



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

(21) BR 112019013947-8 A2



(22) Data do Depósito: 10/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 11/02/2020

(54) Título: ANTICORPO, RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, CÉLULA IMUNOCOMPETENTE, GENE DE ANTICORPO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA DETECTAR GPC3, E, KIT PARA A DETECCÃO DE GPC3.

(51) Int. Cl.: C12N 15/09; C07K 16/18; C12N 1/15; C12N 1/19; C12N 1/21; (...).

(30) Prioridade Unionista: 10/01/2017 JP 2017-001732.

(71) Depositante(es): YAMAGUCHI UNIVERSITY; NATIONAL CANCER CENTER; NOILE-IMMUNE BIOTECH, INC..

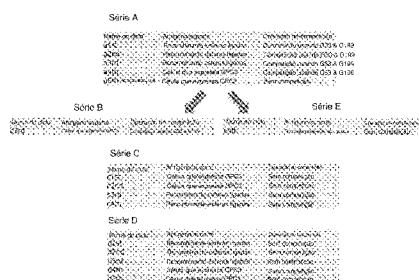
(72) Inventor(es): KOJI TAMADA; YUKIMI SAKODA; TETSUYA NAKATSURA; KEIGO SAITO.

(86) Pedido PCT: PCT JP2018000257 de 10/01/2018

(87) Publicação PCT: WO 2018/131586 de 19/07/2018

(85) Data da Fase Nacional: 04/07/2019

(57) Resumo: A presente invenção aborda o problema de prover: um anticorpo anti-GPC3 que reconhece um epítopo diferente daquele para anticorpos existentes (por exemplo, GC33 e GC199) e que pode se ligar especificamente ao GPC3 localizado na membrana celular, mesmo como um anticorpo de cadeia simples; um CAR incluindo o dito anticorpo anti-GPC3 de cadeia única; uma célula imunocompetente que expressa o dito CAR; um gene de anticorpo anti-GPC3 ou gene CAR; um vetor que inclui o dito gene de anticorpo anti-GPC3 ou gene CAR; uma célula hospedeira na qual o dito vetor foi introduzido; um método para detectar especificamente GPC3; e um kit para detectar especificamente GPC3. Este anticorpo inclui as CDRs 1-3 de cadeia pesada específicas e as CDRs 1-3 de cadeia leve específicas 3 definidas na reivindicação 1, e se liga especificamente ao polipeptídeo GPC3 derivado de humano. Este anticorpo se liga especificamente ao GPC3 localizado na membrana celular. Uma célula imunocompetente para CAR, preparada a partir de CAR, que inclui o dito anticorpo de cadeia única é usada na imunoterapia para câncer.



ANTICORPO, RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, CÉLULA IMUNOCOMPETENTE, GENE DE ANTICORPO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA DETECTAR GPC3, E, KIT PARA A DETECÇÃO DE GPC3

CAMPO TÉCNICO

[001] A presente invenção se refere a: um anticorpo que se liga especificamente a GPC3 (glipicano-3) (anticorpo anti-GPC3); um receptor de antígeno quimérico (daqui por diante, também referido como “CAR”) compreendendo anticorpo anti-GPC3 de cadeia única, uma região transmembrana fundida com uma terminação carboxila (C) do anticorpo anti-GPC3 de cadeia única, e uma região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente fundida com uma terminação C da região transmembrana; uma célula imunocompetente que expressa o CAR; um gene do anticorpo anti-GPC3 ou um gene CAR; um vetor compreendendo o gene do anticorpo anti-GPC3 ou o gene CAR; uma célula hospedeira na qual o vetor foi introduzido; um método para detectar GPC3; e um kit para detectar GPC3.

FUNDAMENTOS DA TÉCNICA

[002] Glipicano-3 (GPC3) é uma proteína de matriz extracelular que é expressa em tecidos embrionários, particularmente, o fígado ou o rim, e está associada à organogênese. A expressão de GPC3 não é observada em tecidos humanos adultos, com a exceção da placenta, mas é observada em tecidos de vários cânceres tais como carcinoma hepatocelular, melanoma, adenocarcinoma de célula clara do ovário, e carcinoma de célula escamosa do pulmão. Assim, GPC3 é uma proteína que é expressa em tecidos embrionários, como em proteínas tais como α -fetoproteína (AFP) e antígeno carcinoembriônico (CEA), e é classificada, portanto, em antígenos de carcinoma embrionário. Especificamente, GPC3 é usada como uma molécula alvo de tratamento de câncer, um marcador tumoral e um marcador de

diagnóstico, em decorrência de sua característica ser que a proteína não é expressa em células de tecido normal, mas é especificamente expressa em células de câncer.

[003] GPC3 é um elemento da família proteoglicano que funciona como matriz extracelular na adesão celular em organogênese ou como um receptor de um fator de crescimento celular. Uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) é adicionada em serina na posição 560, localizada no lado carboxila (C)-terminal de GPC3. A âncora de GPI desempenha um papel em localizar GPC3 na superfície celular, através da ligação covalente no lipídeo de membrana celular. Igualmente, serina na posição 495 e serina na posição 509 de GPC3 são modificadas com uma cadeia de sulfato de heparano (cadeia de HS). A cadeia de HS é conhecida por regular uma pluralidade de vias de transdução de sinal de crescimento tais como vias de transdução de sinal Wnt, sinal FGF e sinal BMP. Uma via de transdução de sinal de crescimento envolvida é conhecida por diferir entre os tipos de cânceres. Por exemplo, no carcinoma hepatocelular (HCC), as células crescem pelo estímulo da via do sinal Wnt. Uma característica comum da família de glipícano é o número de cisteína tão abundante quanto 16 em uma região extracelular, e considera-se que estes resíduos de cisteína contribuem para a formação estável de uma conformação pela formação de uma pluralidade de ligações dissulfeto intramoleculares. Foi relatada a possibilidade de que GPC3 na superfície da membrana celular é clivada entre arginina (R) na posição 358 e serina (S) na posição 359 (R358/S359) por furin convertase. Entretanto, uma vez que uma subunidade amino (N)-terminal de GPC3 é reticulada por meio de ligações dissulfeto intramoleculares, GPC3, mesmo quando clivada em duas subunidades, uma subunidade N-terminal e uma subunidade C-terminal, por furin convertase pode provavelmente manter sua estrutura de tamanho completo sem se dissociar nestas subunidades. A estrutura de GPC3 solúvel permanece um assunto controverso. Assim,

existem muitos pontos não esclarecidos em relação à conformação de GPC3 localizado em uma membrana celular, incluindo também as estruturas das isoformas de GPC3.

[004] GPC3 em uma membrana celular apresenta uma estrutura complexa. Portanto, para preparar um anticorpo contra GPC3, considera-se desejável que a região estrutural mais simples seja um epítopo. Um anticorpo anti-GPC3 existente representativo inclui um anticorpo monoclonal 1G12, que é distribuído por BioMosaics, Inc. Este anticorpo é um anticorpo obtido imunizando camundongos Balb/c com um antígeno (polipeptídeo de 70 resíduos C-terminal de GPC3) projetado de modo a contornar a estrutura complicada ou localização de GPC3, para preparar hibridomas e selecionar os hibridomas usando o antígeno. Anticorpos GC33 e GC199, desenvolvidos por um fabricante farmacêutico japonês, também são anticorpos monoclonais estabelecidos na base do mesmo conceito anterior, e são anticorpos obtidos com o fragmento parcial C-terminal de GPC3 como um antígeno (documento de patente 1).

Documento da técnica anterior

Documento associado à patente

[005] Documento associado à patente 1: Patente Japonesa 4011100

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Objetivo a ser solucionado pela invenção

[006] Um objetivo da presente invenção é prover: um anticorpo anti-GPC3 que reconhece um epítopo diferente daquele para anticorpos existentes (por exemplo, GC33 e GC199) e pode se ligar especificamente, mesmo na forma de anticorpo de cadeia única, à GPC3 localizado em uma membrana celular; CAR compreendendo o anticorpo anti-GPC3 de cadeia única; uma célula imunocompetente que expressa o CAR; um gene do anticorpo anti-GPC3 ou um gene do CAR; um vetor compreendendo o gene do anticorpo anti-GPC3 ou o gene CAR; uma célula hospedeira na qual o vetor foi

introduzido; um método para detectar especificamente GPC3; e um kit para detectar especificamente GPC3.

Meios para solucionar o objetivo

[007] Os presentes inventores têm realizado estudos aplicados para atingir o objetivo. No curso dos estudos, os presentes inventores prepararam um anticorpo anti-GPC3 inédito por um método de exibição de fago, que é uma abordagem diferente dos métodos de preparação de anticorpo monoclonal convencionais envolvendo o estabelecimento de hibridomas. Especificamente, uma biblioteca imune de genes de anticorpo foi sintetizada usando células B derivadas de camundongos imunizados com GPC3 de humano de tamanho completo, e os genes foram reconstituídos em uma biblioteca de anticorpo de cadeia única (scFv), que foi a seguir incorporada em uma exibição de fago e expressa na superfície do fago, seguido por seleção biológica usando GPC3 de humano de tamanho completo recombinante e a linhagem celular que expressa GPC3 e, adicionalmente, se necessário, um polipeptídeo C-terminal competidor de GPC3 que funciona como um epítopo para os anticorpos existentes para preparar um anticorpo anti-GPC3. O anticorpo anti-GPC3 preparado também foi confirmado para ser útil para imunoterapia de câncer, usando células T que expressam um receptor de antígeno quimérico (CAR) (daqui por diante, também referidas como “células CAR- “). A presente invenção foi concluída com base nestes achados.

[008] Especificamente, a presente invenção é da maneira a seguir.

[009] [1] Um anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo derivado de GPC3 (glipicano-3) humano consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155 (daqui por diante, também referido como o “anticorpo presente”), em que o anticorpo

(1-1) compreende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada (CDR) 1 consistindo na sequência de

aminoácido representada por SEQ ID NO: 1, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 2, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 3, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 4, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 5, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 6; ou

(2-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 11, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 12, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 13, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 14, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 15, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 16; ou

(3-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 21, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 22, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 23, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 24, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 25, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 26; ou

(4-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 31, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 32, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 33, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 34, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 35, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 36; ou

(5-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 41, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 42, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 43, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 44, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 45, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 46; ou

(6-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 51, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 52, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 53, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 54, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 55, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada

por SEQ ID NO: 56; ou

(7-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 61, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 63, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 64, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 65, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 66; ou

(8-1) comprehende cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 71, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 72, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 73, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 74, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 75, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 76; ou

(9-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 81, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 82, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 83, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 84, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 85, e

uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 86; ou

(10-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 91, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 92, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 93, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 94, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 95, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 96; ou

(11-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101, uma cadeia pesada CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, e uma cadeia pesada CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 103, e

uma cadeia leve CDR1 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 104, uma cadeia leve CDR2 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 105, e uma cadeia leve CDR3 consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 106.

[0010] [2] O anticorpo de acordo com [1], em que o anticorpo

(1-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8;

ou

(2-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 17, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18; ou

(3-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28; ou

(4-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38; ou

(5-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48; ou

(6-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58; ou

(7-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68; ou

(8-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78; ou

(9-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 87, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88; ou

(10-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada

consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 97, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98; ou

(11-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108.

[0011] [3] O anticorpo de acordo com [1] ou [2], em que o anticorpo é anticorpo de cadeia única.

[0012] [4] O anticorpo de acordo com [3], em que o anticorpo de cadeia única

(1-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 165; ou

(2-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 166; ou

(3-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 167; ou

(4-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 168; ou

(5-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo

menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 169; ou

(6-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 170; ou

(7-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 171; ou

(8-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 172; ou

(9-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 173; ou

(10-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 174; ou

(11-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 175.

[0013] [5] O anticorpo de acordo com [3], em que o anticorpo de cadeia única

(1-3'-1) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 178; ou

(1-3'-2) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 179; ou

(1-3'-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo

menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 180; ou

(2-3'-1) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 181; ou

(2-3'-2) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 182; ou

(2-3'-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 183; ou

(2-3'-4) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 184.

[0014] [6] O anticorpo de acordo com [1] ou [2], em que o anticorpo

(1-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 9, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 10; ou

(2-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 19, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 20; ou

(3-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de

sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 29, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 30; ou

(4-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 39, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 40; ou

(5-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 49, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 50; ou

(6-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 59, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 60; ou

(7-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 69, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 70; ou

(8-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma

sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 79, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 80; ou

(9-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 89, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 90; ou

(10-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 99, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 100; ou

(11-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 109, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 110.

[0015] [7] CAR comprehendo o anticorpo de acordo com qualquer um de [3] a [5] (daqui por diante, também referido como o “anticorpo de cadeia única presente”), uma região transmembrana fundida com uma terminação carboxila do anticorpo de cadeia única presente, e uma região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente fundida com uma terminação carboxila da região transmembrana (daqui por diante, também

referido como o “CAR presente”).

[0016] [8] O CAR de acordo com [7], compreendendo a sequência de aminoácido representada por qualquer de SEQ ID NOs: 185 a 187.

[0017] [9] Uma célula imunocompetente que expressa o CAR de acordo com [7] ou [8] (daqui por diante, também referido como a “célula imunocompetente presente”).

[0018] [10] A célula imunocompetente de acordo com [9], que expressa adicionalmente interleucina 7 (IL-7) e ligante de quimiocina 19 (CCL19).

[0019] [11] Um gene de anticorpo que codifica o anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [6] (daqui por diante, também referido como o “gene de anticorpo presente”), ou um gene CAR que codifica o CAR de acordo com [7] ou [8] (daqui por diante, também referido como o “gene CAR presente”).

[0020] [12] Um gene de anticorpo que codifica o anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [4] e [6].

[0021] [13] Um vetor compreendendo um promotor, e o gene de anticorpo de acordo com [11], ou o gene CAR que codifica o CAR de acordo com [11] operavelmente ligado a jusante do promotor (daqui por diante, também referido como o “vetor presente”).

[0022] [14] Um vetor compreendendo um promotor, e o gene de anticorpo de acordo com [12] operavelmente ligado a jusante do promotor.

[0023] [15] Uma célula hospedeira na qual o vetor de acordo com [13] ou [14] foi introduzido (daqui por diante, também referido como a “célula hospedeira presente”).

[0024] [16] Um método para detectar GPC3 (glipicano-3), compreendendo a etapa de detectar GPC3 usando o anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [6] (daqui por diante, também referido como o “método de detecção presente”).

[0025] [17] Um kit para a detecção de GPC3 (glipicano-3), compreendendo o anticorpo de acordo com qualquer um de [1] a [6], ou uma forma marcada deste (daqui por diante, também referido como o “kit para detecção presente”).

[0026] Exemplos de outras modalidades da presente invenção podem incluir o anticorpo presente para uso na detecção de GPC3, e um método para produzir o anticorpo presente, compreendendo as etapas de: imunizar animais não humanos (por exemplo, camundongos e ratos) com GPC3 de humano de tamanho completo consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 157; sintetizar DNAc por reação de transcrição reversa a partir do RNA total de células B derivadas dos animais não humanos imunizados, e amplificar genes de anticorpo para preparar uma biblioteca de gene de anticorpo; e construir uma biblioteca de fago scFv a partir da biblioteca de gene de anticorpo, e infectar *E. coli* com a biblioteca, de maneira que as células expressem scFv, seguido por seleção biológica usando o GPC3 de humano de tamanho completo e a linhagem celular que expressa GPC3 e adicionalmente, se necessário, um polipeptídeo de GPC3 C-terminal competidor (polipeptídeo de GPC3 derivado de humano consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 156).

Efeito da invenção

[0027] O anticorpo presente é um anticorpo que se liga especificamente ao GPC3 localizado em uma membrana celular não apenas na forma de IgG, mas na forma de scFv. Células CAR-T usando o anticorpo presente como scFv em CAR apresentam excelente atividade citotóxica e a capacidade de produzir IFN- γ . Consequentemente, o anticorpo presente é usado para imunoterapia para o câncer.

Breve descrição dos desenhos

[0028] [Figura 1] Figura 1 é um diagrama que mostra cada ciclo (etapa) de seleção biológica consistindo em 5 tipos de série (série A a E).

Série A envolve realizar 3 ciclos de seleção biológica com GPC3 recombinante imobilizado em esferas magnéticas como uma isca, e realizando seleção biológica em ciclos 4 e 5 com uma linhagem celular que expressa GPC3 como uma isca (ciclo 5 foi realizado apenas para 1413 #3). Nos ciclos 1 a 4, anticorpos anti-GPC3 existentes (GC33 e GC199) foram adicionados como anticorpos competitivos. Série B envolve realizar seleção biológica com células que expressam GPC3 como uma isca, na presença dos anticorpos competitivos após o ciclo 2 da série A. A série E envolve realizar a seleção biológica com GPC3 recombinante imobilizado em esferas magnéticas como uma isca, em condições de anticorpo não competitivo, após o ciclo 3 da série A. Na série C, 4 ciclos no total da seleção biológica com uma linhagem celular que expressa GPC3 como uma isca em 2 ciclos, e GPC3 recombinante imobilizado em esferas magnéticas como uma isca, em 2 ciclos, foram realizados na ausência dos anticorpos competitivos. A série D envolve realizar a mesma seleção biológica como aquela da série A na ausência dos anticorpos competitivos.

[0029] [Figura 2] Figura 2 é um diagrama que mostra resultados de realizar citometria de fluxo (FCM) usando 18 tipos de clones de scFv anti-GPC3 (TF1413-02d023, 02d028, 02d030, 02d039, 02e003, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, 03e016, 03e019, 03e027, 03e034, e 03e045) e anticorpos anti-GPC3 existentes (GC33 e GC199), e 3 tipos de linhagens celulares (linhagem celular que expressa fragmento N-terminal GPC3, linhagem celular que expressa fragmento C-terminal GPC3, e linhagem celular que expressa GPC3 [tamanho completo]). Os valores numéricos no diagrama são indicados por valores relativos quando a intensidade de fluorescência de uma linhagem celular que não expressa GPC3 (linhagem celular SK-Hep-1) foi definida como 1 em FCM.

