após a lavagem, 5 leitos foram eluídos usando-se 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) contendo 400 mM de cloreto de sódio. Assim, purificadas as frações de proteínas, cada uma tendo a sequência de aminoácido mostrada na SEQ ID
10 NO: 2 foram obtidas.

200 µl de cada preparação purificada obtida pelo método acima foi distribuída em 1 ml de tampão de reação (20 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ pH 7,4) e então, 2 µl de enteropeptidase (Novagen) foi adicionado. A preparação foi deixada em repouso a temperatura ambiente durante a noite
15 para reação, o His tag foi segmentado e então foi realizada a purificação de acordo com os protocolos anexos usando-se um kit de Captura de Segmentação de Enteropeptidase (Novagen). Em seguida, 1.2 ml de cada preparação purificada obtida pelo método acima foi substituída por tampão fosfato fisiológico (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) com o uso de ultra filtração
20 NANOSEP 10K OMEGA (PALL). Foi realizada filtração esterilizada usando-se 0.22-µm de HT Tuffryn Acrodisc (PALL) e então, os resultados foram usados para os seguintes experimentos.

EXEMPLO 4: PREPARAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL EM OPOSIÇÃO A CAPRIN-1

25 A proteína de antígeno (CAPRIN-1 humana) (100 µg) mostrada na SEQ ID NO: 2 preparada no Exemplo 3 foi misturada com um adjuvante MPL+TDM (Sigma) em uma quantia equivalente àquela de proteína de antígeno. A mistura foi usada com uma solução de antígeno conforme o camundongo. A solução de antígeno foi administrada por via intraperitoneal em

camundongos Balb/c de 6 semanas de vida (Japan SLC Inc.) e então, mais adiante, administrada 3 vezes ou 24 vezes toda semana para completa imunização. O baço foi removido no dia 3 após a imunização final e então triturado entre duas lâminas de vidro esterilizadas. Cada resultado foi lavado com PBS (-) (Nissui) e então centrifugado a 1500 RPM por 10 minutos, assim esse procedimento para remoção de sobrenadantes foi repedido 3 vezes. Assim, as células do baço foram obtidas. As células de baço assim obtidas foram misturadas à célula de mieloma de camundongo SP2/0 (comprada da ATCC) a uma proporção de 10 : 1. A solução de PEG foi preparada através da mistura de 200 µl de meio RPMI1640 contendo 10% de FBS aquecido a 37°C e 800 µl de PEG1500 (Boehringer) foi adicionado às células. A solução foi deixada em repouso por 5 minutos por fusão de célula. A centrifugação foi realizada a 1700 RPM por 5 minutos para remoção de sobrenadantes. As células foram suspensas em 150 ml de meio RPMI1640 (meio seletivo HAT) contendo 15% de FBS, do qual o equivalente a 2% de solução de HAT (Gibco) foi adicionado e então foram semeadas em quinze placas de 96 poços (Nunc) a 100 µl por poço. As células foram cultivadas por 7 dias sob condições de 37°C e 5% CO₂, de forma que hibridomas resultantes da fusão das células do baço com as células de mieloma foram obtidos.

Os hibridomas foram selecionados usando-se como um indicador a afinidade de ligação do anticorpo produzido pelos assim preparados hibridomas pela proteína CAPRIN-1. A solução de proteína CAPRIN-1 (1 µg/ml) preparada no Exemplo 3 foi adicionada a 100 µl por poço das placas de 96 poços e então deixada em repouso a 4°C por 18 horas. Cada cavidade foi lavada 3 vezes com PBS-T, 0.5% de solução de Albumina de Soro Bovino (BSA) (Sigma) foi adicionada a 400 µl por poço e então as placas foram deixadas em repouso a temperatura ambiente de por 3 horas. A solução foi removida e então cada cavidade foi lavada 3 vezes com 400 µl de PBS-T.

Cada sobrenadante da cultura de hibridomas obtidas acima foi adicionado em 100 µl por poço e então deixado em repouso a temperatura ambiente por 2 horas. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS-T, um anticorpo anti-camundongo IgG (H+L) classificado por HRP (Invitrogen) diluído 5000 vezes com PBS foi adicionado em 100 µl por cavidade e então deixado em repouso a temperatura ambiente por 1 hora. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS-T, uma solução de substrato de TMB (Thermo) foi adicionada a 100 µl por poço então deixado em repouso por 15 a 30 minutos, até que uma reação de cor se realizou. Após desenvolvimento de cor, ácido sulfúrico 1N foi adicionado em 100 µl por poço para parar a reação. Absorbância a 450 nm e absorbância a 595 nm foram medidas com uso de um espectrômetro de absorção. Como um resultado, uma pluralidade de hibridomas produzindo anticorpos com alta absorbância foi selecionada.

Os hibridomas assim selecionados foram adicionados a 0,5 hibridomas por poço de placas de 96 poços e então cultivadas. Após 1 semana, foram observados os hibridomas formando uma única colônia nos poços. As células em tais poços foram ainda cultivadas. Os hibridomas foram selecionados com o uso de um indicador de afinidade de ligação (do anticorpo produzido por hibridomas clonados) pela proteína CAPRIN-1n. A solução de proteína CAPRIN-1 (1 µg/ml) preparada no Exemplo 3 foi adicionada a 100 µl por poço em placas de 96 poços e deixadas em repouso a 4°C por 18 horas. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS-T, uma solução de BSA a 0.5% foi adicionada a 400 µl por poço e então deixado em repouso à temperatura ambiente por 3 horas. A solução foi removida e então cada poço foi lavado 3 vezes com 400 µl de PBS-T. Cada sobrenadante de cultura de hibridomas obtidos acima foi adicionado a 100 µl por poço e então deixado em repouso à temperatura ambiente por 2 horas. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS-T, um anticorpo marcado com HRP anti- IgG (H+L) de camundongo (Invitrogen)

diluído 5000 vezes com PBS foi adicionado a 100 µl por poço e então deixado em repouso a temperatura ambiente por 1 hora. Cada poço foi lavado 3 vezes com PBS-T, uma solução de substrato de TMB (Thermo) foi adicionada a 100 µl por poço e deixada em repouso por 15 a 30 minutos, até que uma reação de cor se realizou. Após o desenvolvimento da cor, ácido sulfúrico 1N foi adicionado a 100 µl por poço para parar a reação. A absorbância a 450 nm e a absorbância a 595 nm foram medidas com o uso de um espectrômetro de absorção. Como um resultado, foram obtidas linhagens de célula de hibridoma 150 produzindo anticorpos monoclonais exercendo reatividade com a proteína CAPRIN-1.

A seguir, dentre estes anticorpos monoclonais, anticorpos monoclonais exercendo reatividade com as superfícies de células de câncer de mama expressando CAPRIN-1 foram selecionadas. Especificamente, 10⁶ células da linhagem de células de câncer de mama humano MDA-MB-231V foram submetidas à centrifugação com um tubo de micro centrífuga de 1.5-ml. O sobrenadante (100 µl) de cada hibridoma acima foi adicionado e deixado em repouso em gelo por 1 hora. Após a lavagem com PBS, um anticorpo IgG anti-camundongo de cabra marcado com FITC (Invitrogen) diluído 500 vezes com PBS contendo 0,1% de FBS foi adicionado e deixado em repouso em gelo por 1 hora. Após a lavagem com PBS, a intensidade de fluorescência foi medida usando-se FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Enquanto isso, um procedimento similar ao anterior foi realizado usando-se soro não tratado de camundongos Balb/c de 6 semanas de vida diluído 500 vezes com um meio de cultura de hibridoma ao invés do anticorpo até que um controle foi preparado. Como um resultado, 11 anticorpos monoclonais (#1 a #11) tendo intensidade de fluorescência mais forte do que o controle, isto é, reagindo com as superfícies das células de câncer de mama foram selecionados.

EXEMPLO 5: CARACTERIZAÇÃO DOS ANTICORPOS SELECIONADOS

(1) Clonagem de um gene de região variável de anticorpo monoclonal anti-CAPRIN-1 mRNAs foi extraída de linhagens de célula de hibridoma produzindo os 11 anticorpos monoclonais selecionados no Exemplo 4. O gene de região variável de cadeia pesada (VH) e o gene de região variável de cadeia leve (VL) para cada anticorpo monoclonal anti-CAPRIN-1 foi obtido por RT-PCR usando-se iniciadores específicos para uma sequência derivada por FR1 de camundongo e uma sequência derivada por FR4 de camundongo. Para sequenciamento, os genes foram separadamente clonados em vetores pCR2.1 (Invitrogen).

(1)-1 RT-PCR

mRNA foi preparado a partir de cada linhagem de célula de hibridoma (10^6 células) com o uso de um kit de micro purificação mRNA (GE Healthcare). Cada mRNA obtida foi sujeitada a transcrição reversa com o uso de um kit de síntese de primeiro cordão SuperScriptII (Invitrogen) para síntese de cDNA. Os procedimentos anteriores foram realizados de acordo com os protocolos anexos aos kits.

Cada cDNA obtido foi usado para amplificação de gene anticorpo por PCR.

Com o intuito de obter o gene de região VH, um iniciador específico para uma sequência FR1 de cadeia pesada de camundongo (SEQ ID NO: 130) e um iniciador específico para uma sequência FR4 de cadeia pesada de camundongo (SEQ ID NO: 131) foram usados. Adicionalmente, com o intuito de obter o gene de região VL, um iniciador específico para uma sequência FR1 de cadeia leve de camundongo (SEQ ID NO: 132) e uma sequência FR4 de cadeia leve de camundongo (SEQ ID NO: 133) foram usados. Estes iniciadores foram determinados com referência em Jones, S. T. e Bending, M. M. Bio/Technology 9, 88-89 (1991). Para PCR, um termoestável

(Takara Bio Inc.) foi usado. Cada amostra de cDNA foi misturada com um tampão de 10 x termoestável (5 µl), Mistura de dNTPs (2,5 mM) (4 µl), iniciadores (1.0 µM) (2 µl cada), e termoestável (5U/µl) (0.25 µl). O volume total foi ajustado para 50 µl com água esterilizada. O PCR foi realizado sob condições que compreendem, após tratamento a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de uma combinação de desnaturação a 94°C por 1 minuto, temperada a 58°C por 30 segundos e reação de prolongamento a 72°C por 1 minuto.

(1)-2 Clonagem

Cada produto de PCR obtido anteriormente foi submetido à eletroforese em gel de agarose, seguido por excisão de bandas de DNA da região VH e da região VL. O DNA foi purificado com uso de um kit de purificação de Gel QIAquick (QIAGEN) de acordo com os protocolos anexos ao kit. Cada DNA purificado foi clonado em um vetor pCR2.1 usando-se um kit de clonagem TA (Invitrogen). Cada vetor ligado por DBA foi transformado em células competentes DH5a (TOYOBO) de acordo com um método convencional. Cada transformante (10 clones) foi cultivado durante a noite em um meio (100 µg/ml de ampicilina) a 37°C. O DNA plasmídeo obtido foi purificado com o uso de um kit Qiaspin Miniprep (QIAGEN)

(1)-3 Sequenciamento

A análise de sequência de gene da região VH e da região VL em cada plasmídeo obtido anteriormente foi realizada usando-se um iniciador direto M13 (SEQ ID NO: 134) e um iniciador reverso M13 (SEQ ID NO: 135) com um sequenciador fluorescente (ABI; sequenciador de DNA 3130XL) e um terminador BigDye kit de sequenciamento de ciclo (ABI) Versão 3.1 de acordo com os protocolos anexos ao kit. Como um resultado, cada sequência de gene (idêntica em 10 clones) foi determinada.

As sequências de aminoácidos obtidas das regiões variáveis de cadeia pesada de anticorpo monoclonal são mostradas em SEQ ID NO: 43,

SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 113 e SEQ ID NO: 123. As sequências de aminoácido obtidas das regiões variáveis de cadeia leve são mostradas em SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 117 e SEQ ID NO: 127.

Especificamente, um anticorpo monoclonal #1 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 47. Um anticorpo monoclonal #2 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 43 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 53. Um anticorpo monoclonal #3 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 43 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 58. Um anticorpo monoclonal #4 compreende a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 43 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 63. Um anticorpo monoclonal #5 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 43 e a região variável de cadeia leve da of SEQ ID NO: 68. Um anticorpo monoclonal #6 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 73 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 77. Um anticorpo monoclonal #7 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 83 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 87. Um anticorpo monoclonal #8 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 93 e região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 97. Um anticorpo monoclonal #9 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 103 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 107. Um anticorpo monoclonal #10 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 113 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 117. Um anticorpo monoclonal #11 compreende a região variável de cadeia pesada da SEQ ID NO: 123 e a região variável de cadeia leve da SEQ ID NO: 127.

(2) Expressões da CAPRIN-1 na superfície das células de

diferentes células causadas com o uso dos anticorpos monoclonais obtidos

A seguir, foi examinado se a proteína CAPRIN-1 foi ou não expressa nas superfícies das células de 7 tipos de linhagens de célula de câncer de mama (MDA-MB-157, T47D, MRK-nu-1, MDA-MB-231V, BT20, SK-BR-3, e DA-MB-231T) nas quais a expressão do gene CAPRIN-1 gene foi confirmada, 3 tipos de outras linhagens de célula de câncer de mama (MDA-MB-231C, MCF-7 e ZR75-1), 6 tipos de linhagens de célula de glioma (T98G, SNB19, U251 e U87G), 3 tipos de linhagens de célula de câncer de rim (Caki-1, Caki2 e A498), 1 tipo de uma linhagem de célula de câncer de estômago (MKN45), 1 tipo de uma linhagem de célula de câncer de cólon (Caco2), 3 tipos de linhagens de célula de câncer de pulmão (A549, QG56 e PC8), e 3 tipos de linhagens de célula de leucemia (Namalwa, BDCM e RPI1788). Cada linhagem de célula (10^6 células) foi centrifugada e, um tubo de microcentrífuga de 1.5-ml. Os sobrenadantes de hibridoma (100 μ l cada) contendo anticorpos monoclonais #1 a #10 contra CAPRIN-1, preparados no Exemplo 4, e que reagem com a superfície de células de câncer, foram separadamente adicionados, e então deixados em repouso em gelo por 1 hora. Após a lavagem com PBS, cada resultante foi suspenso em um anticorpo IgG anti-camundongo de cabra marcado com FITC (Invitrogen Corporation) diluído 500 vezes com PBS contendo 0.1% de FBS e então deixado em repouso em gelo por 1 hora. Após a lavagem com PBS, a intensidade de fluorescência foi medida com o uso de FACSCalibur (Becton, Dickinson and Company). Enquanto isso, um procedimento similar ao anterior foi realizado usando-se, como controle, o anticorpo de controle preparado em (5) anteriormente ao invés dos sobrenadantes de hibridoma contendo anticorpos monoclonais #1 a #11 contra CAPRIN-1, até que o controle fosse preparado. Como resultado, a intensidade de fluorescência encontrada estava, pelo menos, 30% mais forte em todas as células as quais os anticorpos monoclonais #1 a #11 foram

adicionados do que nas células de controle. Especificamente, os seguintes aumentos na intensidade de fluorescência foram confirmados quando, por exemplo, o anticorpo monoclonal #9 foi usado: MDA-MB-157: 211%; T47D: 145%; MRK-nu-1: 123%; MDA-MB-231V: 251%; BT20: 168% e MDA-MB-231T: 94%. Baseado no anterior, foi confirmado que a proteína CAPRIN-1 foi expressa nas superfícies da célula das linhagens de célula de câncer humanas anteriores. Adicionalmente, a taxa de aumento na intensidade de fluorescência é representada em intensidade de fluorescência de meio (valor de MFI) em células. Este foi calculado pela seguinte equação.