[0030] [Figura 3] Figura 3 é um diagrama que mostra resultados de realizar FCM usando anticorpos IgG, preparados a partir de 11 tipos de clones

de scFv (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, e 03e034) e anticorpos anti-GPC3 existentes (GC33 e GC199), e 3 tipos de linhagens celulares (linhagem celular que expressa fragmento N-terminal GPC3, linhagem celular que expressa fragmento C-terminal GPC3, e linhagem celular que expressa GPC3 [tamanho completo]).

[0031] [Figura 4] Figura 4 é um diagrama que mostra resultados de realizar FACS (classificação celular ativada por fluorescência) usando uma linhagem celular que expressa GPC3 tratado com 3 tipos de métodos (EDTA, tripsina, e “EDTA + colagenase”), 3 tipos de combinações de anticorpo (anticorpo IgG anti-camundongo marcado com APC [daqui por diante, também referido como “anticorpo IgG anti-camundongo APC”], e uma combinação do anticorpo IgG anti-camundongo APC e um anticorpo do clone de scFv [TF1413-02d028]).

[0032] [Figura 5] Figura 5 é um diagrama que mostra resultados da análise de células GPC3 CAR-T (células T que expressam CAR de scFv que reconhece GPC3) derivadas de 5 tipos de clones de scFv (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030, e TF1413-03e005) em relação à atividade citotóxica contra uma linhagem celular Sk-HEP-1 GPC3. Em cada gráfico, o pico direito representa células positivas para CD45 (células GPC3 CAR-T), e o pico esquerdo representa células negativas para CD45 (células residuais de câncer [células Sk-HEP-1 GPC3]). O eixo vertical de cada gráfico representa o número de células. O valor numérico em cada gráfico representa a razão (%) do número de células positivas para CD45 para o número total de células (células positivas para CD45 e células negativas para CD45). Células T que não expressam GPC3 CAR (“Sem infecção” no diagrama) foram usadas como um controle.

[0033] [Figura 6] Figura 6 é um gráfico que mostra a razão de células negativas para CD45 na figura 5 (Figura 6A) e o número de células negativas para CD45 (Figura 6B). Em um par de gráficos de barra, o gráfico de barra à

esquerda representa “simulado” (linhagem celular Sk-HEP-1 simulada), e o gráfico de barras à direita representa “GPC3” (linhagem celular Sk-HEP-1 GPC3).

[0034] [Figura 7] Figura 7 é um diagrama que mostra resultados da análise de células GPC3 CAR-T derivadas de 5 tipos de clones de scFv (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030, e TF1413-03e005) em relação à capacidade de produzir IFN- γ contra uma linhagem celular Sk-HEP-1 GPC3. Células T que não expressam GPC3 CAR (“Sem infecção” no diagrama) foram usadas como um controle.

Modo de realizar a invenção

[0035] O anticorpo presente é um anticorpo compreendendo a cadeia pesada (H) e cadeia leve (L) CDR1 a CDR3 descrito anteriormente em qualquer de (1-1) a (11-1), e que se liga especificamente a, como um epítopo, pelo menos um porção (em geral na faixa de 3 a 30 resíduos de aminoácido, preferivelmente 4 a 20 resíduos de aminoácido, mais preferivelmente 5 a 15 resíduos de aminoácido) de um polipeptídeo de GPC3 derivado de humano consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155 (polipeptídeo amino [N]-terminal consistindo em resíduos de aminoácido 32 a 471 [éxons 1 a 7] de GPC3 de tamanho completo derivado de humano, consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 157). Este anticorpo se liga especificamente não apenas na forma de IgG, mas na forma de scFv em GPC3 localizado em uma membrana celular, e em geral compreende uma região variável de cadeia H compreendendo a cadeia H de CDR1 a CDR3 descrita anteriormente em qualquer de (1-1) a (11-1), e uma região variável de cadeia L compreendendo a cadeia L de CDR1 a CDR3 descrita anteriormente em qualquer de (1-1) a (11-1). Neste contexto, o termo “se liga especificamente” significa que o anticorpo reconhece e se liga ao polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155, através de um mecanismo de reconhecimento com alta

especificidade antígeno-anticorpo. Assim, o anticorpo presente não se liga especificamente a um polipeptídeo de GPC3 derivado de humano consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 156 (polipeptídeo carboxila [C]-terminal consistindo em resíduos de aminoácido 472 a 580 [éxons 8 e 9] de GPC3 de tamanho completo derivado de humano, consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 157).

[0036] O anticorpo presente não é particularmente limitado por sua origem, tipo, classe, morfologia, etc. O anticorpo presente inclui, por exemplo: um anticorpo derivado de humano; um anticorpo derivado de um animal não humano tal como um camundongo ou um rato; um anticorpo policlonal, um anticorpo oligoclonal (mistura de vários a várias dezenas de anticorpos), e um anticorpo monoclonal; e um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado no qual uma região parcial (por exemplo, regiões constantes) de um anticorpo foi substituída por uma região derivada de uma espécie diferentes de organismo, um fragmento de anticorpo tal como um fragmento de anticorpo $F(ab')_2$ obtido digerindo um anticorpo monoclonal com pepsina, um fragmento de anticorpo Fab' obtido reduzindo um fragmento de anticorpo $F(ab')_2$, e Fab obtido digerindo um anticorpo monoclonal com papaína, e um anticorpo recombinante tal como scFv contendo uma região variável de cadeia pesada (H) de anticorpo e uma região variável de cadeia leve (H) de anticorpo ligadas por meio de reticulações de aminoácido. No caso de usar o anticorpo presente como CAR, scFv é preferido.

[0037] O anticorpo presente está preferivelmente em uma forma separada. Neste contexto, o termo “separado” significa que o anticorpo está presente em um estágio diferente do estágio onde o anticorpo está originalmente presente, de maneira tal que o anticorpo é retirado de um ambiente que envolve originalmente o anticorpo ou é expresso em um ambiente diferente do ambiente que envolve originalmente o anticorpo por

um funcionamento artificial. Especificamente, o “anticorpo separado” não inclui um anticorpo que é derivado de um certo indivíduo e está em um estágio incluído no corpo do indivíduo sem um funcionamento externo (funcionamento artificial), ou em um tecido ou um fluido corporal (sangue, plasma, soro, etc.) derivado do corpo. O anticorpo presente é preferivelmente um anticorpo preparado por um funcionamento artificial (por exemplo, o anticorpo recombinante descrito anteriormente). Um “anticorpo derivado de uma célula preparado por um funcionamento artificial ou um anticorpo produzido a partir da célula” como este não inclui um anticorpo que não é submetido a um funcionamento artificial, por exemplo, um anticorpo produzido a partir de uma célula B de ocorrência natural.

[0038] No anticorpo presente, uma região de estrutura (FR) em geral é ligada na terminação N e/ou terminação C de cada uma das regiões CDR1 a CDR3 de cadeia H e cadeia L. Entre tais FRs, exemplos das FRs de cadeia H podem incluir FR1 de cadeia H ligada na terminação N de CDR1 de cadeia H, FR2 de cadeia H ligada na terminação C de CDR1 de cadeia H (terminação N de CDR2 de cadeia H), FR3 de cadeia H ligada na terminação C de CDR2 de cadeia H (terminação N de CDR3 de cadeia H), e FR4 de cadeia H ligada na terminação C de CDR3 de cadeia H. Entre as FRs, exemplos das FRs de cadeia L podem incluir FR1 de cadeia L ligada na terminação N de CDR1 de cadeia L, FR2 de cadeia L ligada na terminação C de CDR1 de cadeia L (terminação N de CDR2 de cadeia L), FR3 de cadeia L ligada na terminação C de CDR2 de cadeia L (terminação N de CDR3 de cadeia L), e FR4 de cadeia L ligada na terminação C de CDR3 de cadeia L.

[0039] Exemplos da FR1 de cadeia H podem incluir especificamente: (1-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo;

(2-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 17, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de

aminoácido do polipeptídeo; (9-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 87, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 97, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-HFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 30 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0040] Exemplos da FR2 de cadeia H podem incluir especificamente: (1-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 17, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37, ou um polipeptídeo que consiste em uma

sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 87, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 97, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-HFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 36 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, ou um

polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0041] Exemplos da FR3 de cadeia H podem incluir especificamente: (1-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 17, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 99 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 99 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do

polipeptídeo; (7-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 99 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 87, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 97, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-HFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 67 a 98 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0042] Exemplos da FR4 de cadeia H podem incluir especificamente: (1-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 109 a 118 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 108 a 117 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID

NO: 17, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 106 a 115 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 111 a 120 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 108 a 117 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 107 a 116 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 106 a 115 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 106 a 115 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 111 a 120 da sequência de aminoácido

representada por SEQ ID NO: 87, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 110 a 119 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 97, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-HFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 109 a 118 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0043] Exemplos da FR1 de cadeia L podem incluir especificamente: (1-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a

sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-LFR1) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 23 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de

identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0044] Exemplos da FR2 de cadeia L podem incluir especificamente: (1-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 40 a 54 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 41 a 55 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68, ou um

polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-LFR2) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 35 a 49 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0045] Exemplos da FR3 de cadeia L podem incluir especificamente: (1-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 62 a 93 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de

aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 63 a 94 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-LFR3) um polipeptídeo que

consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-LFR3) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 57 a 88 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0046] Exemplos da FR4 de cadeia L podem incluir especificamente: (1-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (2-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 103 a 113 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (3-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 97 a 107 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (4-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (5-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 104 a 114 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de

identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (6-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (7-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (8-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (9-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; (10-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo; e (11-LFR4) um polipeptídeo que consiste em resíduos de aminoácido 98 a 108 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108, ou um polipeptídeo que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido do polipeptídeo.

[0047] As FRs do anticorpo presente são preferivelmente FRs de um anticorpo humano conhecido. Exemplos de tais “FRs de um anticorpo

humano conhecido” podem incluir FRs de um anticorpo humano registrado em uma base de dados de sequência conhecida na técnica, tal como GenBank, e FRs selecionadas de uma sequência comum (sequência consensual humana mais homóloga; Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, 1991) derivadas de cada subgrupo de um anticorpo humano.

[0048] A CDR1 de cadeia H no anticorpo presente em geral se localiza nas posições H31 a H35 com base na numeração Kabat (vide o documento “Kabat, E.A. et al., (1991) NIH Publication No. 91-3242, sequences of proteins of immunological interest”). A cadeia H de CDR2 no anticorpo presente em geral se localiza nas posições H50 a H52, H52A, e H53 a H65 com base na numeração Kabat. A cadeia H de CDR3 no anticorpo presente em geral se localiza nas posições H95 a H100, H100A, H100B, H101, e H102 com base na numeração Kabat. A cadeia L de CDR1 no anticorpo presente em geral se localiza nas posições L24 a L34 com base na numeração Kabat. A cadeia L de CDR2 no anticorpo presente em geral se localiza nas posições L50 a L56 com base na numeração Kabat. A cadeia L de CDR3 no anticorpo presente em geral se localiza nas posições L89 a L97 com base na numeração Kabat.

[0049] Exemplos do anticorpo compreendendo a CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L, descrito anteriormente em (1-1) como o anticorpo presente, podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões variáveis (V) de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (1-2), e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3); o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-1), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-2), e o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (1-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito

anteriormente em (2-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (2-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3); o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-1), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-2), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-3), e o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-4); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (2-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (3-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (3-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (3-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (3-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (4-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (4-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (4-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (4-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (5-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (5-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (5-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (5-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (6-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (6-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (6-3); e um anticorpo compreendendo

a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (6-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (7-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (7-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (7-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (7-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (8-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (8-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (8-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (8-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (9-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (9-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (9-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (9-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (10-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (10-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (10-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (10-4). Exemplos do anticorpo compreendendo as CDR1 e CDR3 de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (11-1) podem incluir um anticorpo compreendendo as regiões V de cadeia H e cadeia L descrito anteriormente em (11-2) e podem incluir especificamente: o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (11-3); e um anticorpo compreendendo a cadeia H e a cadeia L descrito anteriormente em (11-4). A região variável de cadeia

pesada e a região variável de cadeia leve no anticorpo de cadeia única são em geral ligadas por meio de um ligador de peptídeo.

[0050] O CAR presente pode compreender o anticorpo de cadeia única presente, uma região transmembrana fundida com a terminação C do anticorpo de cadeia única presente, e uma região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente fundida com a terminação C da região transmembrana. Neste contexto, a fusão entre o anticorpo de cadeia única presente e a região transmembrana, ou entre a região transmembrana e a região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente pode ser mediada por um ligador de peptídeo ou uma região de dobradiça IgG4.

[0051] Exemplos do tamanho do ligador de peptídeo no anticorpo presente podem incluir 1 a 100 resíduos de aminoácido, preferivelmente 10 a 50 resíduos de aminoácido. Exemplos do ligador de peptídeo no anticorpo presente podem incluir especificamente uma ligação consecutiva de 3 sequências de aminoácido, cada qual consistindo em 1 a 4 resíduos de glicina e 1 resíduo de serina.

[0052] A região transmembrana pode ser qualquer peptídeo que pode penetrar uma membrana celular. Exemplos destas podem incluir uma região transmembrana derivada de CD8, uma cadeia α ou β do receptor de célula T, CD3 ζ , CD28, CD3 ϵ , CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, ICOS, CD154, EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), ou GITR e podem incluir especificamente uma região transmembrana CD8 humana que consiste em resíduos de aminoácido 1 a 83 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185. Alternativamente, a região transmembrana pode ser derivada de um peptídeo que pode penetrar a membrana celular pela truncção de 1 a 10 resíduos de aminoácido C-terminais, preferivelmente 6 ou 7 resíduos de aminoácido. Exemplos destas podem incluir a forma geneticamente modificada 1 da região transmembrana CD8 de humano

consistindo em resíduos de aminoácido 1 a 77 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186, e a forma geneticamente modificada 2 da região transmembrana CD8 de humano consistindo em resíduos de aminoácido 1 a 76 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187.

[0053] A região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente pode ser qualquer região capaz de transduzir um sinal nas células imunocompetentes, mediante ligação do anticorpo de cadeia única presente GPC3 de humano. A região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente compreende preferivelmente pelo menos um ou mais elementos selecionados de polipeptídeos das regiões intracelulares de CD28, 4-1BB (CD137), GITR, CD27, OX40, HVEM, CD3 ζ , e cadeia γ associada ao receptor Fc, e compreende mais preferivelmente três polipeptídeos das regiões intracelulares de CD28, 4-1BB, e CD3 ζ . Exemplos de um polipeptídeo como este da região intracelular de CD28 podem incluir especificamente um polipeptídeo da região intracelular de CD28 de humano consistindo em resíduos de aminoácido 85 a 124 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185. Exemplos do “polipeptídeo da região intracelular de 4-1BB” podem incluir especificamente um polipeptídeo da região intracelular de 4-1BB de humano, que consiste em resíduos de aminoácido 125 a 170 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185. Exemplos do polipeptídeo da região intracelular de CD3 ζ podem incluir especificamente um polipeptídeo da região intracelular de CD3 ζ de humano, que consiste em resíduos de aminoácido 172 a 283 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185.

[0054] Arginina (Arg) na posição 84 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185, arginina na posição 78 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186, e arginina na posição 77 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187 são uma

sequência comum entre o polipeptídeo da região transmembrana derivado de CD8 de humano e o polipeptídeo da região intracelular de CD8 de humano. Leucina (Leu) na posição 171 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185, leucina na posição 165 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186, e leucina na posição 164 da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187 são uma sequência comum entre o polipeptídeo da região intracelular de 4-1BB de humano e o polipeptídeo da região intracelular de CD3 ζ de humano.

[0055] Na presente especificação, a “célula imunocompetente” significa uma célula responsável por funções imunes em um corpo vivo. Exemplos da célula imunocompetente podem incluir: uma célula linfóide tal como uma célula T, uma célula extermadora natural (célula NK), e uma célula B; uma célula apresentadora de antígeno tal como um monócito, um macrófago, e uma célula dendrítica; e um granulócito tal como um neutrófilo, um eosinófilo, um basófilo, e um mastócito. Exemplos específicos desta podem incluir preferivelmente uma célula T derivada de um mamífero, tal como um humano, um cachorro, um gato, um porco ou um camundongo, preferivelmente uma célula T derivada de humano. A célula T pode ser obtida por isolamento ou purificação de uma célula imunocompetente que se infiltra em um fluido corporal tal como sangue ou fluido da medula óssea, um tecido do baço, do timo, linfonodo ou similares, ou um tecido de câncer de tumor primário, tumor metastático, ascites cancerosas ou similares. Alternativamente, uma célula T preparada a partir de uma célula ES ou uma célula iPS pode ser utilizada. Exemplos de uma célula T como esta podem incluir uma célula T alfa-beta, uma célula T gama-delta, uma célula T CD8 $^{+}$, uma célula T CD4 $^{+}$, uma célula T de infiltração tumoral, uma célula T de memória, uma célula T virgem, e uma célula T NK. A origem da célula imunocompetente pode ser a mesma ou diferente de um sujeito da administração. Quando o sujeito da administração é um humano, uma célula

autóloga coletada de um paciente como o sujeito da administração pode ser usada como a célula imunocompetente, ou qualquer das outras células coletadas de um sujeito sem ser o sujeito da administração pode ser usada como a célula imunocompetente. Especificamente, o doador e o receptor podem ser o mesmo ou diferentes, e é preferivelmente o mesmo.