10 Taxa de aumento em intensidade de fluorescência de meio (taxa de aumento em intensidade de fluorescência) (%) = ((valor de MFI das células que reagiram com um anticorpo CAPRIN-1 anti-humano) – (valor de MFI de controle)) / (valor de MFI de controle) × 100

(3) Efeitos antitumorais (atividade de ADCC) dos anticorpos
15 contra CAPRIN-1 mediante células de câncer

Os anticorpos monoclonais selecionados anteriormente #1 a #11 contra CAPRIN-1 foram avaliados em termos de atividade citotóxica (atividade de ADCC) para células de câncer. Os hibridomas produzindo anticorpos monoclonais #1 a #11 foram cultivados com o uso de um meio SFM de
20 hibridoma (Invitrogen). Cada sobrenadante obtido foi purificado usando-se Hitrap ProteinA Sepharose FF (GE Healthcare), seguido por substituição por PBS (-) e purificação com um filtro de 0.22-μm (Millipore). Cada resultante foi usado como um anticorpo para determinação de atividade. A linhagem de célula de câncer de mama humana MDA-MB-157 (10⁶ células) foi coletada em
25 um tubo de centrifuga de 50-ml. Cromo 51 (100 μCi) foi adicionado a este, seguido por incubação a 37°C por 2 horas. A partir daí, as células foram lavadas 3 vezes com um meio RPMI1640 contendo 10% de FBS. As células foram adicionadas às cavidades (10³ células por cavidade) em placas de 96

poços de fundo em V. Assim, células de alvo foram preparadas. Os anticorpos anteriormente purificados foram adicionados a estas (1 µg por poço). A seguir, linfócitos de camundongo separados de baço de camundongo (2×10^5 células) foram adicionados a este, seguido por cultura sob condições de 37°C e 5% CO₂ por 4 horas. Após a cultura, o nível de cromo (Cr) 51 liberado a partir de células de tumor danificadas em cada sobrenadante de cultura foi determinado. Então, a atividade de ADCC de cada anticorpo policlonal contra um peptídeo derivado por CAPRIN-1 humano para células de câncer foi calculada. Como resultado, todos os anticorpos monoclonais #1 a #11 exibiram atividade de ADCC contra MDA-MB-157 (20% ou mais).

Especificamente, por exemplo, os seguintes resultados de atividade citotóxica foram obtidos: N°1: 22,1%; N°2: 29,1%; N°6: 30,2%; e N°9: 32,4% (ver Fig. 4). Enquanto isso, nenhuma atividade citotóxica foi confirmada num caso no qual um procedimento parecido ao acima foi realizado usando o anticorpo monoclonal reativo a um CAPRIN-1 proteína em si, mas não para superfícies de células cancerígenas preparada no Exemplo 4 (ver Fig. 4). Os resultados acima mostraram que a anti-CAPRIN-1 obtida anticorpos monoclonais (N°1 a N°11) danificaram CAPRIN-1-expressando células cancerígenas exibindo atividade ADCC.

(4) Efeitos antitumorais (atividade CDC) de anticorpos contra CAPRIN-1 sobre células cancerígenas

Os anticorpos monoclonais selecionados N°1 a N°11 contra CAPRIN-1 foram avaliados em termos de atividade citotóxica (atividade CDC) para células cancerígenas. Sangue coletado de coelhos por amostras de sangue foi adicionado a um tubo Eppendorf e então deixado à temperatura ambiente por 60 minutos, seguido por centrifugação em 3000 rpm por 5 minutos. Assim, o soro para determinação de atividade CDC foi preparado. O câncer de mama humano MDA-MB-231V da linha de célula (10^5 células) foi

coletado em um tubo de 50-ml centrífugo. Cromo 51 (100 μ Ci) foi adicionado a isto, seguido de incubação a 37°C por 2 horas. Em seguida, células foram lavadas 3 vezes com um RPMI médio contendo 10% FBS e então suspensas em um RPMI contendo 50% de soro de coelho preparado acima. As células foram adicionadas aos poços (10^3 células por poço) em placas de 96 poços de fundo em V. Os anticorpos Nº1 a Nº11 obtidos em (3) acima foram separadamente adicionados aos poços (1 μ g por poço), seguido por cultura sob condições de 37°C e 5% CO₂ para 4 horas. Após a cultura, foi determinado o nível de cromo (Cr) 51 liberado das células de tumor danificadas em cada sobrenadante de cultura. A atividade CDC contra MDA-MB-231V exibida pelo anticorpo monoclonal anti-CAPRIN-1 em cada sobrenadante de hibridoma foi calculada. Como resultado, todos os anticorpos monoclonais Nº1 a Nº11 exibiram atividade CDC (30% ou mais). Enquanto isso, não foi confirmada atividade citotóxica em um caso em que um procedimento parecido com o acima foi realizado usando o anticorpo monoclonal reativo a proteína CAPRIN-1 em si, mas não para superfícies de células cancerígenas preparadas no Exemplo 4 (ver Fig. 4). Por conseguinte, foi revelado que os anticorpos monoclonais contra CAPRIN-1 (Nº1 a Nº11) podem danificar células de tumor que expressam CAPRIN-1 também exibindo atividade CDC.

20 **EXEMPLO 6: EFEITOS ANTITUMORAIS *IN VIVO* DE ANTICORPOS MONOCLONAIS-1 EM CAMUNDONGOS.**

Próximo, efeitos antitumorais *in vivo* dos anticorpos monoclonais Nº1 a Nº11 contra CAPRIN-1 em camundongos portadores de tumor foram avaliados. Anticorpos usados neste Exemplo foram obtidos após submeter o sobrenadante de cada hibridoma à purificação em coluna da maneira descrita acima.

Efeitos de antitumorais dos anticorpos monoclonais Nº1 a Nº11 contra CAPRIN-1 foram examinados usando camundongos portadores de