[0056] Exemplos do sujeito da administração podem incluir preferivelmente um mamífero e uma célula de mamífero. Exemplos do mamífero podem incluir mais preferivelmente um humano, um camundongo, um cachorro, um rato, um porquinho da índia, um coelho, um pássaro, ovelha, um porco, gado, um cavalo, um gato, um macaco e um chimpanzé, particularmente preferível um humano.

[0057] O CAR presente é preferivelmente usado para expressão *ex vivo* na superfície celular da célula imunocompetente coletada de um paciente com câncer em tratamento de câncer. No caso de usar uma célula T como a célula imunocompetente, exemplos do peptídeo que consiste na região transmembrana, e na região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente fundida com a terminação C da região transmembrana no CAR presente, podem incluir especificamente um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por qualquer de SEQ ID NOs: 185 a 187. Exemplos do CAR presente podem incluir especificamente CAR compreendendo anticorpo de cadeia única selecionado do grupo que consiste no anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-1), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-2), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-3), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-1), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-2), o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-3), e o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-4), e um peptídeo que consiste na sequência

de aminoácido representada por qualquer de SEQ ID NOs: 185 a 187, fundida com a terminação C do anticorpo de cadeia única.

[0058] Especificamente, exemplos do CAR presente podem incluir:

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-1), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-1), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-1), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-2), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-2), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-2), e um peptídeo que consiste na sequência de

aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-1), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-1), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-1), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito

anteriormente em (2-3'-2), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-2), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-2), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-3), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-4), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185,

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-4), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 186, e

CAR compreendendo o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-4), e um peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 187.

[0059] A célula imunocompetente presente pode ser qualquer célula imunocompetente que expressa CAR. Uma vez que CAR em geral não ocorre naturalmente, a célula imunocompetente expressa CAR exógeno, CAR não

endógeno. A célula imunocompetente presente preferivelmente expressa de maneira adicional IL-7 e/ou CCL19. Quando observa-se que a célula imunocompetente é uma célula que não expressa IL-7 e/ou CCL19, por exemplo, uma célula T, ou quando a célula imunocompetente é uma célula sem ser uma célula T que expressa pouco IL-7 e/ou CCL19, a célula imunocompetente presente preferivelmente expressa IL-7 e/ou CCL19 exógeno.

[0060] A célula imunocompetente presente pode ser preparada introduzindo o vetor presente compreendendo o gene CAR presente, e um vetor compreendendo gene IL-7 e/ou CCL19 em uma célula imunocompetente. O método de introdução pode ser qualquer método para introduzir DNA em células de mamífero. Exemplos deste podem incluir um método tal como eletroporação (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), método de fosfato de cálcio (Publicação do pedido de patente Japonesa não examinada 2-227075), lipofecção (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7413 (1987)), e método de infecção viral. Exemplos de um método de infecção viral podem incluir um método que envolve transfectar uma célula de acondicionamento tal como uma célula GP2-293 (fabricada por Takara Bio Inc.), uma célula Plat-GP (fabricada por Cosmo Bio Co., Ltd.), uma célula PG13 (ATCC CRL-10686), ou uma célula PA317 (ATCC CRL-9078) com um vetor de expressão CAR (Publicação internacional WO 2016/056228) e um plasmídeo de acondicionamento para preparar um vírus recombinante, e infectar uma célula T com o vírus recombinante.

[0061] A célula imunocompetente presente pode ser produzida incorporando um nucleotídeo que codifica o CAR presente e um nucleotídeo que codifica IL-7 e/ou CCL19 no genoma de uma célula, pelo uso de uma técnica de edição de gene conhecida na tecnologia, de maneira tal que os nucleotídeos são expressíveis no controle de um promotor apropriado. Exemplos da técnica de edição de gene conhecida na técnica incluem uma

técnica que usa endonuclease tal como nuclease dedo de zinco, TALEN (nuclease efetora semelhante a ativador de transcrição), ou sistema CRISPR (repetição palindrômica curta interespacada regularmente agrupada)-Cas.

[0062] A célula imunocompetente presente pode ser usada em combinação com um agente anticâncer adicional. Exemplos do agente anticâncer adicional podem incluir: um fármaco de alquilação tal como ciclofosfamida, bendamustina, ifosfamida e dacarbazina; um antimetabólito tal como pentostatina, fludarabina, cladribina, metotrexato, 5-fluorouracil, 6-mercaptopurina e enocitabina; um fármaco de alvejamento molecular tal como rituximabe, cetuximabe e trastuzumabe; um inibidor de quinase tal como imatinibe, gefitinibe, erlotinibe, afatinibe, dasatinibe, sunitinibe e trametinibe; um inibidor de proteassoma tal como bortezomibe; um fármaco inibidor de calcineurina tal como ciclosporina e tacrolimo; um antibiótico anticâncer tal como idarubicina e doxorubicina mitomicina C; um alcalóide vegetal tal como irinotecano e etoposido; um fármaco contendo platina tal como cisplatina, oxaliplatina e carboplatina; um hormônio terapêutico tal como tamoxifeno e bicalutamida; e um fármaco imunossupressor tal como interferon, nivolumabe e pembrolizumabe.

[0063] Exemplos do método para “usar a célula imunocompetente presente em combinação com o agente anticâncer adicional” podem incluir um método que usa o tratamento com o agente anticâncer adicional, seguido pelo uso da célula imunocompetente presente, um método usando a célula imunocompetente presente e o agente anticâncer adicional ao mesmo tempo, e um método usando tratamento com a célula imunocompetente presente seguido pelo uso do agente anticâncer adicional. O uso da célula imunocompetente presente em combinação com o agente anticâncer adicional pode melhorar adicionalmente um efeito terapêutico em um câncer, e também pode reduzir suas respectivas reações adversas diminuindo seus respectivos números de administração ou doses.

[0064] O gene de anticorpo presente não é particularmente limitado, contanto que o gene de anticorpo (nucleotídeo) codifique o anticorpo presente. Exemplos deste podem incluir:

(1-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 111 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (1-1)), ou um códon degenerado forma geneticamente modificada do CDR1 de cadeia H gene; um CDR2 de cadeia H gene consistindo em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 111 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (1-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 324 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 111 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (1-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L consistindo na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 112 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (1-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 112 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (1-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de

CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 112 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (1-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(2-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 115 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (2-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 115 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (2-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 321 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 115 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (2-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 117 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 116 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (2-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 163 a 183 do gene de região V de cadeia L que consiste na

sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 116 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (2-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 280 a 306 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 116 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (2-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(3-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 119 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (3-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 119 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (3-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 315 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 119 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (3-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 120 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (3-1)), ou uma forma

geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 120 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (3-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 288 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 120 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (3-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(4-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 123 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (4-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 123 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (4-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 298 a 330 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 123 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (4-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de

nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 124 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (4-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 124 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (4-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 124 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (4-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(5-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 127 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (5-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 127 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (5-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 298 a 321 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 127 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (5-1)), ou uma

forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 120 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 128 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (5-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 166 a 186 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 128 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (5-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 283 a 309 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 128 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (5-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(6-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 131 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (6-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 131 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (6-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em

resíduos de nucleotídeo 295 a 318 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 131 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (6-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 132 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (6-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 132 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (6-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 132 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (6-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(7-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 135 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (7-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID

NO: 135 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (7-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 315 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 135 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (7-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 136 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (7-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 136 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (7-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 136 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (7-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(8-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 139 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (8-1)), ou uma forma geneticamente modificada de

códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 139 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (8-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 315 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 139 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (8-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 140 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (8-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 140 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (8-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 140 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (8-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3,

(9-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um

gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 143 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (9-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 143 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (9-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 298 a 330 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 143 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (9-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 144 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (9-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 144 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (9-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 144 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (9-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de

CDR3,

(10-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 147 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (10-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 147 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (10-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 327 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 147 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (10-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H; e

um gene de CDR1 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 70 a 102 de um gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 148 (gene que codifica a cadeia L de CDR1 descrito anteriormente em (10-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR1; um gene de CDR2 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 168 do gene de região V de cadeia L que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 148 (gene que codifica a cadeia L de CDR2 descrito anteriormente em (10-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR2; e um gene de CDR3 de cadeia L que consiste em resíduos de nucleotídeo 265 a 291 do gene de região V de cadeia L que consiste na

sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 148 (gene que codifica a cadeia L de CDR3 descrito anteriormente em (10-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de cadeia L de CDR3, e

(11-1D) um gene de anticorpo compreendendo: um gene de CDR1 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 91 a 105 de um gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 151 (gene que codifica a cadeia H de CDR1 descrito anteriormente em (11-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene CDR1 de cadeia H; um gene de CDR2 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 148 a 198 do gene de região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 151 (gene que codifica a cadeia H de CDR2 descrito anteriormente em (11-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR2 de cadeia H; e um gene de CDR3 de cadeia H que consiste em resíduos de nucleotídeo 295 a 324 do região V de cadeia H que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 151 (gene que codifica a cadeia H de CDR3 descrito anteriormente em (11-1)), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene de CDR3 de cadeia H.

[0065] Exemplos adicionais do gene de anticorpo presente podem incluir:

(1-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 111 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7), e um gene de região variável de

cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 112 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8),

(2-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 115 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 17), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 116 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18),

(3-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 119 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 120 (gene que codifica uma região variável de

cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28),

(4-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 123 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 124 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38),

(5-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 127 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 128 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48),

(6-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 131 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 132 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58),

(7-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 135 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 136 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68),

(8-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de

nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 139 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 140 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78),

(9-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 143 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 87), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 144 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88),

(10-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 147 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de

aminoácido representada por SEQ ID NO: 97), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 148 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98), e

(11-2D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 151 (gene que codifica uma região variável de cadeia H que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107), e um gene de região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 152 (gene que codifica uma região variável de cadeia L que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108).

Particularmente, exemplos do gene de anticorpo presente podem incluir especificamente:

(1-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 113 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 9), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de

nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 114 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 10),

(2-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 117 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 19), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 118 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 20),

(3-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 121 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 29), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 122 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 30),

(4-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 125 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 39), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 126 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 40),

(5-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 129 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 49), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 130 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 50),

(6-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 133 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais

de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 59), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 134 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 60),

(7-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 137 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 69), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 138 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 70),

(8-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 141 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 79), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 142 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo

menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 80),

(9-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 145 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 89), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 146 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 90),

(10-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 149 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 99), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 150 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 100), e

(11-4D) um gene de anticorpo compreendendo um gene de cadeia H que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo

representada por SEQ ID NO: 153 (gene que codifica uma cadeia H consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 109), e um gene de cadeia L que consiste em uma sequência de nucleotídeo com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 154 (gene que codifica uma cadeia L consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 110).

[0066] O gene CAR presente não é particularmente limitado, contanto que o gene (nucleotídeo) codifique o CAR presente. Exemplos deste podem incluir especificamente:

(1-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(2-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(3-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (3-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(4-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (4-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(5-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (5-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(6-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (6-3), ou uma forma

geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(7-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (7-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(8-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (8-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(9-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (9-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(10-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (10-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(11-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (11-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(1-3'-1D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-1), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(1-3'-2D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-2), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(1-3'-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (1-3'-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(2-3'-1D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-1), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(2-3'-2D) um gene CAR compreendendo um gene que

codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-2), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene,

(2-3'-3D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-3), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene, e

(2-3'-4D) um gene CAR compreendendo um gene que codifica o anticorpo de cadeia única descrito anteriormente em (2-3'-4), ou uma forma geneticamente modificada de códon degenerado do gene.

[0067] Na presente especificação, a frase “pelo menos 80% de identidade ou mais” significa que a identidade é 80% ou mais, preferivelmente 85% ou mais, mais preferivelmente 88% ou mais, adicionalmente de maneira preferível 90% ou mais, ainda adicionalmente de maneira preferível 93% ou mais, particularmente de maneira preferível 95% ou mais, particularmente de maneira mais preferível 98% ou mais, acima de tudo preferivelmente 100%.

[0068] Na presente especificação, o termo “identidade” significa o grau de similaridade entre sequências de polipeptídeo ou polinucleotídeo (este grau é determinado combinando uma sequência de entrada com uma outra sequência, preferivelmente do mesmo tipo (sequência de ácido nucleico ou proteína)). Exemplos de um método de programa de computador preferido para calcular e determinar a “identidade” incluem, mas sem limitação, GCG BLAST (Ferramenta de busca de alinhamento local básico) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403-410; Altschul et al., Nucleic Acids Res. 1997, 25: 3389-3402; e Devereux et al., Nucleic Acid Res. 1984, 12: 387), BLASTN 2.0 (Gish W., <http://blast.wustl.edu>, 1996-2002), FASTA (Pearson e Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 1988, 85: 2444-2448), e GCG GelMerge que determina e alinha um par dos contigs com sobreposição mais longa (Wibur e Lipman, SIAM J. Appl. Math. 1984, 44: 557-567; e Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 1970, 48: 443-453).

[0069] Na presente especificação, a “sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: X” é, em outras palavras, uma “sequência de aminoácido derivada da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: X pela eliminação, substituição, inserção e/ou adição de 0, 1 ou vários resíduos de aminoácido” e apresenta funções equivalentes àquelas da sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: X. Neste contexto, a “sequência de aminoácido derivada pela eliminação, substituição, inserção, e/ou adição de 1 ou vários resíduos de aminoácido” significa uma sequência de aminoácido na qual resíduos de aminoácido foram eliminados, substituídos, inseridos e/ou adicionados, por exemplo, na faixa de 1 a 30 resíduos, preferivelmente na faixa de 1 a 20 resíduos, mais preferivelmente na faixa de 1 a 15 resíduos, adicionalmente de maneira preferível na faixa de 1 a 10 resíduos, adicionalmente de maneira preferível na faixa de 1 a 5 resíduos, adicionalmente de maneira preferível na faixa de 1 a 3 resíduos, adicionalmente de maneira preferível na faixa de 1 ou 2 resíduos. O tratamento por mutação destes resíduos de aminoácido pode ser realizado por um método arbitrário conhecido pelos versados na técnica, tal como síntese química, uma abordagem de engenharia genética ou mutagênese.

[0070] O promotor no vetor presente pode ser qualquer região que inicia na transcrição de RNAm codificado pelo gene de anticorpo presente, localizado a jusante do promotor. O promotor compreende em geral um sítio de início de transcrição (TSS).

[0071] O tipo do promotor ou do vetor no vetor presente pode ser selecionado de maneira apropriada, de acordo com o tipo de uma célula hospedeira (ou um organismo hospedeiro) no qual o vetor presente é introduzido.

[0072] A célula hospedeira pode expressar o anticorpo presente pela transcrição do gene de anticorpo presente, ou pode expressar o CAR presente

pela transcrição de RNAm do gene CAR presente. No caso de introduzir um “vetor compreendendo o gene de anticorpo presente” como o vetor presente, uma levedura, uma célula de mamífero, uma célula de inseto, ou uma célula de planta fornecida a seguir pode ser usada como a célula hospedeira. No caso de introduzir um “vetor compreendendo o gene CAR presente” como o vetor presente, a célula imunocompetente descrita anteriormente pode ser usada como a célula hospedeira.

[0073] No caso de usar uma levedura (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*) como a célula hospedeira, exemplos do vetor presente podem incluir um vetor tal como YEP13 (ATCC37115), YEp24 (ATCC37051), e YCp50 (ATCC37419), e um vetor derivado do vetor. Exemplos do promotor podem incluir promotor do gene de glicólise (por exemplo, gene de hexose quinase), promotor de PHO5, promotor de PGK, promotor de GAP, promotor de ADH, promotor de gal1, promotor de gal10, promotor da proteína do choque térmico, promotor de MF α 1 e promotor de CUP1.

[0074] No caso de usar uma célula de mamífero (por exemplo, uma célula Namalwa derivada de humano, uma célula COS derivada de macaco, uma célula CHO derivada de ovário de hamster chinês, e uma célula T derivada de humano ou camundongo) como a célula hospedeira e usar um vetor compreendendo o gene de anticorpo como o vetor presente, exemplos do vetor presente podem incluir um vetor tal como pDNAcl, pcDM8 (fabricado por Funakoshi Co., Ltd.), pAGE107 (Publicação de pedido de patente Japonesa não examinada 3-22979; e Cytotechnology, 3, 133,(1990)), pAS3-3 (Publicação de pedido de patente Japonesa não examinada 2-227075), pCDM8 (Nature, 329, 840, (1987)), pDNAcl/Amp (fabricado por Invitrogen Corp.), pREP4 (fabricado por Invitrogen Corp.), pAGE103 (J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)), e pAGE210, e um vetor derivado do vetor. Por outro lado, no caso de usar uma célula de mamífero (por exemplo, a célula

imunocompetente derivada de humano descrita anteriormente) como a célula hospedeira e usar um vetor compreendendo o gene CAR como o vetor presente, exemplos do vetor presente podem incluir um vetor de retrovírus tal como um vetor pMSGV (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18: 6436-6445 (2002)) e um vetor pMSCV (fabricado por Takara Bio Inc.), e um vetor derivado do vetor.

[0075] Exemplos do promotor no vetor presente podem incluir promotor do gene de citomegalovírus (CMV) IE (expressão imediata), promotor precoce de SV40, promotor de retrovírus, promotor de metalotioneína, promotor de choque térmico, promotor de SRα, promotor de NFAT, e promotor de HIF.

[0076] No caso de usar uma célula de inseto (por exemplo, uma célula Sf9 e uma célula Sf21 que são células ovarianas de *Spodoptera frugiperda*, e uma célula High5 que é uma célula ovariana de *Trichoplusia ni*) como a célula hospedeira, exemplos do vetor presente podem incluir um vetor de transferência para uso em métodos de preparação de baculovírus recombinante, especificamente um vetor tal como pVL1392, pVL1393 e pBlueBacIII (todos fabricados por Invitrogen Corp.), e um vetor derivado do vetor. Exemplos do promotor podem incluir promotor de poli-hedrina e promotor de p10.