tumor em que uma linhagem de células cancerígenas derivadas de camundongo expressando CAPRIN-1 foi transplantada. Células CT26 (adquirida de ATCC) foram transplantadas de maneira subcutânea nas partes dorsais de 70 camundongos Balb/c (Japão SLC, Inc.) (10^6 células por camundongo). Permitiu-se que cada tumor crescesse até o diâmetro atingir aproximadamente 7 mm. Os camundongos portadores de tumor (60 de 70) foram submetidos à administração peritoneal de anticorpos monoclonais N°1 a N°11 contra CAPRIN-1 e um tipo de anticorpo monoclonal (reativo a proteína CAPRIN-1 em si, mas não para superfícies de células cancerígenas) preparado no Exemplo 4 (5 camundongos por anticorpo) a uma dose de 300 µg (300 µl) por camundongo. Em seguida, cada anticorpo foi intraperitonealmente administrado na mesma dose para camundongos portadores de tumor relevantes 3 vezes no total durante 2 dias. O tamanho do tumor foi medido todos os dias para observação de efeitos de antitumorais. Os 10 camundongos portadores de tumor restantes foram submetidos à administração de PBS (-) ao invés de um anticorpo. O grupo desses camundongos foi designado como um grupo de controle. Como um resultado da observação de efeitos de antitumorais, no caso do grupo de teste ao qual anticorpos monoclonais N°1 a N°11 contra CAPRIN-1 foram administrados, a regressão do tumor ocorreu a uma extensão a qual o volume do tumor no início da administração de anticorpo de (100%) decresceu para 50% no Dia 4, aproximadamente 10% no Dia 6, e a muitos por centos no Dia 8. Substancialmente a completa regressão do tumor ocorreu de Dia 11 a 14 (ver Fig. 5). Por outro lado, no grupo de controle, o volume do tumor aumentou para aproximadamente 260%, 350%, 550%, e 800% do volume original nos Dias 4, 6, 8, e 11, respectivamente (ver Fig. 5). Além disso, no grupo de camundongos no qual anticorpo monoclonal (reativo a própria proteína CAPRIN-1, mas não às superfícies de células cancerígenas) foi administrado, efeitos de antitumorais não puderam ser

exibidos e o crescimento do tumor ocorreu como no grupo de controle. Os resultados indicam que os anticorpos monoclonais obtidos N°1 a N°11 contra CAPRIN-1 exibiram forte efeito antitumoral *in vivo* sobre células cancerígenas expressando CAPRIN-1. Além disso, o tamanho do tumor foi obtido calculando
 5 o volume do tumor pela seguinte fórmula: diâmetro maior x diâmetro menor x diâmetro menor x 0,5.

Além disso, anticorpos monoclonais N°1 a N°11 contra CAPRIN-1 foram administrados da maneira descrita acima para camundongos portadores de tumor (Balb/c) nos quais células cancerígenas N1E de camundongo
 10 (adquiridas de ATCC) foram transplantadas. Isto resultou na regressão completa do tumor no Dia 15 após administração de anticorpo. Por outro lado, no grupo de controle, o volume do tumor cresceu a aproximadamente 950% do volume original (ver Fig. 6).

EXEMPLO 7: A IDENTIFICAÇÃO DE UM PEPTÍDEO NA PROTEÍNA CAPRIN-1, AO QUAL

15 **UM ANTICORPO CONTRA CAPRIN-1 REAGENTE À SUPERFÍCIE DE CÉLULA**
CANCERÍGENA SE LIGA.

Com o uso de anticorpos monoclonais N°1 a N°11 contra CAPRIN-1, reagindo com as superfícies de células cancerígenas (obtidas acima), sequências parciais na Proteína CAPRIN-1 foram identificadas para
 20 serem reconhecidas por esses anticorpos monoclonais.

Primeiro, DTT (Fluka) foi adicionado a 100 µl de uma solução preparada dissolvendo uma Proteína CAPRIN-1 recombinante a uma concentração de 1 µg/µl com PBS para uma concentração final de 10 mM, seguido por 5 minutos de reação a 95°C, assim essa redução de pontes de
 25 dissulfeto dentro da Proteína CAPRIN-1 foi realizada. A seguir, iodoacetamida (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) com uma concentração final de 20 mM foi adicionada e então uma reação de alquilação foi realizada para grupos tiol a 37°C por 30 minutos sob condições de sombreamento. Cinquenta (50) µg de

cada anticorpo monoclonal N°1 a N°11 contra CAPRIN-1 foram adicionados a 40 µg da assim obtida proteína CAPRIN-1 reduzida-alquilada, o volume da mistura foi ajustado para 1 mL de 20 mM tampão fosfato (pH 7.0), e então a mistura foi deixada para reagir durante a noite a 4°C enquanto se agitava cada
5 mistura.

A seguir, tripsina (Promega) foi adicionada a uma concentração final de 0,2 µg. Depois de 1 hora, 2 horas, 4 horas, e então 12 horas de reação a 37°C, os resultantes foram misturados com microesferas de vidro da proteína A (GE), que foram submetidas antecipadamente a bloqueio com PBS contendo
10 1% BSA (Sigma) e então a lavagem com PBS, em 1 mM de carbonato de cálcio e tampão NP-40 (20 mM tampão de fosfato (pH 7,4), 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, e 1% NP-40), seguido por 30 minutos de reação.

As misturas de reação foram lavadas cada uma com 25 mM de tampão de carbonato de amônio (pH 8,0) e então complexos de anticorpo
15 antígeno foram eluídos usando 100 µl de ácido fórmico a 0,1%. A análise LC-MS foi conduzida para os eluatos utilizando o Q-TOF Premier (Waters-MicroMass) de acordo com os protocolos anexados ao instrumento.

Como resultado, o polipeptídeo de SEQ ID NO: 136 foi identificado como uma sequência parcial de CAPRIN-1, a qual foi reconhecida por todos os
20 anticorpos monoclonais N°1 a N°11 contra CAPRIN-1. Além disso, o peptídeo da SEQ ID NO: 137 foi identificada como uma sequência parcial no polipeptídeo da SEQ ID NO: 136 acima, cujo peptídeo foi reconhecido pelos anticorpos monoclonais N°2 a N°5, N°6 a N°8, e N°10. Foi adicionalmente revelado que os anticorpos monoclonais N°2 a N°5 reconheceram o peptídeo
25 de SEQ ID NO: 138 que foi um peptídeo de sequência parcial do peptídeo de SEQ ID NO: 137.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

Os anticorpos da presente invenção são úteis para tratamento

e/ou prevenção de cânceres.

Esta descrição inclui todo ou parte do conteúdo como revelado na descrição e/ou desenhos do Pedido de Patente Japonesa No. 2009-087285, do qual o presente pedido reivindica a prioridade. Além disso, todas as
5 publicações, patentes, e pedidos de patentes, citados na presente são incorporados a presente por referência em sua integralidade.

TEXTO LIVRE DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

Iniciadores: SEQ ID NOs: 31 a 39 e 130 a 135

REIVINDICAÇÕES

1. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA para o tratamento e/ou prevenção de um câncer, caracterizada pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, um anticorpo ou um fragmento do mesmo que tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1, que tem uma sequência de aminoácidos mostrada em uma dentre as sequências de numeração par das SEQ ID NOs: 2 a 30, ou uma sequência de aminoácidos que tem 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos, ou com um fragmento da proteína CAPRIN-1 compreendendo 7 ou mais aminoácidos consecutivos.

2. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, um anticorpo ou um fragmento do mesmo que tem reatividade imunológica a um fragmento da proteína CAPRIN-1, que é um polipeptídeo que consiste em uma sequência de 7 ou mais aminoácidos consecutivos na região de resíduos de aminoácidos N^{os} 50 a 98 ou resíduos de aminoácido N^{os} 233 a 305, em uma sequência de aminoácidos mostrada em uma dentre as sequências de numeração par das SEQ ID NOs: 2 a 30, excluindo as SEQ ID NOs: 6 e 18, ou um polipeptídeo compreendendo o polipeptídeo como uma sequência parcial.

3. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, um anticorpo ou um fragmento do mesmo que tem uma reatividade imunológica a um polipeptídeo parcial de CAPRIN-1, que tem uma sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 37 ou SEQ ID NO: 136, ou uma sequência de aminoácidos que tem 80% ou mais de identidade com a sequência de aminoácidos, ou com um fragmento do polipeptídeo parcial compreendendo 7 ou mais aminoácidos consecutivos.

4. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o câncer é câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer esofágico ou câncer de cólon.

5 5. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal ou policlonal.

6. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, de acordo com uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia única ou um anticorpo biespecífico.

7. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que tem uma reatividade imunológica a um polipeptídeo que tem a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO: 37 ou SEQ ID NO: 136, ou uma sequência de aminoácidos que tem 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos.

8. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 44, 45 e 46, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

9. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 50, 51 e 52, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

10. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências

mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 55, 56 e 57, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

11. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende
5 uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 60, 61 e 62, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

12. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende
10 uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 40, 41 e 42, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 65, 66 e 67, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

13. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende
15 uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 70, 71 e 72, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 74, 75 e 76, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

14. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende
20 uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 80, 81 e 82, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 84, 85 e 86, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

15. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende
25 uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 90, 91 e 92, e uma região variável de cadeia leve compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 94, 95 e 96, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

16. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 100, 101 e 102, e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 104, 105 e 5 106, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

17. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 110, 111 e 112, e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 114, 115 e 10 116, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

18. ANTICORPO, caracterizado pelo fato de que compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 120, 121 e 122, e uma região variável de cadeia leve que compreende as sequências mostradas nas SEQ ID NOs: 124, 125 e 15 126, e tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1.

19. ANTICORPO, de acordo com uma das reivindicações 7 a 18, caracterizado pelo fato de que é um anticorpo humano, um anticorpo humanizado, um anticorpo quimérico, um anticorpo de cadeia única ou um anticorpo biespecífico.

20. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA para o tratamento e/ou prevenção de câncer, caracterizada pelo fato de que compreende, como um ingrediente ativo, o anticorpo conforme definido em uma das reivindicações 7 a 19 ou um fragmento do mesmo.

21. USO DE UM ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DO MESMO, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratar e/ou prevenir um câncer, em que o dito anticorpo ou fragmento do mesmo tem uma reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1, que tem uma sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de 25

numeração par das SEQ ID NOs: 2 a 30, ou uma sequência de aminoácidos que tem 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácidos, ou com um fragmento da proteína CAPRIN-1 compreendendo 7 ou mais aminoácidos consecutivos.

- 5 22. USO DE UM ANTICORPO, conforme definido em uma das reivindicações 7 a 19, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratamento e/ou prevenção de um câncer.

Fig. 1

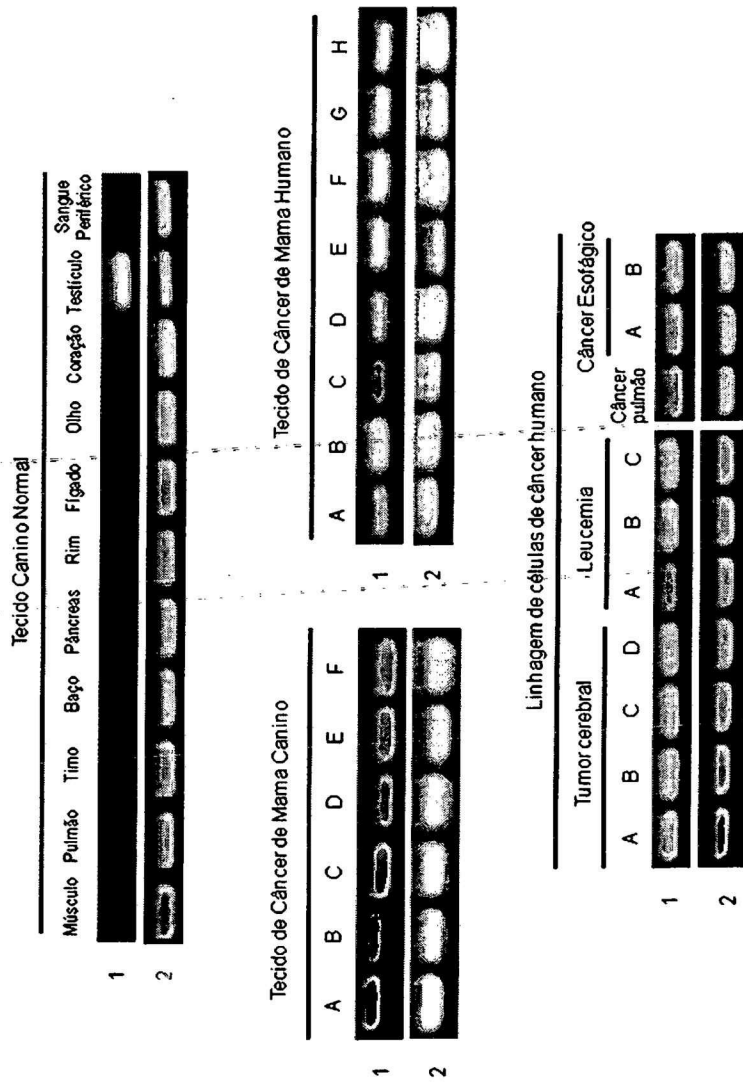
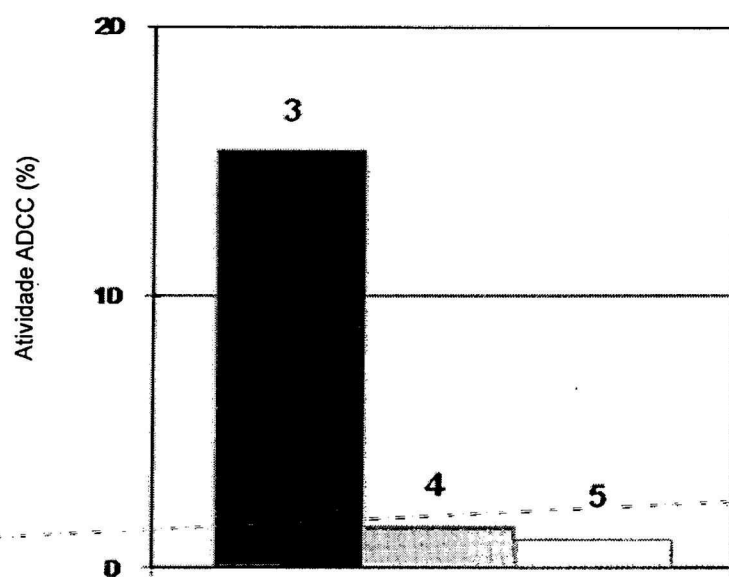