[0077] No caso de usar uma célula de planta (por exemplo, células de tabaco, batata, tomate, cenoura, soja, colza, alfalfa, arroz, trigo e cevada) como a célula hospedeira, exemplos do vetor de expressão podem incluir um vetor tal como plasmídeo Ti e vetor do vírus do mosaico do tabaco, e um vetor derivado do vetor. Exemplos do promotor podem incluir promotor 35S do vírus do mosaico da couve-flor (CaMV) e promotor actina 1 de arroz.

[0078] O vetor presente compreende preferivelmente de maneira adicional as sequências de nucleotídeo de uma região melhoradora e um sítio de ligação de ribossomo (RBS) para melhorar adicionalmente a eficiência da

expressão de gene, e compreende adicionalmente um gene de resistência ao fármaco (por exemplo, gene de resistência à espectinomicina, gene de resistência ao cloranfenicol, gene de resistência à tetraciclina, gene de resistência à canamicina, gene de resistência à ampicilina, gene de resistência à puromicina, gene de resistência à higromicina, gene de resistência à blasticidina, e gene de resistência à geneticina) apropriado para o tipo da célula hospedeira, para a triagem para a célula hospedeira presente. A região melhoradora é em geral arranjada à montante do promotor, e RBS é em geral arranjada entre o promotor e o gene presente. A sequência de nucleotídeo do gene de anticorpo presente a ser incorporada no vetor presente pode ser submetida à otimização de uma sequência de códon, de acordo com a célula hospedeira para expressão. O vetor presente pode ser preparado por um método conhecido na técnica, usando uma técnica de recombinação genética.

[0079] A célula hospedeira presente pode ser obtida introduzindo o vetor presente na célula hospedeira (transfectando a célula hospedeira com este) por um método apropriado para o tipo da célula hospedeira.

[0080] No caso de usar a levedura descrita anteriormente como a célula hospedeira, o método para introduzir o vetor presente na levedura pode ser qualquer método para introduzir DNA na levedura. Exemplos deste podem incluir um método tal como eletroporação (Methods Enzymol., 194, 182 (1990)), método de esferoplasto (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 84, 1929 (1978)), e método de acetato de lítio (J. Bacteriology, 153, 163 (1983)).

[0081] No caso de usar a célula de mamífero descrita anteriormente como a célula hospedeira, o método para introduzir o vetor presente na célula de mamífero pode ser qualquer método para introduzir DNA na célula de mamífero. Exemplos deste podem incluir um método tal como eletroporação (Cytotechnology, 3, 133 (1990)), método de fosfato de cálcio (Publicação de pedido de patente Japonesa não examinada 2-227075), lipofecção (Proc. Natl.

Acad. Sci. Estados Unidos., 84, 7413 (1987)), e método de infecção viral, da maneira mencionada anteriormente. Exemplos de um método de infecção viral como este podem incluir um método que envolve transfectar uma célula de acondicionamento tal como uma célula GP2-293 (fabricada por Takara Bio Inc.), uma célula Plat-GP (fabricada por Cosmo Bio Co., Ltd.), uma célula PG13 (ATCC CRL-10686), ou uma célula PA317 (ATCC CRL-9078) com um vetor de expressão de CAR (Publicação Internacional WO 2016/056228) e um plasmídeo de embalagem para preparar um vírus recombinante, e infectar uma célula T com o vírus recombinante, da maneira mencionada anteriormente.

[0082] No caso de usar a célula de inseto descrita anteriormente como a célula hospedeira, exemplos do método para introduzir o vetor presente na célula de inseto podem incluir um método que envolve cotransfectar a célula de inseto com o vetor presente (vetor de transferência) e DNA genômico derivado de baculovírus para preparar um baculovírus recombinante, de acordo com um método descrito em “Current Protocols in Molecular Biology”, “Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and Company, Nova Iorque (1992)”, “Bio/Technology, 6, 47 (1988)”, etc. Exemplos de um método de cotransfecção como este podem incluir um método tal como método de fosfato de cálcio (Publicação de pedido de patente Japonesa não examinada 2-227075) e lipofecção (Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos., 84, 7413 (1987)).

[0083] No caso de usar a célula de planta descrita anteriormente como a célula hospedeira, exemplos do método para introduzir o vetor presente na célula de planta podem incluir um método tal como um método usando *Agrobacterium* (Publicações do pedido de patente Japonesa não examinadas 59-140885 e 60-70080), eletroporação (Publicação de pedido de patente Japonesa não examinada 60-251887), e um método usando uma arma de pastícula (arma de gene) (patentes Japonesas 2606856 e 2517813).

[0084] O anticorpo presente pode ser obtido cultivando a célula hospedeira presente obtida pelo método mencionado anteriormente em uma solução de cultura apropriada para a célula hospedeira.

[0085] Um animal transgênico, tal como um camundongo, gado, uma cabra, ovelha, uma galinha, ou um porco, em que o gene de anticorpo presente (o vetor presente) foi incorporado é preparado para uso de uma técnica de preparação de animal transgênico, e um anticorpo derivado do gene de anticorpo presente também pode ser produzido em uma grande quantidade a partir do sangue, leite ou similares do animal transgênico.

[0086] Animais não humanos (por exemplo, camundongos e ratos) são imunizados com uma substância compreendendo um polipeptídeo de GPC3 derivado de humano, consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155 (antígeno de polipeptídeo de GPC3). Uma biblioteca fago de genes scFv é preparada por um método de exibição de fago. O scFv presente pode ser obtido por um método de seleção biológica usando o antígeno de polipeptídeo de GPC3 e/ou uma linhagem celular que expressa o antígeno de polipeptídeo de GPC3 (preferivelmente uma linhagem celular que não expressa nenhum GPC3 endógeno) e adicionalmente, de maneira preferível, um polipeptídeo de GPC3 C-terminal competidor consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 159. A partir dos animais não humanos assim imunizados com o antígeno, hibridomas produtores de anticorpo são preparados para uso de uma técnica de fusão de célula. Um sobrenadante de cultura contendo o anticorpo presente também pode ser obtido através da seleção por ELISA usando uma placa na qual o antígeno foi imobilizado em uma fase sólida. O anticorpo presente pode ser separado e purificado a partir do sobrenadante da cultura pelo uso de uma técnica de purificação de anticorpo conhecida na técnica.

[0087] O método de detecção presente pode ser qualquer método compreendendo a etapa de detectar GPC3 localizado em uma membrana

celular (ancorado em uma membrana celular) em uma amostra (por exemplo, sangue, um tecido, e urina) usando o anticorpo presente. Exemplos específicos do método de detecção podem incluir coloração imunofluorescente, Western blotting, e ELISA usando o anticorpo presente.

[0088] O kit para detecção presente é um kit compreendendo o anticorpo presente ou uma forma marcada deste, e é limitado pelo propósito de “detectar GPC3”. O kit em geral compreende componentes geralmente usados neste tipo de kit, por exemplo, um carreador, um agente de tamponamento de pH, e um estabilizante, bem como um documento anexado, tal como um manual e uma instrução para detectar GPC3.

[0089] A espécie de organismo de GPC3 a ser detectada no método de detecção presente ou no kit para detecção presente pode ser um animal não humano, tal como um camundongo ou um rato, e é em geral um humano.

[0090] Exemplos do material de marcação para a forma marcada do anticorpo presente podem incluir: uma enzima tal como peroxidase (por exemplo, peroxidase de rábano silvestre [HRP]), fosfatase alcalina, β -D-galactosidase, glicose oxidase, glicose-6-fosfato desidrogenase, álcool desidrogenase, malato desidrogenase, penicilinase, catalase, apo-glicose oxidase, urease, luciferase e acetilcolinesterase; um material fluorescente tal como isotiocianato de fluoresceína, ficobiliproteína, quelatos de metal terroso raro, cloreto de dansila e isotiocianato de tetrametilrodamina; uma proteína de fluorescência tal como proteína de fluorescência verde (GFP), proteína de fluorescência ciano (CFP), proteína de fluorescência azul (BFP), proteína de fluorescência amarela (YFP), proteína de fluorescência vermelha (RFP) e luciferase; um radioisótopo tal como ^3H , ^{14}C , ^{125}I e ^{131}I ; biotina; avidina e um material de quimioluminescência.

[0091] Referências, tais como literaturas científicas, patentes e pedidos de patente, aqui citadas são aqui incorporadas pela referência na sua íntegra, na mesma medida como se cada referência individual fosse

especificamente descrita. O presente pedido reivindica a prioridade com base no pedido de patente Japonesa 2017-001732 (depositado em 10 de janeiro de 2017), cujos conteúdos são aqui incorporados pela referência na sua íntegra.

[0092] Daqui por diante, a presente invenção será descrita mais especificamente com referência aos exemplos. Entretanto, o escopo técnico da presente invenção não é limitado por estes exemplos.

Exemplo 1

[0093] 1. Preparação de anticorpo anti-GPC3 inédito que conhece polipeptídeo N-terminal de GPC3 de humano

[Sumário]

[0094] Camundongos SKG/Jcl foram usados como animais a serem imunizados para preparar um anticorpo anti-GPC3 de humano, e proteína GPC3 de humano de tamanho completo foi usada como um antígeno de imunização. Os camundongos SKG/Jcl eram camundongos de modelo de doença autoimune que desenvolveram espontaneamente artrite reumatoide, e são conhecidos por produzir anticorpos em resposta mesmo aos próprios componentes, dependendo do envelhecimento ou de um ambiente de criação. Entretanto, GPC3 é altamente homólogo entre humanos e camundongos e, em geral, é menos propenso a induzir a produção de anticorpo mesmo pela imunização de camundongos normais. Portanto, os camundongos SKG/Jcl foram usados como animais a serem imunizados. Uma biblioteca de fago scFv foi preparada a partir de DNAc derivado de células B dos camundongos imunizados com GPC3, e um anticorpo anti-GPC3 de humano foi isolado pela aplicação do método de exibição de fago.

[0095] Embora o antissoro de camundongos imunizados contenha muitos tipos de anticorpos, é necessário selecionar camundongos que produzem anticorpos com especificidade para o polipeptídeo N-terminal de GPC3, excluindo camundongos que produzem anticorpos pouco específicos para GPC3 ou anticorpos que reconhecem o polipeptídeo C-terminal de

GPC3. Dessa maneira, camundongos individuais que exibiram a produção de um anticorpo que se liga especificamente ao polipeptídeo N-terminal de GPC3 foram selecionados pelo uso de ELISA e FCM. Especificamente, DNAc foi sintetizado por reação de transcrição reversa a partir do RNA total das células B derivadas dos camundongos imunizados, e genes de anticorpo foram amplificados para preparar uma biblioteca de gene de anticorpo. Uma biblioteca de fago scFv foi construída a partir da biblioteca de gene de anticorpo, e *E. coli* foi infectada com a biblioteca, de maneira tal que *E. coli* expressasse scFv, seguido pela seleção biológica usando GPC3 recombinante, a linhagem celular que expressa GPC3, e o polipeptídeo C-terminal de GPC3 para melhorar fagos que expressam o scFv alvo, isto é, um anticorpo contra o polipeptídeo N-terminal de GPC3. A fim de analisar adicionalmente o scFv obtido para especificidade de ligação para GPC3 em células, isto é, GPC3 localizado em (ligado a) uma membrana celular (GPC3 ligado à membrana) por meio de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol), a verificação foi realizada pelo uso de ELISA a base de células e FCM. Além disso, as sequências de nucleotídeo de regiões variáveis de cadeia H e cadeia L de clones com especificidade de ligação foram sequenciadas, e as sequências de nucleotídeo dos anticorpos anti-GPC3 produzidas pelas células B, derivadas dos camundongos imunizados, foram determinadas com base nestas sequências. Finalmente, o método de exibição de mamífero que envolveu expressar o fragmento de polipeptídeo N-terminal e o fragmento de polipeptídeo C-terminal de GPC3 na superfície celular foi usado para confirmar que o epítopo para o scFv foi o fragmento de polipeptídeo N-terminal de GPC3. Daqui por diante, serão exibidos métodos e resultados detalhados.

1-1 Material e método

[Cultura de células]

[0096] Uma linhagem celular JHH7, uma linhagem celular HepG2, e

uma linhagem celular SK-Hep-1 forçadas a expressar GPC3 de humano de tamanho completo (daqui por diante, também referidas como uma “linhagem celular que expressa GPC3”) foram usadas como células que expressam GPC3 de humano para realizar a seleção biológica e seleção de um anticorpo anti-GPC3. A linhagem celular JHH7 é uma linhagem celular que expressa GPC3 derivado de carcinoma hepatocelular, e as células expressam constitutivamente GPC3 ligado a uma membrana celular (GPC3 ligado à membrana) por meio de uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol). Por outro lado, a linhagem celular HepG2 é uma linhagem celular que expressa GPC3 derivado de carcinoma hepatocelular, como na linhagem celular JHH7, mas é uma linhagem celular na qual a expressão de GPC3 secretório que não está ligado a uma membrana celular é dominante em relação ao GPC3 ligado à membrana. A linhagem celular Sk-Hep-1 é uma linhagem celular derivada de carcinoma hepatocelular que não expressa GPC3. Consequentemente, uma linhagem celular que expressa apenas GPC3 de tamanho completo ligado à membrana, ou GPC3 ligado à membrana com um tamanho parcial deficiente em uma porção de exons, pode ser preparada por expressão forçada.

[0097] A cultura de 4 tipos de linhagens celulares (linhagem celular JHH7, linhagem celular HepG2, linhagem celular que expressa GPC3, e linhagem celular 293T derivada do epitélio do rim embrionário humano) foi realizada em condições de 37 °C e 5% de CO₂, em uma solução de cultura DMEM (fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC) contendo 10% de FBS (fabricado por Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) e 1% de penicilina-estreptomicina (fabricado por Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) (daqui por diante, referido simplesmente como uma “solução de cultura DMEM”). A cultura de uma linhagem celular CHO-K1 foi realizada em condições de 37 °C e 5% de CO₂, em uma solução de cultura Ham's F12 (fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC), contendo 10% de FBS (fabricado por Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.).

[Antígeno de imunização]

[0098] GPC3 recombinante C-terminalmente 6 × His marcado (fabricado por R & D Systems Inc.) foi ajustado em 0,1 mg/mL com PBS e misturado com um adjuvante artificial *TiterMax Gold* (fabricado por TiterMax USA, Inc.) ou CFA (adjuvante completo de Freund) (F5881, fabricado por Sigma-Aldrich Co. LLC) em quantidades iguais para preparar uma emulsão, que foi então usada como um antígeno de imunização inicial. GPC3 recombinante foi ajustado em uma concentração de 10 a 100 µg/mL com PBS e usado como o segundo ou último antígeno de imunização.

[0099] [Preparação de linhagem celular que expressa GPC3]

[00100] Um gene que codifica GPC3 de humano de tamanho completo consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 157 (gene de GPC3 de humano de tamanho completo que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 160) foi inserido em um vetor pDNAc3.1 (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) para preparar um vetor de expressão GPC3. Uma linhagem celular SK-Hep-1 foi transfectada com o vetor de expressão de GPC3, de acordo com um método padrão, e a seguir foi cultivada em uma solução de cultura DMEM contendo G418 (fabricado por Roche Diagnostics K.K.) para estabelecer uma linhagem celular SK-Hep-1, que expressa estavelmente -length GPC3 de tamanho completo (linhagem celular que expressa GPC3).

[00101] [Imunização de camundongo]

[00102] Camundongos SKG/Jcl (CLEA Japão, Inc., fêmeas com 8 semanas, SPF) foram usados como animais a serem imunizados, e foram imunizados por meio das almofadas das patas com GPC3 recombinante, em um total de 4 vezes em intervalos de 1 semana. Em 5 semanas a partir do início da imunização, o sangue foi coletado e o soro foi preparado de acordo com um método padrão, e foi usado como um espécime para a confirmação de uma titulação de anticorpo.

[Titulação de anticorpo sérico de antissoro usando ELISA]

[00103] A fim de confirmar a resposta dos camundongos imunizados em produzir um anticorpo anti-GPC3, uma titulação de anticorpo sérico foi avaliada pelo uso de ELISA imobilizado com antígeno. 0,5 ou 2 µg/mL de GPC3 recombinante foram adicionados em 50 µL/poço em uma microplaca de 96 poços (fabricada por Nalge Nunc International), e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 1 hora ou a 4 °C por 12 horas. A seguir, 2% de *Block ACE* (fabricado por DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) foi adicionado em 200 µL/poço para realizar o tratamento por bloqueio. O soro derivado dos camundongos imunizados com GPC3 foi diluído em série de 100 vezes a 16.500 vezes com 0,1% de solução *Block ACE/PBS*. Cada amostra diluída de soro foi adicionada em 50 µL/poço, e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 2 horas para realizar o tratamento de reação antígeno-anticorpo. Após lavagem dos poços com uma solução de PBS contendo Tween 20 (PBST), IgG anti-camundongo de cabra (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.) conjugada com 2 µg/mL de peroxidase foi adicionada a estes, e a placa foi incubada em temperatura ambiente por 2 horas para realizar o tratamento de reação com anticorpo secundário. Após lavagem do poço cinco vezes com uma solução de PBST, a umidade foi removida, e um substrato de TMB (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) foi então adicionado em 50 µL/poço para realizar a reação com coloração. 15 minutos depois, a reação com coloração foi finalizada pela adição de ácido sulfúrico 0,18 M em 50 µL/poço, seguido pela avaliação da absorbância em 450 nm e 540 nm usando um leitor de placas (fabricado por Bio-Rad Laboratories, Inc.). A quantificação foi realizada usando um valor corrigido, obtido subtraindo o valor da avaliação de 540 nm a partir do valor da avaliação de 450 nm.