Fig. 2

T47D

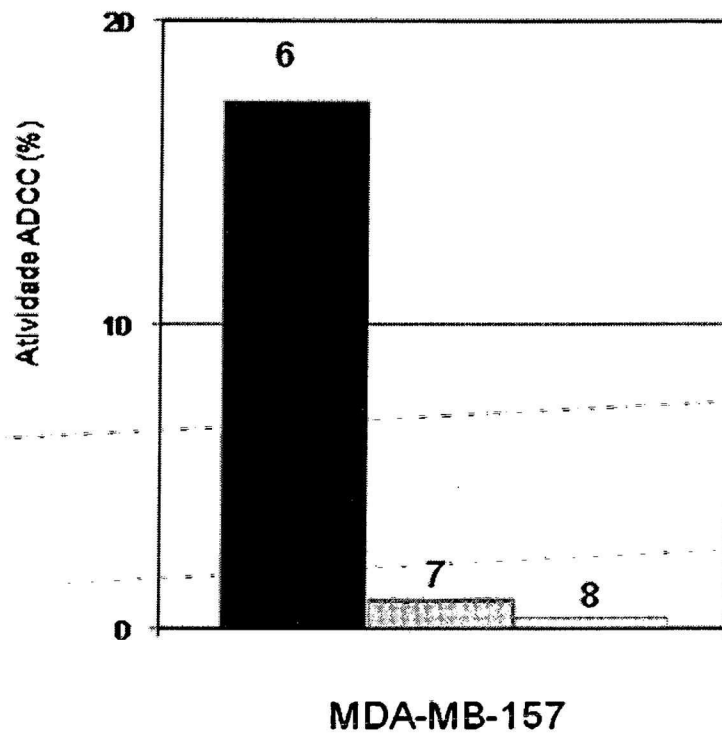
Fig. 3

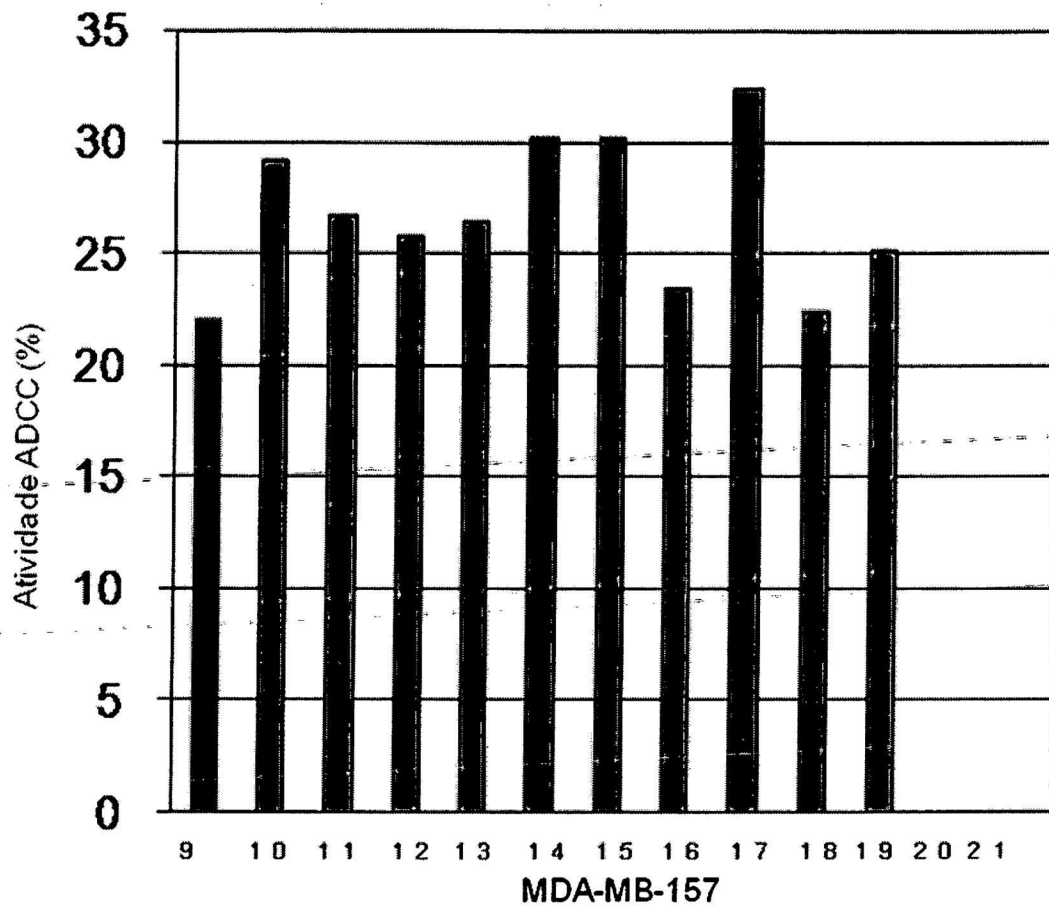
Fig. 4

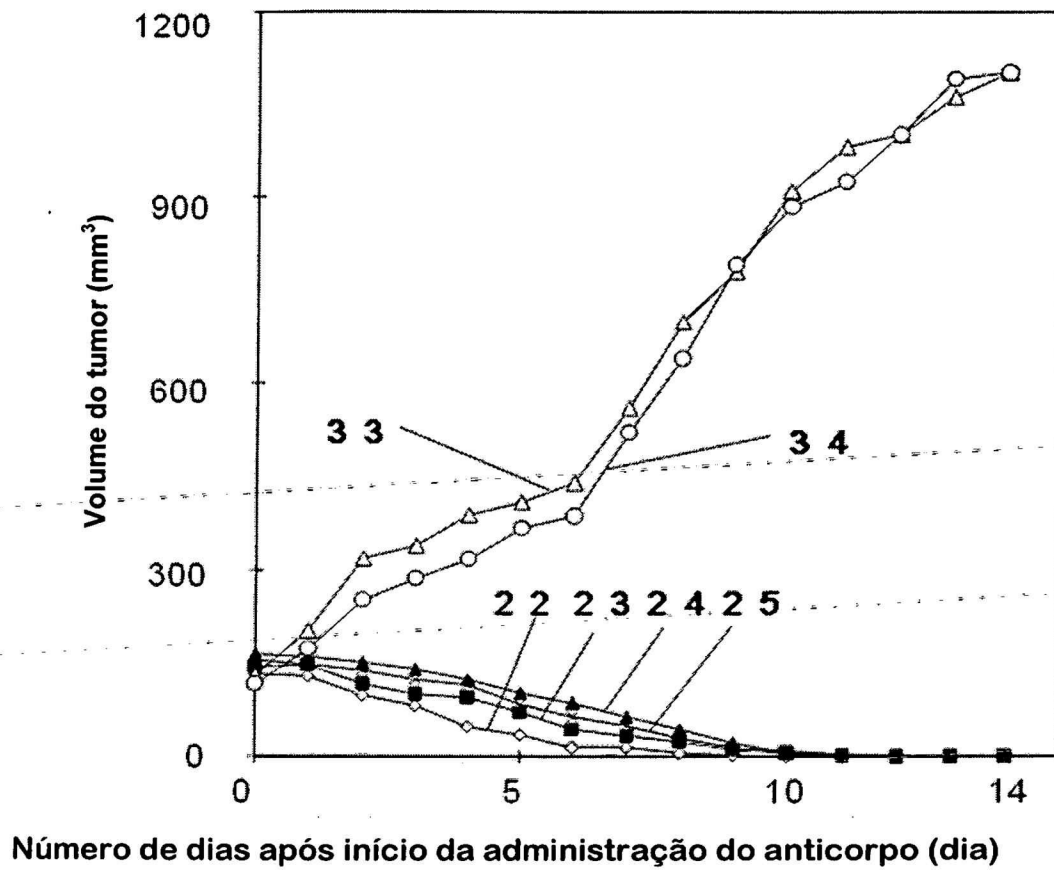
Fig. 5A