[Especificidade de anticorpo em antissoro usando FCM]

[00104] A fim de confirmar adicionalmente a atividade de ligação

específica do antissoro contra GPC3 ligado à membrana com os camundongos imunizados, o soro de camundongo diluído 100 vezes e 5×10^5 células da linhagem celular que expressa GPC3 foram misturados e incubados por 30 minutos no gele. Um tampão FACS (1% de solução BSA/PBS) foi adicionado a estes, e a mistura foi centrifugada para remover um sobrenadante. A seguir, 100 μ L de IgG anti-camundongo IgG de cabra 1 μ g/mL (H + L), Alexa Fluor 488 (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.), foram adicionados como um anticorpo secundário, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo para realizar tratamento de reação com anticorpo secundário. A detecção de Alexa Fluor 488 e a avaliação de um nível de fluorescência foram realizados usando um citômetro de fluxo (FACSCanto) (fabricado por BD Biosciences).

[Preparação de biblioteca de fago scFv]

[00105] O RNA total derivado de células B foi extraído, de acordo com um método padrão relacionado aos camundongos mostrados, para produzir um anticorpo que se liga ao GPC3 ligado à membrana pelo método descrito anteriormente na seção [Citômetro de fluxo]. RT-PCR com o RNA total como um molde foi realizada de acordo com um método padrão para preparar DNAc. Os genes de região variável de cadeia H e cadeia L do anticorpo foram amplificados por PCR. Uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de fusão de scFv com as regiões variáveis de cadeia H e cadeia L, ligadas por meio de um ligador flexível, e proteína g3p de revestimento (cp3) de bacteriófago fibroso M13 foram inseridas no sítio de clonagem múltipla de um vetor de fagemídeo pTZ19R para preparar um vetor de expressão scFv. O tamanho da biblioteca scFv foi calculado a partir da eficiência de transformação de uma cepa de *E. coli* DH12S (fabricada por Invitrogen Corp.). A cepa transformada DH12S foi infectada com um fago auxiliar M13KO7 (fabricado por Invitrogen Corp.) para preparar uma biblioteca de fago que expressa scFv.

[Seleção biológica e clonagem de fago scFv]

[00106] A seleção biológica de fago scFv usando uma combinação de GPC3 recombinante imobilizado em esferas magnéticas *Dynabeads His-Tag Isolation & Pulldown* (fabricadas por VERITAS Corp.) por meio de 6 × His tag, e a linhagem celular que expressa GPC3 como uma isca, foi realizada de acordo com o método descrito em um documento tal como “J Mol Biol. 1991 5 de dezembro; 222 (3): 581-97”, “J Med Virol. 2007 Junho; 79 (6): 852-62”, “Proc Natl Acad Sci U S A. 20 de maio de 2008; 105 (20): 7287-92”, ou “JOURNAL OF VIROLOGY, Abril de 2004, p. 3325-3332 Vol. 78, No. 7”. Em cada ciclo (etapa) de seleção biológica, que consiste em 5 tipos de séries (séries A à E) (vide figura 1), uma alíquota de anticorpos policlonais de fago foi amostrada. A fim de confirmar a especificidade de ligação de scFv, ELISA imobilizado com antígeno foi realizado de acordo com o método descrito anteriormente na seção [Titulação de anticorpo sérico de antissoro usando ELISA] (método usando o sobrenadante da cultura de *E. coli* contendo um fago em vez de soro), enquanto ELISA a base de células foi realizado de acordo com o método descrito a seguir na seção [Seleção de scFv por ELISA a base de células]. Cada etapa desta seleção biológica foi planejada de maneira a não selecionar um fago scFv que se liga na mesma porção do epítopo C-terminal de GPC3 reconhecida pelos anticorpos existentes, ligando antecipadamente os anticorpos anti-GPC3 GC33 existentes (fabricado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) e GC199 (fabricado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) à isca. Especificamente, este método de competição possibilita seleção seletiva de um anticorpo inédito que reconhece um epítopo GPC3 diferente daquele para os anticorpos anti-GPC3 existentes. *E. coli* DH12S foi transformada com os fagos enriquecidos pela seleção biológica, e inoculada em um meio de ágar LB agarose para separar colônias isoladas. A *E. coli* foi cultivada adicionalmente em um meio líquido LB em pequena escala, seguido pela extração e purificação de plasmídeos. Os plasmídeos purificados foram submetidos ao sequenciamento do DNA para determinar as

sequências de nucleotídeo de regiões variáveis de cadeia H e cadeia L de scFv.

[Seleção de scFv por FCM]

[00107] 100 μ L do sobrenadante da cultura, no qual fagos scFv foram selecionados, foram adicionados a uma linhagem celular que expressa GPC3 (5×10^5 células por amostra) e misturados com esta, e a mistura foi a seguir incubada por 30 minutos no gelo. Um tampão FACS (solução 1% de BSA/PBS) foi adicionado a esta, e a mistura foi centrifugada e lavada. A seguir, 1 μ g/mL de anticorpo anti-camundongo Alexa 488 (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) foi adicionado a esta como um anticorpo secundário, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo. A seguir, a coloração fluorescente das células foi avaliada usando um citômetro de fluxo (FACSCanto, fabricado por BD Biosciences).

[Seleção de scFv por ELISA a base de células]

[00108] Após remoção de uma solução de cultura DMEM a partir de uma microplaca de 96 poços na qual 2×10^5 células que expressam GPC3 foram anexadas por poço, solução 2% de BSA-PBS foi adicionada com o propósito de prevenir a ligação não específica de scFv às células ou à placa, e a placa foi incubada por 30 minutos no gelo. A seguir, 100 μ L do sobrenadante da cultura de *E. coli*, na qual fagos scFv foram secretados, foram adicionados em cada poço, e a placa foi incubada por 45 minutes no gelo. A seguir, 5 μ g/mL de anticorpo anti-cp3 de coelho (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) contra cp3, fundido na lateral C-terminal de scFv, foram adicionados em 100 μ L por poço, e a placa foi incubada adicionalmente por 45 minutos no gelo. Um anticorpo IgG anti-coelho marcado com HRP (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.), diluído 5.000 vezes, foi adicionado em 100 μ L por poço como um anticorpo terciário para a detecção de anticorpo anti-cp3, e a placa foi incubada por 45 minutos no gelo. A seguir, o-fenilenodiamina (OPD) e

peróxido de hidrogênio foram adicionados como substratos de HRP para desenvolvimento da cor. A quantificação foi realizada usando um valor numérico obtido subtraindo a absorbância em 620 nm como um fundo de absorbância em 492 nm. Quando ELISA a base de células foi realizado usando um anticorpo já convertido em um anticorpo do tipo IgG, não scFv, um anticorpo IgG anti-camundongo marcado com HRP (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) diluído 2.000 vezes foi usado como um anticorpo secundário para a detecção do anticorpo tipo IgG, em vez do anticorpo anti-cp3 e do anticorpo IgG anti-coelho marcado com HRP entre as condições descritas anteriormente.

[Determinação de sequências de gene de região variável de scFv]

[00109] As sequências de gene de região variável de fago scFv que se ligam ao GPC3 ligado à membrana foram decodificadas em um sequenciador (CEQ2000XL, fabricado por Beckman Coulter, Inc.) usando um oligonucleotídeo iniciador T7 (oligonucleotídeo iniciador que consiste na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 176), que é um oligonucleotídeo iniciador universal, e um oligonucleotídeo iniciador cp3R (oligonucleotídeo iniciador consistindo na sequência de nucleotídeo representada por SEQ ID NO: 177) como um oligonucleotídeo iniciador sentido para decodificar a região V de cadeia H (V_H) decodificante, e um oligonucleotídeo iniciador reverso para decodificar a região V de cadeia L (V_L), respectivamente.

[Preparação de linhagem celular para uso em mapeamento de epítopo de anticorpo]

[00110] A fim de identificar um epítopo para o scFv clonado, o método de demonstração em mamífero foi aplicado. Um gene que consiste em exons 1 a 7 de GPC3 de humano e que codifica um fragmento N-terminal de GPC3 (polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155), e um gene consistindo em exons 8 e 9 GPC3 de humano e que

codifica um fragmento C-terminal de GPC3 (polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 156) foram amplificados por PCR e cada qual inserido no sítio de clonagem múltipla (MSC) de um vetor de expressão pDisplay (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.). O vetor de expressão pDisplay é um vetor de expressão capaz de fundir um domínio transmembrana de receptor de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGFR) na terminação C da proteína alvo, e demonstrar o produto de fusão na superfície celular de células arbitrárias de mamífero. Igualmente, o vetor de expressão pDisplay é constituído de maneira a adicionar uma marcação HA na terminação N da proteína alvo, e adicionar uma marcação myc na terminação C do PDGFR. O vetor de expressão pDisplay para expressar o fragmento N-terminal de GPC3 ou o fragmento C-terminal GPC3 foi transferido por gene para uma linhagem celular SK-Hep-1 ou uma linhagem celular 293T, e uma linhagem celular que expressa o fragmento N-terminal de GPC3 ou o fragmento C-terminal GPC3 na superfície celular (linhagem celular que expressa fragmento N-terminal de GPC3 e linhagem celular que expressa o fragmento C-terminal GPC3) foi isolada e usada no mapeamento de epítopo de scFv.

[Mapeamento de epítopo de anticorpo por FCM]

[00111] A linhagem celular que expressa o fragmento N-terminal de GPC3, a linhagem celular que expressa o fragmento C-terminal de GPC3, e a linhagem celular que expressa GPC3 (5×10^5 células cada por amostra) foram cada qual misturadas com 100 μ L do sobrenadante da cultura, em que fagos scFv foram secretados, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo. Um tampão FACS (solução 1% de BSA/PBS) foi adicionado a esta, e a mistura foi centrifugada e lavada. A seguir, 1 μ g/mL de anticorpo anti-camundongo Alexa 488 (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.) foi adicionado a esta como um anticorpo secundário, e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo. A seguir, a coloração fluorescente das células foi avaliada usando um

citômetro de fluxo (FACSCanto, fabricado por BD Biosciences).

[Construção de vetor de expressão IgG recombinante]

[00112] A fim de converter scFv em IgG, um vetor de expressão do sistema *PowerExpress* de mamífero (fabricado por Toyobo Co., Ltd.) foi usado. Uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de fusão da região variável de cadeia H de scFv e uma região constante derivada de cadeia H de IgG2a de camundongo foi inserida em MSC de um vetor pEH1.1 (pEH1.1-H). Igualmente, uma sequência de nucleotídeo que codifica uma proteína de fusão da região variável de cadeia L de scFv e uma região constante derivada de cadeia L de IgG2a de camundongo foi inserida em MSC de um vetor pELX2.2 (pEH2.2-L). A seguir, um fragmento de polinucleotídeo do promotor EF1 α para o gene de cadeia L foi excisado de pEH2.2-L com enzimas de restrição (BglII e SalI), e ligado com pEH1.1-H tratado com enzimas de restrição (BglII e SalI) para construir um vetor para co-expressar a cadeia H e cadeia L do anticorpo.

[Expressão de IgG recombinante]

[00113] 32,6 μ g do vetor de coexpressão de cadeia H e cadeia L de anticorpo, preparado pelo método descrito anteriormente em [Construção de vetor de expressão IgG recombinante], foram diluídos com 1,6 mL de opti-MEM (fabricado por Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.) e misturados com 65 μ L de reagente de transfecção transiente (fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd.) diluídos com 1,6 mL de opti-MEM, e a mistura foi incubada em temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, a mistura foi misturada com células CHO-K1 (1×10^7 células) suspensas em 10 mL de uma solução de cultura DMEM, seguido por cultivo. Após 4 horas, um meio sem soro (meios CHO de expressão *Free Style* [fabricado por Gibco/Thermo Fisher Scientific Inc.]) foi adicionado a esta, e a mistura foi cultivada adicionalmente por 4 a 6 dias para recuperar um sobrenadante da cultura contendo um anticorpo recombinante.

[Purificação por afinidade de anticorpo]

[00114] Uma coluna vazia (fabricada por Bio-Rad Laboratories, Inc.) foi preenchida com proteína G Sepharose 4 de fluxo rápido (fabricado por GE Healthcare Japan Corp.) ou proteína L Bipo Resina (fabricado por Protein Express) em volume de leito de 1 mL. A seguir, a resina da coluna foi lavada com PBS em uma quantidade de 10 vezes o volume do leito. O sobrenadante da cultura filtrado por meio de um filtro de 0,22 micrônmetro foi adicionado à coluna, de maneira que o anticorpo fosse aprisionado na proteína G ou proteína L na coluna. A seguir, a coluna foi lavada com PBS em uma quantidade de 10 vezes o volume de leito para lavar contaminantes não especificamente adsorvidos. O anticorpo foi eluído usando uma solução de glicina-HCl 100 mM (pH 2,7), e pH do eluato foi neutralizado com Tris-HCl 1 M (pH 8,5). A absorbância em 280 nm foi medida com um medidor de absorbância *NanoDrop* (fabricado por Thermo Fisher Scientific Inc.), e a concentração do anticorpo foi calculada. Os vetores de expressão também foram designados e preparados pelo mesmo método, da maneira anterior para o anticorpo GC33 e o anticorpo GC199, usados como anticorpos competitivos.

1-2 Resultados

[Avaliação de antissoro de camundongo imunizado]

[00115] O sangue foi coletado de camundongos SKG/Jcl imunizados quatro vezes com GPC3 recombinante, e a produção de um anticorpo contra GPC3 no soro foi confirmada. Em função disso, um anticorpo com atividade de ligação contra GPC3 foi detectado por experimentos de ELIS em GPC3 recombinante e FCM em células que expressam GPC3. Dois camundongos com uma titulação particularmente elevada (números de indivíduos 1413 #2 e 1413 #3), entre os camundongos, foram usados como fontes para a preparação de uma biblioteca de anticorpo.

[Construção de biblioteca de fago]

[00116] O número de elementos em uma biblioteca de scFv estimado pelo cálculo da eficiência da transformação foi $5,8 \times 10^7$ para camundongo 1413 #2 e $4,3 \times 10^8$ para camundongo 1413 #3. A biblioteca de imunoglobulina preparada neste exemplo foi uma biblioteca preparada a partir dos camundongos considerados produtores de anticorpos, em resposta ao antígeno alvo por imunização com o antígeno GPC3. Portanto, uma característica desta biblioteca é a grande possibilidade de conter o gene alvo de anticorpo, mesmo se o tamanho da biblioteca for pequeno. Uma outra característica vantajosa desta é que a biblioteca contém um anticorpo que forma uma conformação correta *in vivo*, comparada com uma biblioteca sintética aleatória de anticorpo.

[Classificação de clone por análise de sequência de scFv monoclonal]

[00117] A análise de sequência de DNA de scFv monoclonal coletado foi conduzida para realizar a classificação de clone que exclui sobreposição. Em função disso, os clones candidatos foram identificados como 7 tipos da série D da biblioteca de camundongo 1413 #2, 5 tipos da série E desta, 3 tipos da série D da biblioteca de camundongo 1413 #3, e 9 tipos da série E desta. As sequências de nucleotídeo de regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve destes clones candidatos foram analisadas para excluir clones idênticos que se sobrepõem. Em função disso, um total de 18 tipos de clones scFv, isto é, 9 tipos de clones de scFv derivados da biblioteca de camundongo 1413 #2, e 9 tipos de clones scFv derivados da biblioteca de camundongo 1413 #3 foram identificados.

[Análise de mapeamento de epítopo clone de scFv anti-GPC3]

[00118] 18 tipos de clones de scFv, identificados de acordo com o método descrito anteriormente na seção [Classificação de clone por análise de sequência de scFv monoclonal], foram usados para analisar ligação em cada GPC3 por FCM usando 3 tipos de linhagens celulares (linhagem celular que expressa o fragmento N-terminal de GPC3, linhagem celular que expressa o

fragmento C-terminal de GPC3, e linhagem celular que expressa GPC3). Em função disso, entre os 18 tipos de clones de scFv, 14 tipos (TF1413-02d028, 02d030, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, 03e019, 03e027, e 03e034) se ligaram ao GPC3 de tamanho completo e ao fragmento N-terminal de GPC3 (polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155), mas não se ligaram ao fragmento C-terminal GPC3 (polipeptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 156) (vide Figura 2). Por outro lado, os anticorpos anti-GPC3 GC33 existentes (fabricado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) e GC199 (fabricado por Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.) se ligaram ao GPC3 de tamanho completo e ao fragmento C-terminal GPC3, mas não se ligaram ao fragmento N-terminal de GPC3.

[00119] A partir destes resultados, os 14 tipos de clones inéditos de scFv descritos anteriormente, que reconhecem um epítopo N-terminal de GPC3 diferente de um epítopo C-terminal de GPC3 para os anticorpos anti-GPC3 existentes (GC33 e GC199), foram identificados.

[00120] Entre os 14 tipos de clones de scFv assim identificados, 11 clones de scFv do topo (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, e 03e034) com intensidade de ligação particularmente alta foram selecionados. A tabela 1 mostra a correspondência de SEQ ID NOs com as regiões V de cadeia H e cadeia L destes 11 tipos de clones de scFv. A tabela 2 mostra a correspondência de SEQ ID NOs com a cadeia H de CDR1 a CDR3 destes 11 tipos de clones de scFv. A tabela 3 mostra a correspondência de SEQ ID NOs com a cadeia L de CDR1 a CDR3 destes 11 tipos de clones de scFv.

[Tabela 1]

Nome do clone de scFv e região V	SEQ ID NO
TF1413-02d028	7
TF1413-02d039	17
TF1413-02e004	27
TF1413-02e014	37

TF1413-02e030	região V de cadeia H	47
TF1413-02e040	região V de cadeia H	57
TF1413-03e001	região V de cadeia H	67
TF1413-03e004	região V de cadeia H	77
TF1413-03e005	região V de cadeia H	87
TF1413-03e015	região V de cadeia H	97
TF1413-03e034	região V de cadeia H	107
TF1413-02d028	região V de cadeia L	8
TF1413-02d039	região V de cadeia L	18
TF1413-02e004	região V de cadeia L	28
TF1413-02e014	região V de cadeia L	38
TF1413-02e030	região V de cadeia L	48
TF1413-02e040	região V de cadeia L	58
TF1413-03e001	região V de cadeia L	68
TF1413-03e004	região V de cadeia L	78
TF1413-03e005	região V de cadeia L	88
TF1413-03e015	região V de cadeia L	98
TF1413-03e034	região V de cadeia L	108

[Tabela 2]

Nome do clone e CDR	SEQ ID NO	
TF1413-02d028	CDR1 de cadeia H	1
	CDR2 de cadeia H	2
	CDR3 de cadeia H	3
TF1413-02d039	CDR1 de cadeia H	11
	CDR2 de cadeia H	12
	CDR3 de cadeia H	13
TF1413-02e004	CDR1 de cadeia H	21
	CDR2 de cadeia H	22
	CDR3 de cadeia H	23
TF1413-02e014	CDR1 de cadeia H	31
	CDR2 de cadeia H	32
	CDR3 de cadeia H	33
TF1413-02e030	CDR1 de cadeia H	41
	CDR2 de cadeia H	42
	CDR3 de cadeia H	43
TF1413-02e040	CDR1 de cadeia H	51
	CDR2 de cadeia H	52
	CDR3 de cadeia H	53
TF1413-03e001	CDR1 de cadeia H	61
	CDR2 de cadeia H	62
	CDR3 de cadeia H	63
TF1413-03e004	CDR1 de cadeia H	71
	CDR2 de cadeia H	72
	CDR3 de cadeia H	73
TF1413-03e005	CDR1 de cadeia H	81

	CDR2 de cadeia H	82
	CDR3 de cadeia H	83
TF1413-03e015	CDR1 de cadeia H	91
	CDR2 de cadeia H	92
	CDR3 de cadeia H	93
TF1413-03e034	CDR1 de cadeia H	101
	CDR2 de cadeia H	102
	CDR3 de cadeia H	103

[Tabela 3]

Nome do clone e CDR	SEQ ID NO
TF1413-02d028	4
	5
	6
TF1413-02d039	14
	15
	16
TF1413-02e004	24
	25
	26
TF1413-02e014	34
	35
	36
TF1413-02e030	44
	45
	46
TF1413-02e040	54
	55
	56
TF1413-03e001	64
	65
	66
TF1413-03e004	74
	75
	76
TF1413-03e005	84
	85
	86
TF1413-03e015	94
	95
	96
TF1413-03e034	104
	105
	106

[Conversão de anticorpo scFv anti-GPC3 para IgG e sua capacidade de se ligar]

[00121] As regiões variáveis de cadeia H e cadeia L dos 11 tipos de clones de scFv selecionados da maneira descrita anteriormente foram ligadas

às regiões constantes de IgG de camundongo, e anticorpos recombinantes de tamanho completo foram expressos usando um vetor para a expressão de IgG recombinante e purificados por afinidade. A capacidade destes anticorpos IgG se ligarem ao fragmento N-terminal de GPC3 foi analisada usando a linhagem celular que expressa o fragmento N-terminal de GPC3. Em função disso, 9 tipos de IgG clones (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e004, 03e005, e 03e034) mantiveram atividade de ligação contra o fragmento N-terminal de GPC3, ao passo que os dois tipos restantes de clones de IgG (TF1413-03e001 e 03e015) não apresentaram atividade de ligação contra o fragmento N-terminal de GPC3 (vide figura 3). Os 9 tipos de clones de IgG descritos anteriormente não se ligaram ao fragmento C-terminal GPC3 (vide figura 3).

[00122] Estes resultados indicam que, entre os 11 tipos de clones de scFv, 9 tipos (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e004, 03e005, e 03e034) são convertidos para o tipo IgG. A tabela 4 mostra a correspondência de SEQ ID NOs com as cadeias H e as cadeias L dos 11 tipos de clones de IgG.

[Tabela 4]

Nome do clone de IgG e região	SEQ ID NO
TF1413-02d028	cadeia H
TF1413-02d039	cadeia H
TF1413-02e004	cadeia H
TF1413-02e014	cadeia H
TF1413-02e030	cadeia H
TF1413-02e040	cadeia H
TF1413-03e001	cadeia H
TF1413-03e004	cadeia H
TF1413-03e005	cadeia H
TF1413-03e015	cadeia H
TF1413-03e034	cadeia H
TF1413-02d028	L cadeia
TF1413-02d039	L cadeia
TF1413-02e004	L cadeia
TF1413-02e014	L cadeia
TF1413-02e030	L cadeia
TF1413-02e040	L cadeia
TF1413-03e001	L cadeia
TF1413-03e004	L cadeia
TF1413-03e005	L cadeia

TF1413-03e015	L cadeia	100
TF1413-03e034	L cadeia	110

Exemplo 2

[00123] 2. Atividade de ligação de anticorpo anti-GPC3 inédito contra GPC3 tratado com EDTA (ácido etilenodiaminatetra-acético), tripsina ou colagenase

[Preparação de célula tratada com EDTA ou tripsina]

[00124] Uma linhagem celular SK-Hep-1 forçada a expressar GPC3 foi cultivada em dois frascos T-75. O sobrenadante da cultura de cada frasco foi aspirado, e o frasco foi lavado com 3 mL de PBS. A seguir, 3 mL de solução 0,02% de EDTA/PBS (daqui por diante, referida simplesmente como “EDTA”) ou solução 0,05% de tripsina (daqui por diante, referida simplesmente como “tripsina”) foram adicionados em cada frasco. Cada frasco foi incubado a 37 °C por 5 minutos (EDTA), ou 2 minutos e 30 segundos (tripsina), para dissociar as células do frasco. A seguir, 7 mL de uma solução de cultura DMEM foram adicionados em cada frasco. Após pipetar, a suspensão celular foi recuperada em cada tubo cônico de 50 mL. Cada frasco foi lavado adicionalmente com 10 mL de uma solução de cultura DMEM. A seguir, as lavagens recuperadas também foram recuperadas no tubo cônico de 50 mL contendo cada suspensão celular, seguido por centrifugação (1.500 rpm, 4 °C, 4 min). Após aspiração do sobrenadante a partir de cada tubo cônico, 10 mL de uma solução de cultura DMEM foram adicionados ao precipitado, e o número de células dissociadas com EDTA ou tripsina foi contado.

[00125] As células tratadas com EDTA ou tripsina foram ajustadas em 2×10^5 células/tubo e submetidas à análise FACS (EC800). A análise FACS utilizou 3 tipos de anticorpos (anticorpo IgG anti-camundongo fluorescentemente marcado com APC [5 µg/tubo; fabricado por BioLegend, Inc.], anticorpo GC33 [1,0 µg/tubo; fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. Life Science], e anticorpo de clone de scFv [TF1413-

02d028] descrito anteriormente [1,0 µg/tubo]).

[Preparação de célula tratada com colagenase]

[00126] 1×10^6 células dissociadas com EDTA, da maneira descrita anteriormente, foram plaqueadas em um tubo cônico de 50 mL e centrifugadas (1.500 rpm, 4 °C, 4 min), e o sobrenadante foi aspirado para preparar uma massa celular (precipitado). 5 mL de uma solução de colagenase P foram adicionados ao precipitado, e a mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos para preparar uma suspensão celular. A seguir, a suspensão celular passou por um filtro de células de 100 µm, lavando ao mesmo tempo com 30 mL de uma solução de cultura DMEM. A suspensão celular passou novamente por um filtro de células de 100 µm e foi centrifugada (300 g, 4 °C, 10 min), e o sobrenadante foi aspirado. O precipitado foi lavado pela adição de 20 mL de PBS e a seguir centrifugado (300 g, 4 °C, 5 min), e o sobrenadante foi aspirado. As células foram suspensas pela adição de 5 mL de uma solução de cultura DMEM. A seguir, o número de células foi contado, e 2×10^5 células/tubo foram analisadas por FACS (EC800). A análise de FACS utilizou 3 tipos de anticorpos (anticorpo IgG anti-camundongo fluorescentemente marcado com APC [5 µg/tubo; fabricado por BioLegend, Inc.], anticorpo GC33 [1,0 µg/tubo; fabricado por Medical & Biological Laboratories Co., Ltd. Life Science], e anticorpo de clone de scFv [TF1413-02d028] descrito anteriormente [1,0 µg/tubo]), como nas células tratadas com EDTA ou tripsina. Os resultados são mostrados na figura 4. Na figura 4, o pico direito na abscissa representa que o anticorpo GC33 ou o anticorpo do clone de scFv [TF1413-02d028] ligado à proteína GPC3.

[Resultados]

[00127] Da maneira mostrada na figura 4, a atividade de ligação do anticorpo da presente invenção (TF1413-02d028) contra a proteína GPC3 tratada com tripsina ou colagenase diminuiu acentuadamente. Estes resultados indicam que o anticorpo da presente invenção reconhece especificamente a

conformação da proteína GPC3, sugerindo que o anticorpo da presente invenção apresenta muita especificidade *in vivo*.

Exemplo 3

[00128] 3. Desenvolvimento de célula GPC3 CAR-T usando anticorpo anti-GPC3 inédito

[Sumário]

[00129] GPC3 é uma molécula de superfície celular, cuja expressão não é observada em tecidos humanos adultos, com a exceção da placenta, mas é observada em tecidos de vários cânceres tais como carcinoma hepatocelular, melanoma, adenocarcinoma de célula clara do ovário, e carcinoma de célula escamosa do pulmão. Assim, GPC3 é capaz de funcionar como uma molécula alvo em terapia celular com CAR-T, que explora um receptor de antígeno quimérico (CAR). Dessa maneira, células GPC3 CAR-T foram preparadas usando 11 tipos de clones de scFv preparados no exemplo 1, e foram analisadas em relação à atividade citotóxica do câncer e à capacidade de produzir interferon γ (IFN- γ).

[Preparação de vetor GPC3 CAR]

[00130] scFv com uma sequência V_H -ligador- V_L foi determinado como os 11 tipos de clones de scFv (TF1413-02d028, 02d039, 02e004, 02e014, 02e030, 02e040, 03e001, 03e004, 03e005, 03e015, e 03e034) preparados no exemplo 1, com base em suas respectivas sequências de aminoácido de V_H e V_L (vide tabela 5). O ligador usado consistiu em 15 resíduos de aminoácido com 3 repetições de um polipeptídeo “GGGGS”. Uma sequência de sinal derivada de cadeia H de imunoglobulina humana, consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 188, foi adicionada na terminação N de V_H .

[Tabela 5-1]

SEQ ID NO: 165: TF1413-02d028 -scFv derivado
QVQLKESGPELEKPGASVKISCKASGYSFTGYNMNWVKQSNKSLWIGNIDPYYGGTSYNQKF KGKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGDYRAYYFDYWGQQGTLTVS[GGGGSGGGGS] GGGS[DIQMTQSPKFMSTSVDGRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRRHTGVP DRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPITFAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 166: TF1413-02d039 - scFv derivado
EVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAGFAFSSYDMSWVRQTPERLLEWVAYISSGGGSTYYPDTVK GRETISRDNAKNTLYLQMS3LKSEDTAMYYCARRGLRRAMDYWGQQGTSVTVS[GGGGSGGGGS] GGGSDVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFLTISRVYEAEDLGVYFCQSHTVPLTFAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 167: TF1413-02e004 - scFv derivado
QVQLQQSGAELVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQK EKDRATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARGYYAMDYWGQQGTSVTVS[GGGGSGGGGS] GGSDIVLTQSPKFMSTSVDGRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRF GSGSGTDFPTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPTFGGGTKEIKR
SEQ ID NO: 168: TF1413-02e014 - scFv derivado
QVQLKQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDEYAPKF QGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAGYYDYDGYAMDYWGQQGTSVTVS[GGGGSGGGGS] GG8GGGGSDIVLTQSPKFMSTSVDGRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHTG VPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQYSSYPLTFGGGTKEIKR
SEQ ID NO: 169: TF1413-02e030 - scFv derivado
EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKF QGKASTTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCAISTMITLIDYWGQQGTLTVS[GGGGSGGGGS] GGSDIQMTQSPSSLAM8VGQKVTM5CKSSQSLNNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYVYFASRE SGVPDRFIGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQHYSTPLTFAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 170: TF1413-02e040 - scFv derivado
EVMLVESGGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWIGLINPYNGGTSYNQN FKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARGYYGRFDYWGQQGTLTVS[GGGGSGGGGS] GGGSDILLTQSPKFMSTSVDGRVSITCKASQNVRTAVAWYQQKPGQSPKALIYLASNRRHTGVPDR FTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPITFAGTKLEIKR

[Tabela 5-2]

SEQ ID NO: 171: TF1413-03e901 - scFv derivado
QVQLKQSGPELVKPGASVKISCKASGYSETGYYMHWVKQSHVKSLEWIGRINPYNGATSYNQNF KDKASITVDKSSSTAYMELH8LTSEDSAVYYCARNYGYFDYWGGQGTTLTVS <u>GGGGSGGGSGG</u> GG <u>SDIKMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCEASQNVNDNNVVWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGV</u> PDR ETGSGSGT <u>DFTLTISNVQSED</u> LAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 172: TF1413-03e904 - scFv derivado
QVQLKQSGAELVVKPGAPVKLSCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGRGLEWIGRIDPSDSETHYNQK FKDKATLTVDKSSSTAYIQLSSLTSEDSAVYYCARGYYGSNYWGQGTTLTVS <u>GGGGSGGGSGG</u> GS <u>SDIKMTQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAVWYQQKPGQSPKALIYSASYRYSGV</u> PDR TGSGSGT <u>DFTLTISNVQSED</u> LAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 173: TF1413-03e905 - scFv derivado
QVQLKESGAELVRSgasVKLSCTA8GFNIKDYMMHWVKQRPEQGLEWIGWIDPENGDTAYAPKE QGKATMTADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNAFYDYDGYAMDYWGQGTSVTVS <u>GGGGSGG</u> GG <u>GGGGGSDVYMTQTPSELASLGERVSLTCRASQEISGYLSWLQQKPDGTIKRLIYAASLDSC</u> VPKRFGSGRS <u>GDYSLTIS</u> SEDFADYYCLOQYASYPLTFGAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 174: TF1413-03e915 - scFv derivado
EV <u>QLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSETGYTMNWVKQSHGKNLEWIGL</u> INPYNGGTSYNQK FKGKATLTVDKSSSTAYMELL <u>SLTSEDSAVYYCARGDYYPPYAMDYWGQGTSVTVS</u> <u>GGGGSGG</u> GS <u>GGGGSDIVMSQSPKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTNVAVWYQQKPGQSPKPLIYSASYRYSG</u> VPDRFTGSGSGT <u>DFTLTISNVQSED</u> LAEYFCQQYNSYPLTFGAGTKLEIKR
SEQ ID NO: 175: TF1413-03e934 - scFv derivado
EV <u>QLQQSGPELEVKPGASVKISCKASGYSETGYNMNWVKQNGKSLEWIGNIDPYYGGTSYNQKF</u> KGKATLTVDKSSSTAYMQL <u>SLTSEDSAVYYCARGNYGYAMDYWGQGTSVTVS</u> <u>GGGGSGGG</u> SG <u>GGGGSDIVMSQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQNVRTAVAVWYQQKPGQSPKALIYLA</u> SNRHTGV PDRFTGSGSGT <u>DFTLTISNVQSED</u> LA <u>DYFCLQHWN</u> YPLTFGAGTKLEIKR

[00131] Nas tabelas, o ligador está em caixa em uma linha dupla, V_H está sublinhado com uma única linha, e V_L é sublinhado com uma linha dupla.

[00132] Uma sequência de nucleotídeo que codifica cada anti-GPC3 scFv da tabela 5 foi sintetizada por otimização para códons humanos e foi inserida em um vetor de expressão CAR. O gene CAR usado apresentou um gene que codifica um peptídeo de fusão (peptídeo que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 185), consistindo em uma região transmembrana derivada de CD8 de humano e uma região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente derivada de CD8/4-1BB/CD3 zeta de humano, uma sequência de auto-clivagem 2A, gene IL-7 de humano, uma sequência de auto-clivagem 2A, gene CCL19 de humano, uma sequência de auto-clivagem 2A, e gene HSV-TK, a jusante do

gene scFv, e todos foram incorporados em um vetor de retrovírus MSGV1 (vide publicação internacional WO 2016/056228).

[Preparação de célula GPC3 CAR-T]

[Preparação de célula GPC3 CAR-T]

[00133] Os vetores GPC3 CAR derivados dos 11 tipos de clones de scFv descritos anteriormente foram cada qual introduzidos transientemente nas células de acondicionamento GP2 para preparar os vetores de retrovírus. As células T foram infectadas com estes vetores para a transferência de gene para induzir células GPC3 CAR-T. A razão de células que expressam GPC3 CAR para as células T transferidas por gene variou de 5,3 a 39,2%. Dessa maneira, o seguinte ensaio de função foi realizado usando células GPC3 CAR-T derivadas de 5 tipos de clones de scFv (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030, e TF1413-03e005) que exibiram 25% ou mais da razão.