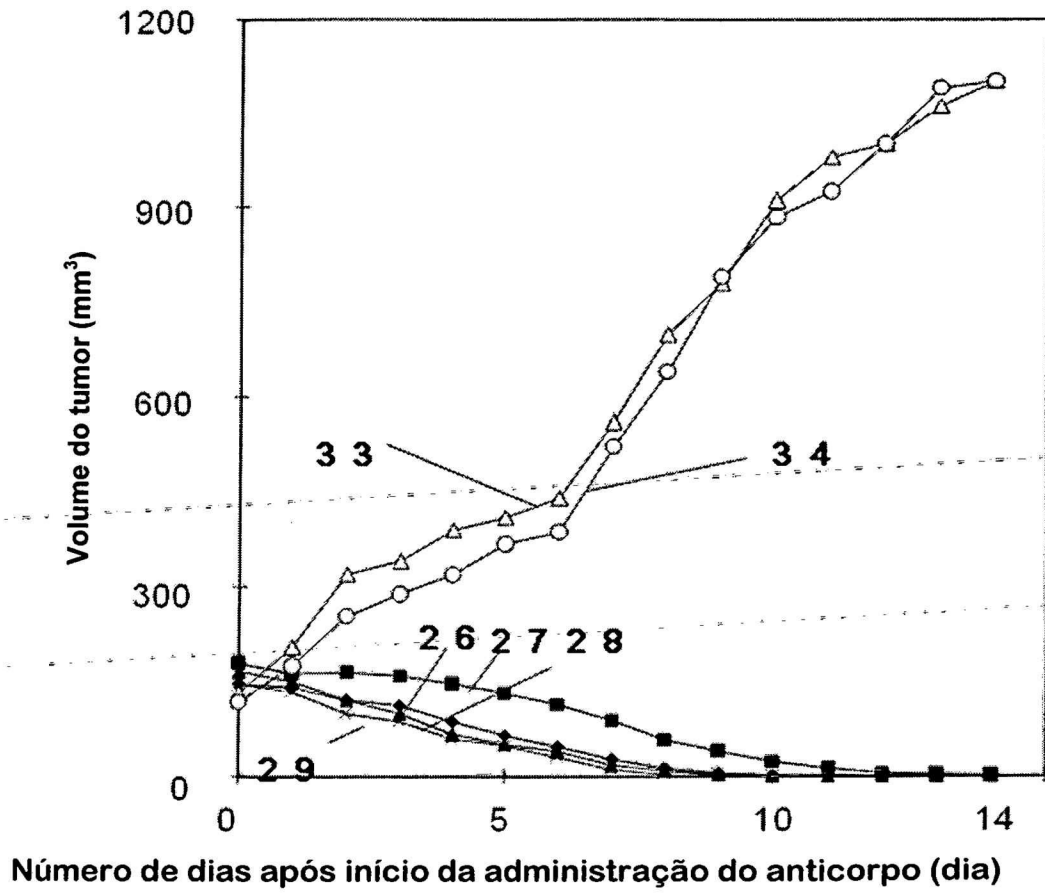
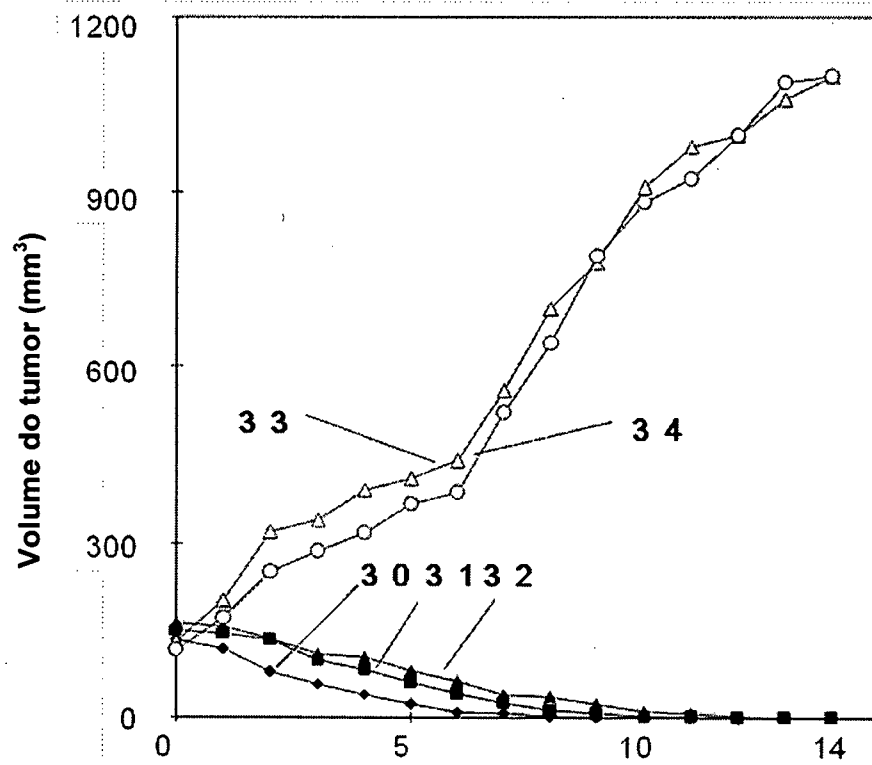
Fig. 5B

Fig. 5C

Número de dias após início da administração do anticorpo (dia)