[Atividade prejudicial de célula GPC3 CAR-T contra linhagem celular que expressa GPC3]

[00134] A fim de estudar a atividade prejudicial das células GPC3 CAR-T contra células de câncer, ensaio de co-cultura foi realizado usando as células GPC3 CAR-T e uma linhagem celular que expressa GPC3, isto é, uma linhagem celular Sk-HEP-1 derivada de carcinoma hepatocelular, resultada para expressar GPC3 (linhagem celular Sk-HEP-1 GPC3), ou uma linhagem celular que não expressa GPC3 (linhagem celular Sk-HEP-1 simulada). As células GPC3 CAR-T foram misturadas com as células alvo de câncer (linhagem celular Sk-HEP-1 GPC3 ou linhagem celular Sk-HEP-1 simulada) em uma razão de 1:1 (1×10^5 células/poço) e cultivadas em uma placa de 24 poços. Após 48 horas, as células foram recuperadas, coradas com um anticorpo anti-CD45, e analisadas por FCM com células positivas para CD45 como células GPC3 CAR-T e células negativas para CD45 como células de câncer residuais [células Sk-HEP-1 GPC3]. Em função disso, todas as células

GPC3 CAR-T derivadas dos 5 tipos de clones de scFv descritos anteriormente prejudicaram quase completamente as células Sk-HEP-1 GPC3, mas não exibiram atividade prejudicial contra as células Sk-HEP-1 simuladas (vide figuras 5 e 6). No caso de usar células não infectadas com o vetor viral (células não transferidas por gene [“Sem infecção” nas figuras 5 e 6]) como um controle negativo para as células GPC3 CAR-T, estas células não exibiram atividade prejudicial nem contra as células Sk-HEP-1 GPC3 nem contra as células Sk-HEP-1 simuladas.

[00135] A partir destes resultados, as células GPC3CAR-T derivadas dos 5 tipos selecionados de clones de scFv anti-GPC3 (TF1413-02d028, TF1413-02d039, TF1413-02e014, TF1413-02e030, e TF1413-03e005) mostraram exercer especificamente atividade citotóxica contra células de câncer que expressam GPC3.

[Capacidade de célula GPC3 CAR-T produzir IFN- γ pelo reconhecimento de célula que expressa GPC3]

[00136] Além da atividade prejudicial contra células de câncer que expressam GPC3 (positivas), a capacidade das células GPC3 CAR-T produzirem IFN- γ foi analisada. As células GPC3 CAR-T foram misturadas com as células de câncer alvo (linhagem celular Sk-HEP-1 GPC3 ou linhagem celular Sk-HEP-1 simulada) em uma razão de 1:1 (1×10^5 células/poço) e cultivadas por 48 horas em uma placa de 24 poços, e a concentração de IFN- γ produzido no sobrenadante da cultura foi avaliada por ELISA. Em função disso, todas as células GPC3 CAR-T, derivadas dos 5 tipos de clones de scFv descritos anteriormente, exibiram a capacidade de produzir IFN- γ de uma maneira dependente da expressão de GPC3. Particularmente, as células GPC3 CAR-T derivadas de clone TF1413-02d028 exibiram a melhor capacidade de produzir IFN- γ (vide figura 7).

Exemplo 4

[00137] 4. Preparação de anticorpo humanizado

[00138] Anticorpos humanizados scFv foram projetados com base em dois tipos de clones de scFv (TF1413-02d028 e 02d039), preparados no exemplo 1 (vide tabela 6). O ligador usado consistiu em 15 resíduos de aminoácido com 3 repetições de um polipeptídeo “GGGGS”. Uma sequência de sinal derivada de cadeia H de imunoglobulina humana, consistindo na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 188, foi adicionada na terminação N de V_H.

[Tabela 6-1]

SEQ ID NO: 178: #5 VH1-15-VL1 (Anticorpo humanizado 1 scFv derivado de TF1413-02d028)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSETGYNMNWVRQAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK FKGRATLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWQGQTTTVVSSGGGGGG GSGGGGSDIQMTQSP48LSASVGDRTTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALIYLASNRIITGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPPLTEGGGTKEIK
SEQ ID NO: 179: #5 VH2-15-VL1 (Anticorpo humanizado 2 scFv derivado de TF1413-02d028)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSETGYNMNWVRQAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK FKGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWQGQTTTVVSSGGGGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALIYLASNRIITGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPPLTEGGGTKEIK
SEQ ID NO: 180: #5 VH3-15-VL1 (Anticorpo humanizado 3 scFv derivado de TF1413-02d028)
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYNMNWVRQAPGQGLEWIGNIDPYYGGTSYNQK FKGRVTLTVDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGDYRAYYFDYWQGQTTTVVSSGGGGGG GSGGGGSDIQMTQSPSSLASVGDRTTITCKASQNVRTAVAWYQQKPGKAPKALIYLASNRIITGV PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQHWNYPPLTEGGGTKEIK
SEQ ID NO: 181: #6 VH1-15-VL1 (Anticorpo humanizado 1 scFv derivado de TF1413-02d039)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVAYISSGGSTYYPTV GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGGG GGGGSDIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPITFGGTKEIK
SEQ ID NO: 182: #6 VH1-15-VL2 (Anticorpo humanizado 2 scFv derivado de TF1413-02d039)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVAYISSGGSTYYPTV GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGGG GGGGSDIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPITFGGTKEIK
SEQ ID NO: 183: #6 VH2-15-VL1 (Anticorpo humanizado 3 scFv derivado de TF1413-02d039)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKCLEWVAYISSGGSTYYPTV GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGLRRAMDYWGQGTMVTVSSGGGGGG GGGGSDIVMTQSPSLPVTGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRF SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPITFGGTKEIK

[Tabela 6-2]

SEQ ID NO: 184: #6 VH2-15-VL2	(Anticorpo humanizado 4 scFv derivado de TF1413-02d039)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFAFSSYDMSWVRQAPGKRLEWVAYISSGGSTYYPDTVK	
GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGLRRAMDYWGQGT TVSS <u>GGGGG</u> GGGS	
GGGGSDIVMTQSPLSLPVT PGEPASIS CRSSQSLYHSSGNTYLHWYLQKPGQSPQLIYKVSNRF	
SGVPDRESGSGSGTDETLKISRVEAEDVGVYYCSQ8THVPLTEGGGT KV EIK	

[00139] Nas tabelas, o ligador está em caixa em uma linha dupla, V_H está sublinhado com uma linha simples, e V_L está sublinhado com uma linha dupla.

Aplicabilidade Industrial

[00140] A presente invenção contribui no campo da imunoterapia para o câncer.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo que se liga especificamente a um polipeptídeo derivado de GPC3 (glipicano-3) humano que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 155, caracterizado pelo fato de que o anticorpo:

(1-1) comprehende uma região determinante de complementaridade de cadeia pesada (CDR) 1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 1, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 2, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 3, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 4, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 5, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 6; ou

(2-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 11, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 12, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 13, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 14, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 15, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 16; ou

(3-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 21, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ

ID NO: 22, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 23, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 24, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 25, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 26; ou

(4-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 31, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 32, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 33, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 34, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 35, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 36; ou

(5-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 41, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 42, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 43, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 44, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 45, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 46; ou

(6-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 51, uma cadeia

pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 52, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 53, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 54, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 55, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 56; ou

(7-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 61, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 62, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 63, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 64, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 65, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 66; ou

(8-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 71, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 72, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 73, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 74, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 75, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 76; ou

(9-1) comprehende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na

sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 81, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 82, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 83, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 84, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 85, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 86; ou

(10-1) compreende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 91, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 92, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 93, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 94, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 95, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 96; ou

(11-1) compreende uma cadeia pesada CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 101, uma cadeia pesada CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 102, e uma cadeia pesada CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 103, e

uma cadeia leve CDR1 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 104, uma cadeia leve CDR2 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 105, e uma cadeia leve CDR3 que consiste na sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 106.

2. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo:

(1-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 7, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 8; ou

(2-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 17, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 18; ou

(3-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 27, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 28; ou

(4-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 37, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 38;

ou

(5-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 47, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 48; ou

(6-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 57, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 58; ou

(7-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 67, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 68; ou

(8-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 77, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 78; ou

(9-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 87, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 88; ou

(10-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 97, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 98; ou

(11-2) comprehende uma região variável de cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 107, e uma região variável de cadeia leve que consiste em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 108.

3. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo de cadeia única.

4. Anticorpo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo de cadeia única:

(1-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 165; ou

(2-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de

aminoácido representada por SEQ ID NO: 166; ou

(3-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 167; ou

(4-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 168; ou

(5-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 169; ou

(6-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 170; ou

(7-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 171; ou

(8-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 172; ou

(9-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 173; ou

(10-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 174; ou

(11-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 175.

5. Anticorpo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado

pelo fato de que o anticorpo de cadeia única:

(1-3'-1) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 178; ou

(1-3'-2) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 179; ou

(1-3'-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 180; ou

(2-3'-1) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 181; ou

(2-3'-2) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 182; ou

(2-3'-3) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 183; ou

(2-3'-4) comprehende uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 184.

6. Anticorpo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que o anticorpo:

(1-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 9, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de

aminoácido representada por SEQ ID NO: 10; ou

(2-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 19, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 20; ou

(3-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 29, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 30; ou

(4-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 39, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 40; ou

(5-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 49, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 50; ou

(6-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 59, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo

menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 60; ou

(7-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 69, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 70; ou

(8-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 79, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 80; ou

(9-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 89, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 90; ou

(10-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 99, e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 100; ou

(11-4) comprehende uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 109,

e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácido com pelo menos 80% ou mais de identidade de sequência com a sequência de aminoácido representada por SEQ ID NO: 110.

7. Receptor de antígeno quimérico (CAR), caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 3 a 5, uma região transmembrana fundida com uma terminação carboxila do anticorpo, e uma região de transdução de sinal de ativação de célula imunocompetente fundida com uma terminação carboxila da região transmembrana.

8. CAR de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que compreende a sequência de aminoácido representada por qualquer de SEQ ID NOs: 185 a 187.

9. Célula imunocompetente, caracterizada pelo fato de que expressa o CAR como definido na reivindicação 7 ou 8.

10. Célula imunocompetente de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que expressa adicionalmente interleucina 7 (IL-7) e ligante de quimiocina 19 (CCL19).

11. Gene de anticorpo, caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou um gene CAR que codifica o CAR como definido na reivindicação 7 ou 8.

12. Gene de anticorpo, caracterizado pelo fato de que codifica um anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e 6.

13. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende um promotor, e o gene de anticorpo como definido na reivindicação 11 ou o gene CAR que codifica o CAR como definido na reivindicação 11 operavelmente ligado a jusante do promotor.

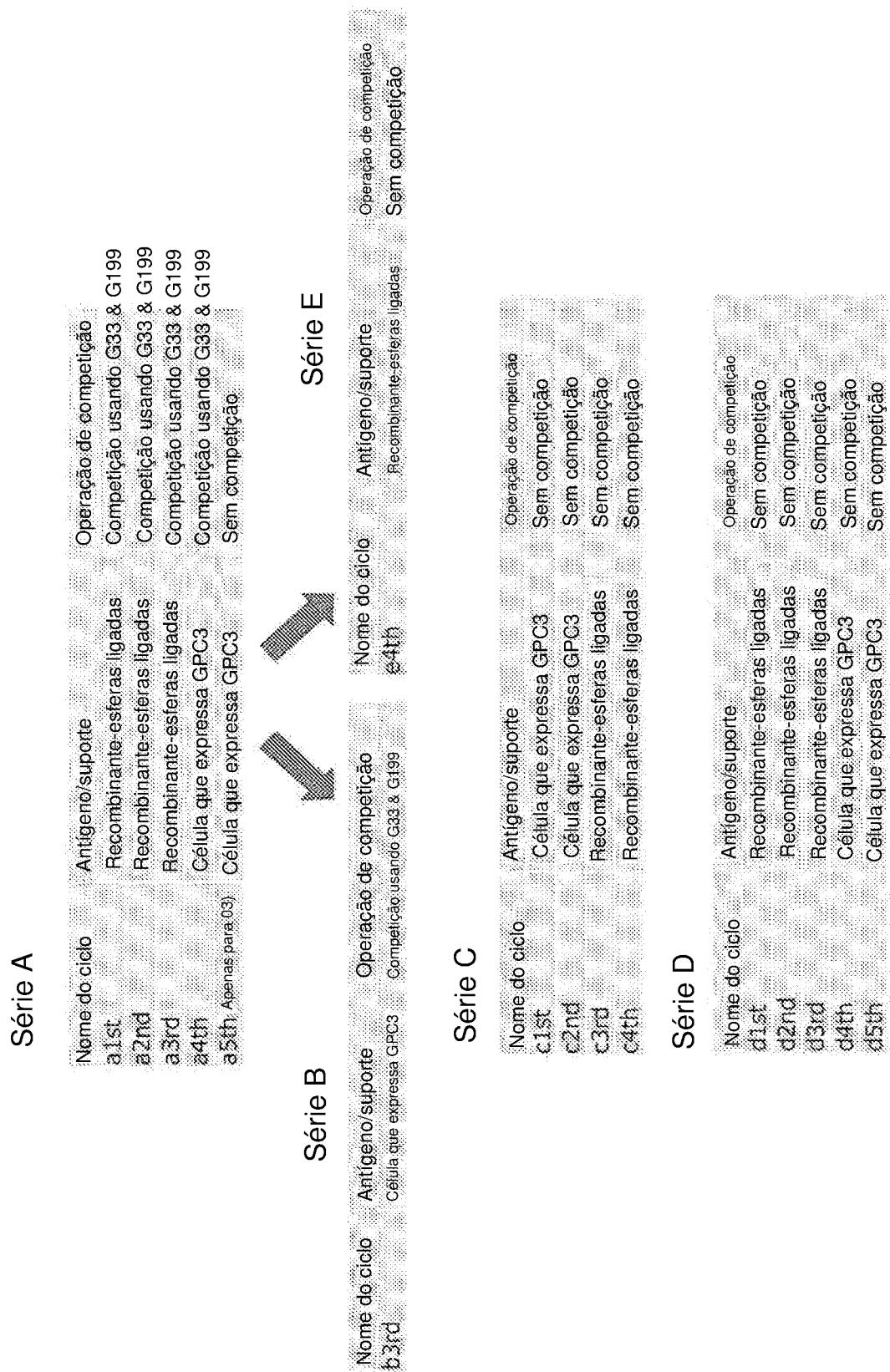
14. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende um promotor, e o gene de anticorpo como definido na reivindicação 12 operavelmente ligado a jusante do promotor.

15. Célula hospedeira, caracterizado pelo fato de que o vetor como definido na reivindicação 13 ou 14 foi introduzido.

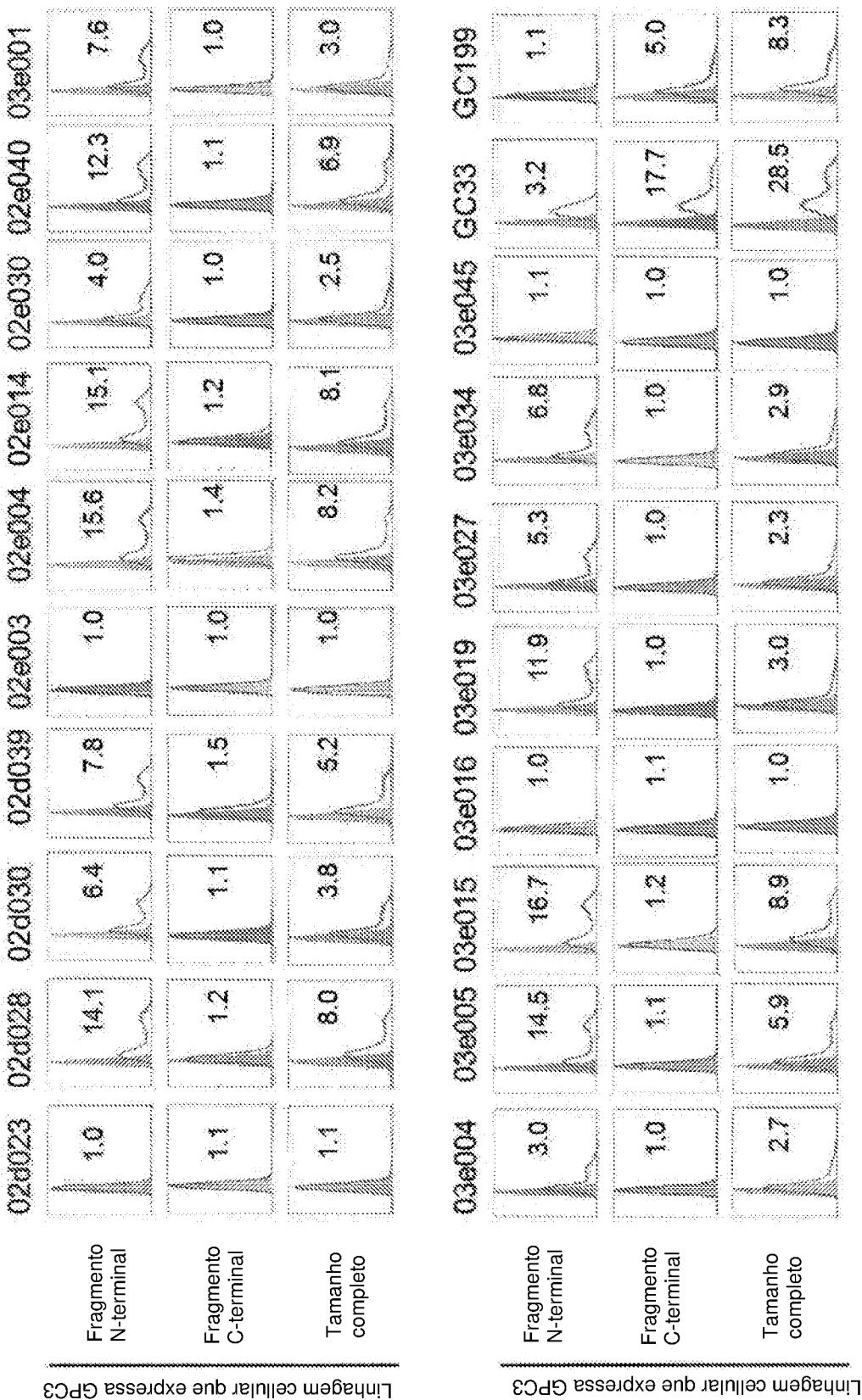
16. Método para detectar GPC3 (glipicano-3), caracterizado pelo fato de que compreende a etapa de detectar GPC3 usando o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6.