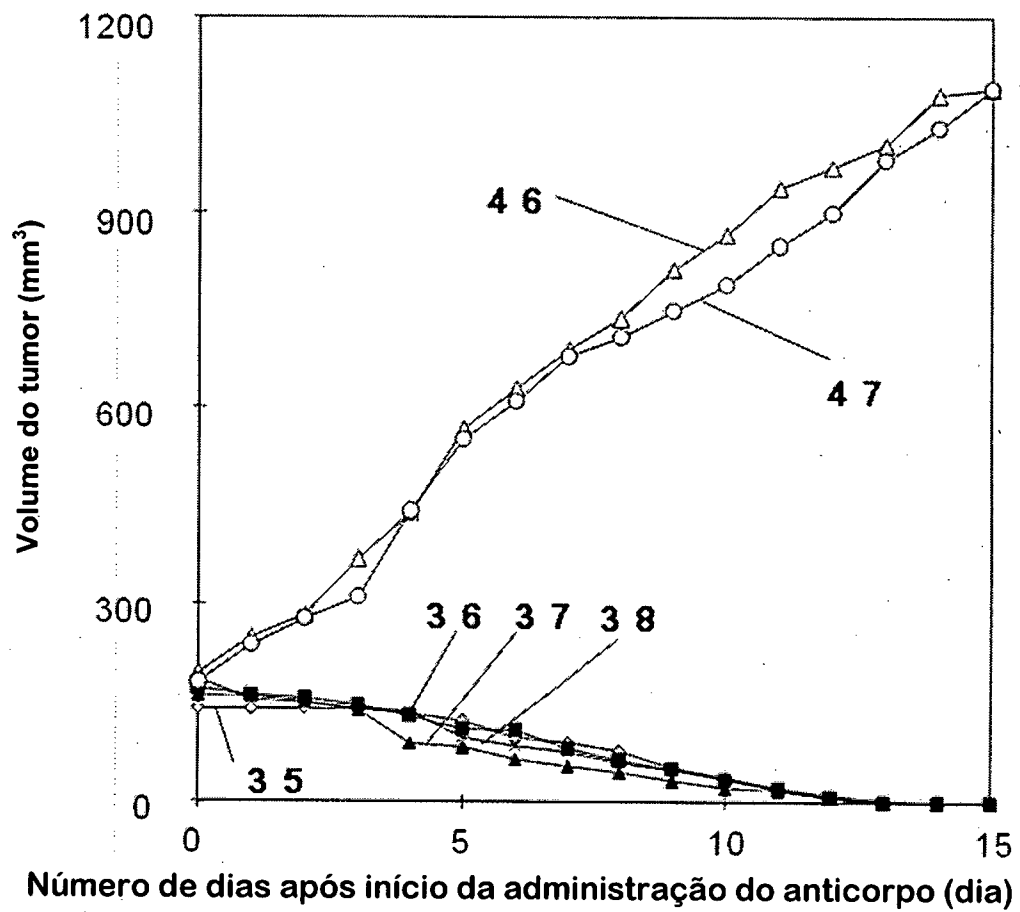
Fig. 6A

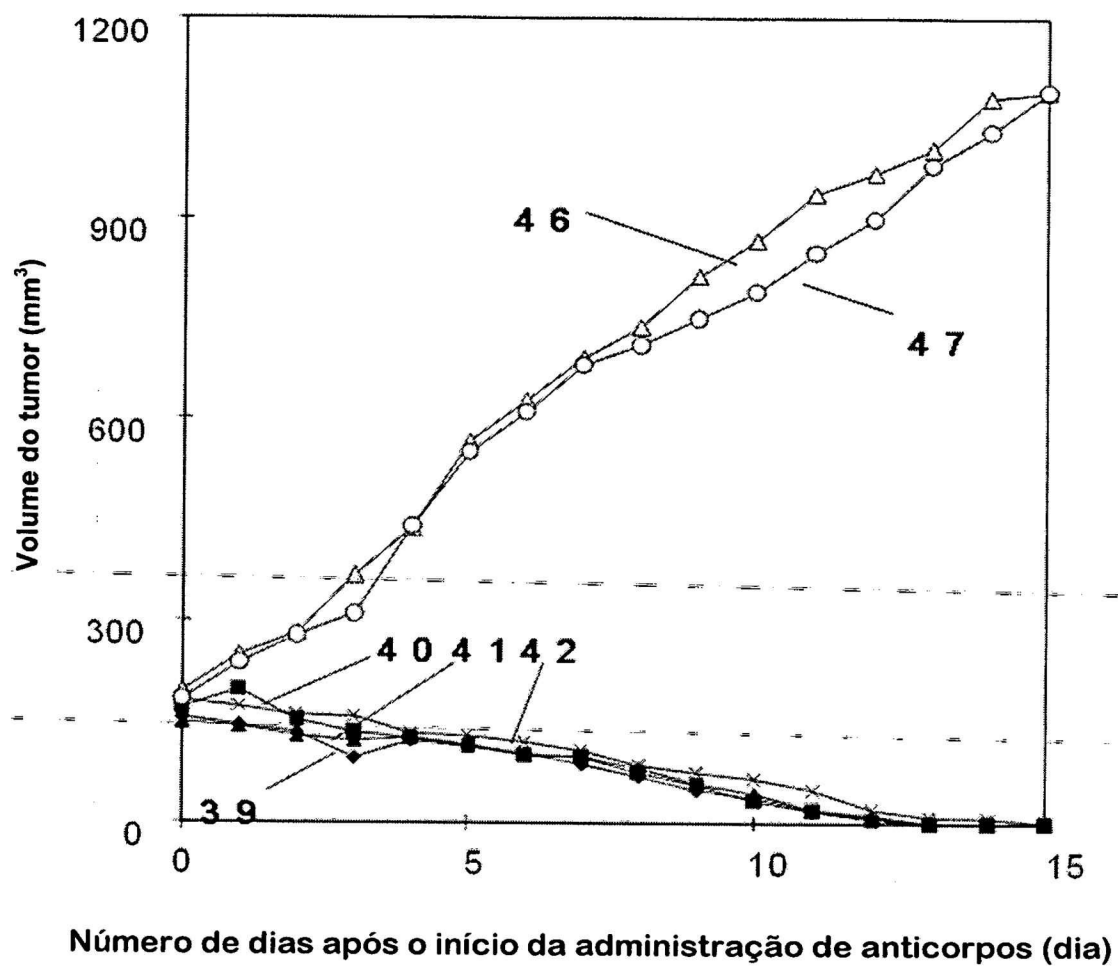
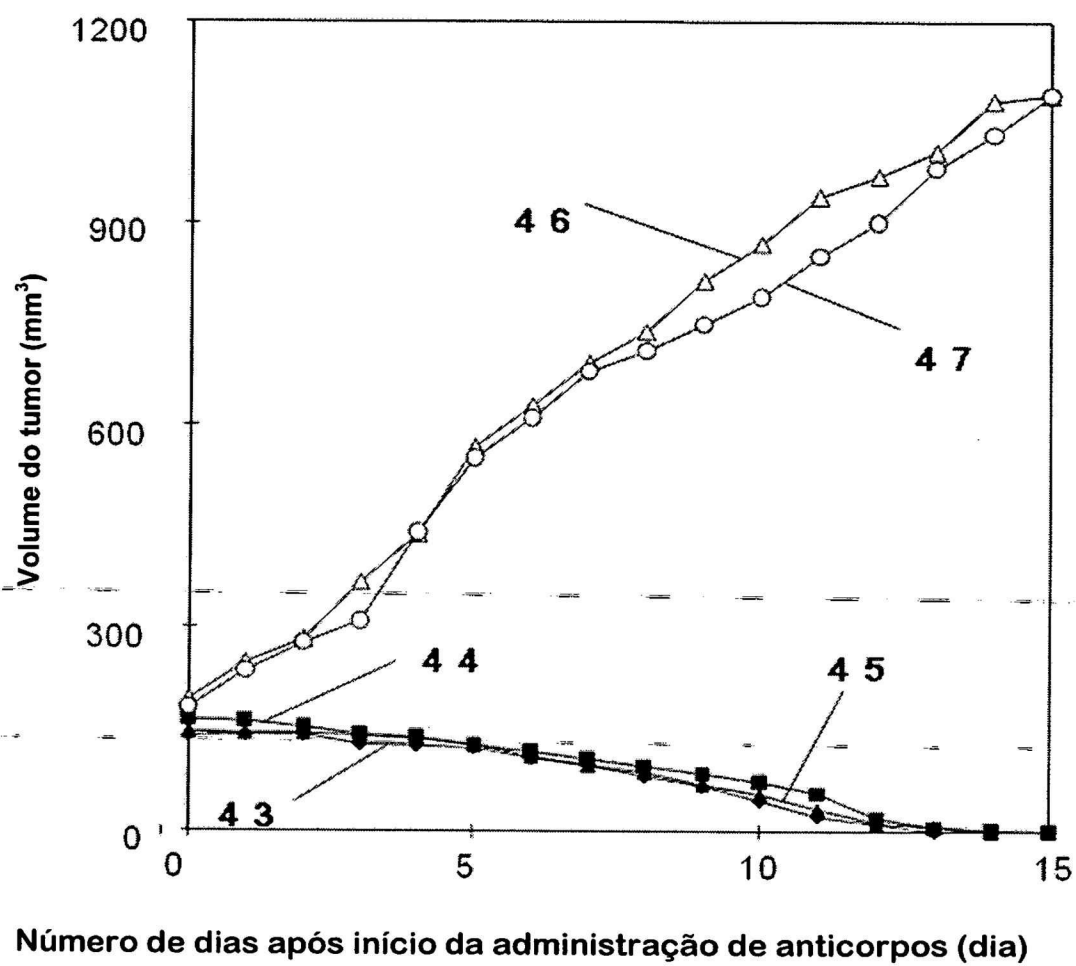
Fig. 6B

Fig. 6C

RESUMO**“COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS, ANTICORPOS E USOS DE UM
ANTICORPO OU UM FRAGMENTO DO MESMO”**

A presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica
5 para tratamento e/ou prevenção de câncer, que compreende, como um
ingrediente ativo, um anticorpo ou um fragmento do mesmo que tem uma
reatividade imunológica a uma proteína CAPRIN-1 ou um fragmento do mesmo
que compreende 7 ou mais aminoácidos consecutivos.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas de que trata a Resolução INPI 228 de 11/11/2009:

Código de Controle

Campo 1



723C75A74D7C6AE3

Campo 2



1AAA444DDAD8684C

Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 2011 02 01_1939-0002_Listagem de Sequencias_FSG_MLA_EMG_CAN.txt
- Data de Geração do Código: 03-02-2011
- Hora de Geração do Código: 11:10:10
- Código de Controle:
 - Campo 1: 723C75A74D7C6AE3
 - Campo 2: 1AAA444DDAD8684C