17. Kit para a detecção de GPC3 (glipicano-3), caracterizado pelo fato de que compreende o anticorpo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou uma forma marcada deste.

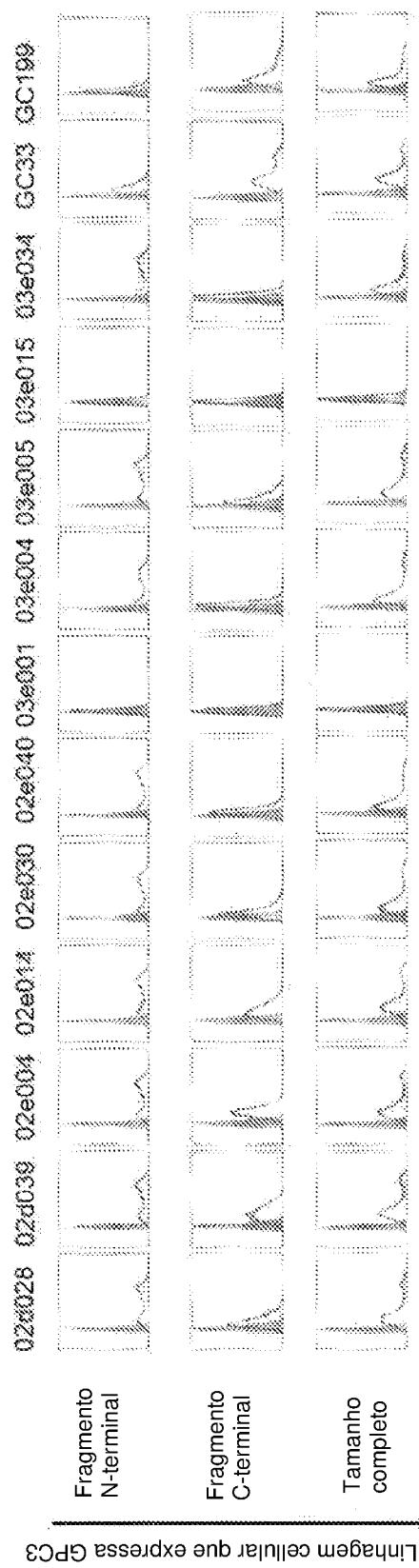
[Fig. 11]



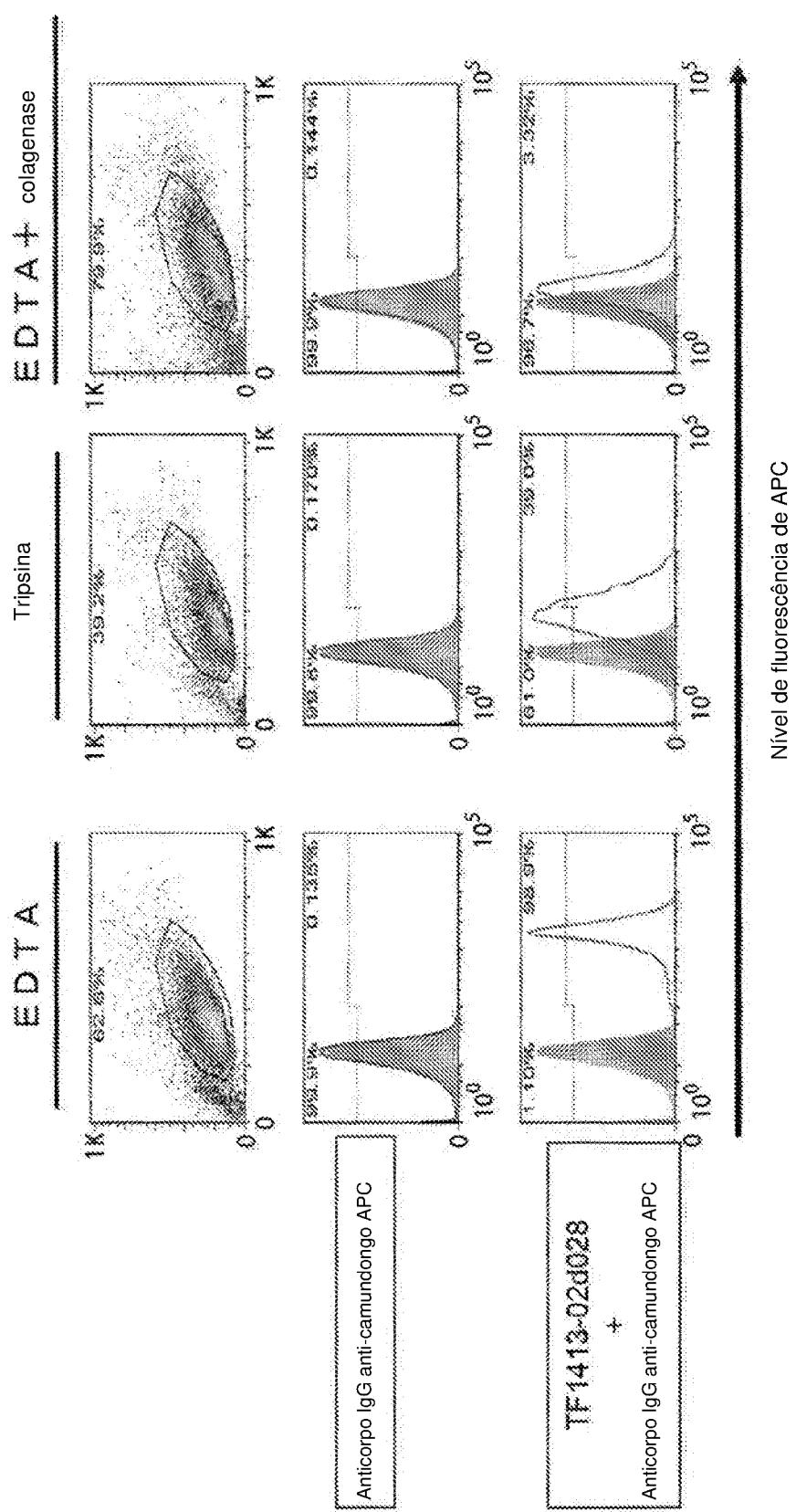
[Fig. 2]



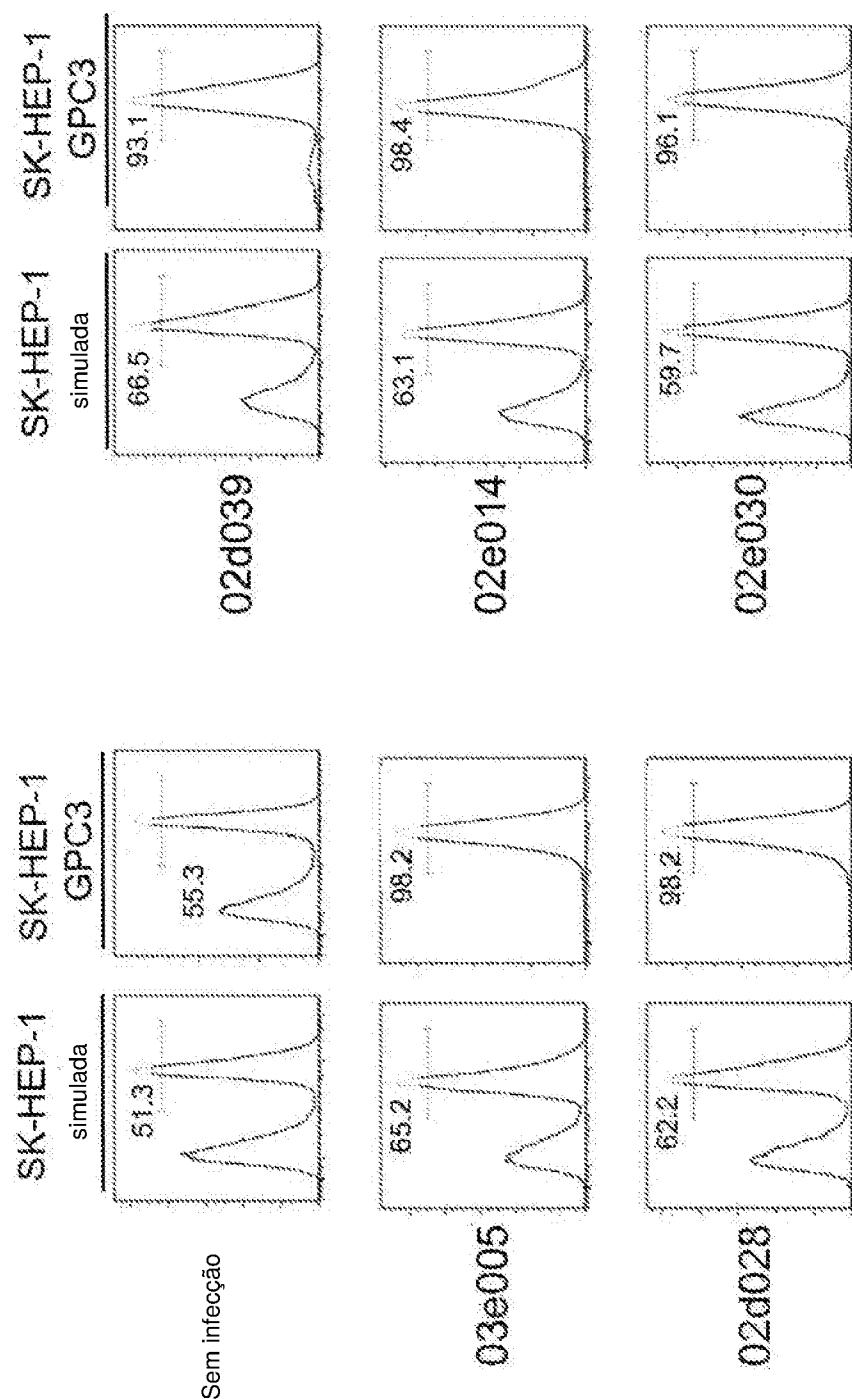
[Fig. 3]



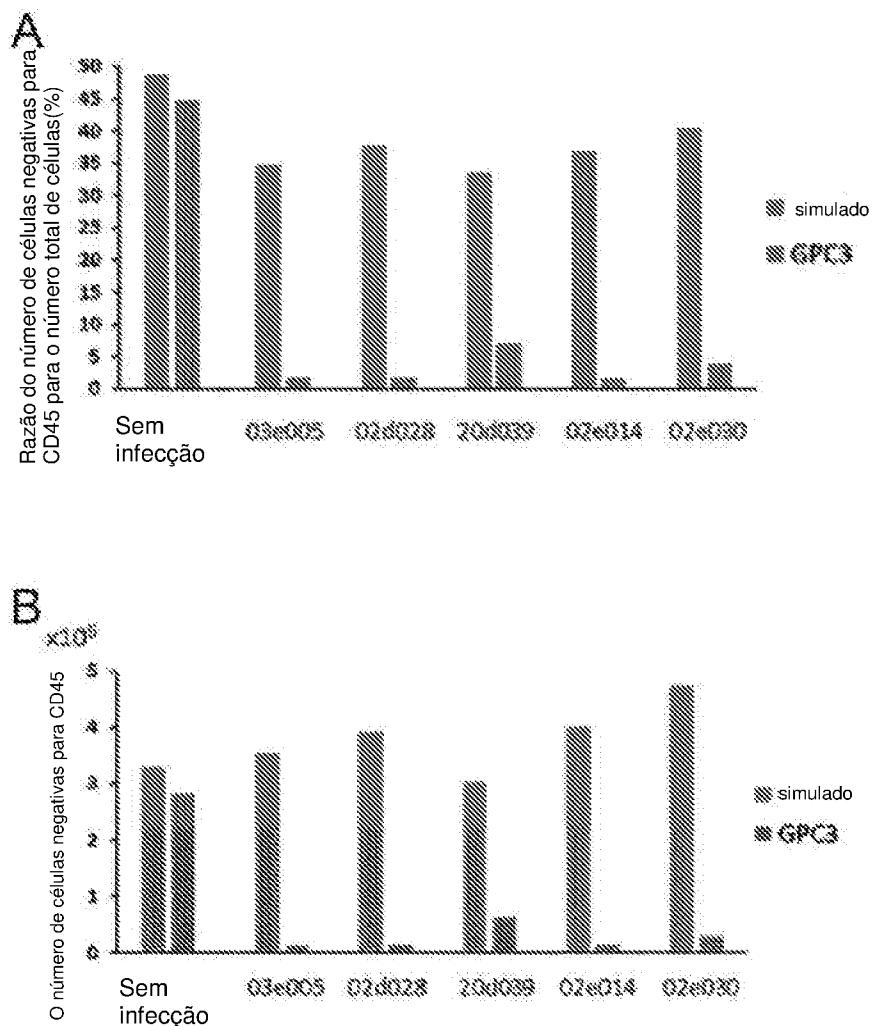
[Fig. 4]



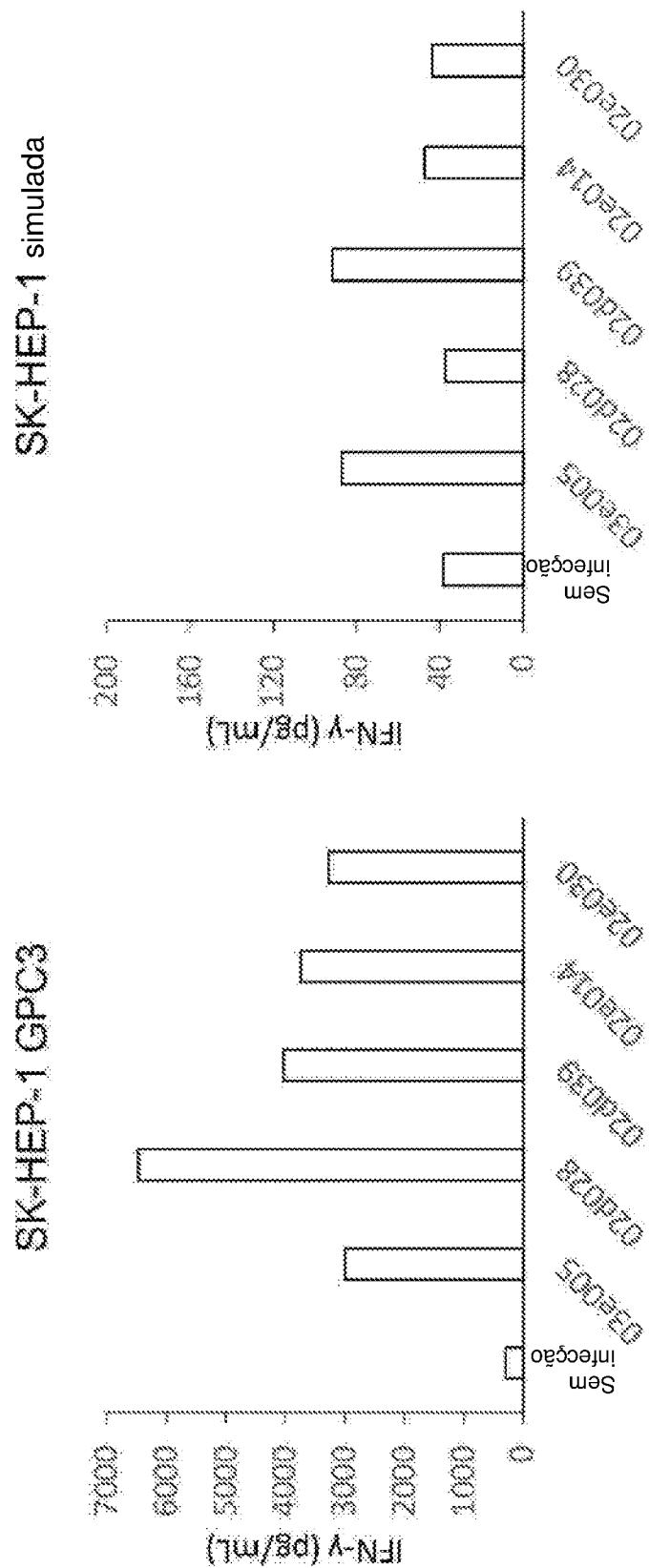
[Fig. 5]



[Fig. 6]



[Fig. 7]



RESUMO

ANTICORPO, RECEPTOR DE ANTÍGENO QUIMÉRICO, CÉLULA IMUNOCOMPETENTE, GENE DE ANTICORPO, VETOR, CÉLULA HOSPEDEIRA, MÉTODO PARA DETECTAR GPC3, E, KIT PARA A DETECÇÃO DE GPC3

A presente invenção aborda o problema de prover: um anticorpo anti-GPC3 que reconhece um epítopo diferente daquele para anticorpos existentes (por exemplo, GC33 e GC199) e que pode se ligar especificamente ao GPC3 localizado na membrana celular, mesmo como um anticorpo de cadeia simples; um CAR incluindo o dito anticorpo anti-GPC3 de cadeia única; uma célula imunocompetente que expressa o dito CAR; um gene de anticorpo anti-GPC3 ou gene CAR; um vetor que inclui o dito gene de anticorpo anti-GPC3 ou gene CAR; uma célula hospedeira na qual o dito vetor foi introduzido; um método para detectar especificamente GPC3; e um kit para detectar especificamente GPC3. Este anticorpo inclui as CDRs 1-3 de cadeia pesada específicas e as CDRs 1-3 de cadeia leve específicas 3 definidas na reivindicação 1, e se liga especificamente ao polipeptídeo GPC3 derivado de humano. Este anticorpo se liga especificamente ao GPC3 localizado na membrana celular. Uma célula imunocompetente para CAR, preparada a partir de CAR, que inclui o dito anticorpo de cadeia única é usada na imunoterapia para câncer.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: P138744listseq.txt
- Data de Geração do Código: 04/07/2019
- Hora de Geração do Código: 19:10:23
- Código de Controle:
 - Campo 1: A64D0AA26348CAFEB
 - Campo 2: 3532536F663EB206