



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

(21) **PI0708409-9 A2**

(22) Data de Depósito: 28/02/2007
(43) Data da Publicação: 31/05/2011
(RPI 2108)



(51) *Int.Cl.:*
G01N 33/574 2006.01
C07K 16/30 2006.01

(54) Título: **MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICOS DE CÂNCER PANCREÁTICO USANDO PROTEÍNA REG4**

(30) Prioridade Unionista: 02/03/2006 US 60/779,161

(73) Titular(es): Oncotherapy Science, INC.

(72) Inventor(es): Hidewaki Nakagawa, Shuichi Nakatsuru, Yusuke Nakamura

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT JP2007054375 de 28/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/102526 de 13/09/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER PANCREÁTICO USANDO PROTEÍNA REG4. A presente invenção refere-se a REG4, um novo membro da família REG que foi identificada como um biomarcador de adenocarcinoma pancreático. A presente invenção provê sanduíche ELISA para detectar REG4 de soro em pacientes com cânceres pancreáticos excisáveis, isto é, PDACs. A presente invenção também provê um processo para diagnóstico de câncer pancreático usando REG4 como um marcador sorológico. Este pedido de patente reivindica o benefício de pedido de patente provisório U.S. 60/779 161 depositado em 2 de março de 2006, os conteúdos do qual são aqui incorporados por referência em sua totalidade.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER PANCREÁTICO USANDO PROTEÍNA REG4".

Campo da Invenção

5 A presente invenção refere-se ao campo de ciência biológica, mais especificamente ao campo de diagnóstico de câncer. Em particular, a presente invenção refere-se a métodos para diagnóstico de câncer pancreático usando proteína REG4 como um marcador sorológico, e reagentes e kits usados para o diagnóstico.

10 Antecedentes da Invenção

Adenocarcinoma ductal pancreático (PDAC) é a quinta causa líder de morte de câncer no mundo ocidental e mostra a pior mortalidade entre malignidades, com uma taxa de sobrevivência de 5 anos de somente 4% (DiMagno EP, et al., (1999) Gastroenterology; 117(6):1464-84, Zervos EE, et al. (2004) Cancer Control; 11(1):23-31). Aproximadamente 30.700 pacientes são diagnosticados com câncer pancreático nos Estados Unidos, e aproximadamente 30.000 deles morrerão da doença (Jemal A., et al. (2003) CA Cancer J Clin.; 53(1): 5-26). Uma vez que a maioria de pacientes de PDAC são diagnosticados em um estágio avançado, nenhuma terapia efetiva é disponível no presente; somente excisão cirúrgica oferece uma pequena possibilidade de cura, mas 80-90% de pacientes de PDAC que sofrem cirurgia recaem e morrem da doença (DiMagno EP, et al., (1999) Gastroenterology; 117(6):1464-84, Zervos EE, et al., (2004) Cancer Control; 11(1):23-31). Algumas abordagens em cirurgia e quimioterapia, incluindo 5-FU ou gemcitabina, com ou sem radiação, podem aperfeiçoar a qualidade de vida do paciente (DiMagno EP, et al., (1999) Gastroenterology; 117(6):1464-84, Zervos EE, et al., (2004) Cancer Control; 11(1):23-31), mas aqueles tratamentos têm um efeito muito limitado sobre sobrevivência de longo termo de pacientes de PDAC devido a sua natureza quimiorresistente e extremamente agressiva. Portanto, o gerenciamento de maior parte de pacientes com PDAC avançado é focado em medidas paliativas (DiMagno EP, et al., (1999), Gastroenterology; 117(6):1464-84, Zervos EE, et al. (2004) Cancer

Control; 11(1):23-31).

Este horrível prognóstico de PDAC surge a partir de várias causas, incluindo a dificuldade de detecção de PDACs de estágios iniciais (Zervos EE, et al., (2004) Cancer Control; 11(1):23-31). À despeito de aperfeiçoamentos em formação de imagem diagnóstica tal como ultra-sonografia endoscópica (EUS) ou colangiopancreatografia de ressonância magnética (MRCP), maior parte de pacientes não desenvolvem sintomas até tarde em sua doença e, por isso, não sofrem procedimentos de formação de imagem até seus sintomas serem manifestados. Um teste sorológico fácil e acurado, tal como antígeno específico de próstata (PSA) em câncer de próstata, pode facilitar detecção de PDACs de estágios iniciais sem sintoma manifestado e seleção através de um tal teste pode ser aplicada a uma população de grande número para detecção de PDACs de estágios iniciais. A excisão cirúrgica de câncer pancreático de estágio inicial pode prover o prognóstico relativamente favorável de 50-60% de sobrevivência de cinco anos, enquanto a taxa de sobrevivência de cânceres pancreáticos avançados é somente uns poucos % (Zervos EE, et al., (2004) Cancer Control; 11(1):23-31). Considerando a agressividade biológica e resistência a quimioterapia de PDACs, uma das estratégias mais realísticas para aperfeiçoar o prognóstico de PDACs fatais é selecionar a população de alto risco através de teste sorológico não-invasivo e detecção de PDACs de estágios iniciais nos quais excisão cirúrgica pode curar. Atualmente CA19-9 é o único marcador sorológico comercialmente disponível para PDACs, entretanto, aproximadamente 10-15% de indivíduos não secretam CA19-9 devido seu status de antígeno Lewis, e nível de CA19-9 está usualmente dentro faixa normal enquanto câncer pancreático está em estágio inicial e assintomático e o mesmo tem pobre valor discriminador (Sawabu N, et al., (2004) Pâncreas; 28(3):263-7, Pleskow DK, et al. (1989) Ann Intern Med; 110(9):704-9). Portanto identificação de um novo marcador de tumor para PDACs e estabelecimento de uma estratégia de seleção para detectar cânceres pancreáticos em estágios iniciais através do uso de um tal marcador sorológico como PSA em câncer de próstata são urgentemente requeridos.

Sumário da Invenção

A presente invenção é baseada na verificação de que o gene REG4 é especificamente superexpresso em câncer pancreático.

Entre dúzias de genes que foram identificados como regulados ascendentemente em células de PDAC durante as análises de microarranjo de cDNA amplas de genoma dos presentes inventores (Nakamura T, et al., (2004) Oncogene; 23(13):2385-400, WO2004/031412), os presentes inventores focalizaram sobre REG4 (GenBank Accession N^o. AY126670; a sequência de nucleotídeos de SEQ ID N^o: 13 codificando a sequência de aminoácidos de SEQ ID N^o: 14) para este estudo. Os dados de micro – arranjo dos presentes inventores sobre 20 populações de células de PDAC microdissecadas mostraram um alto nível de regulação ascendente de REG4 em 10 dos casos informativos examinados (Nakamura T., et al., (2004) Oncogene; 23(13):2385-400), e esta vez sua superexpressão também foi confirmada por RT-PCR em seis das doze populações de célula de PDAC microdissecadas examinadas (Figura 1A), o que foi usado para as prévias análises de microarranjo. Embora, nos estudos anteriores, REG4 também fosse referida como REGIV (GenBank Accession Number AA316525), REG4 e REGIV são a mesma molécula.

Embora os presentes inventores tenham identificado o gene REG4 como regulado ascendentemente em tecidos de câncer pancreático, a verificação de elevados níveis de REG4 no sangue de pacientes de PDAC que podem ser esperados terem câncer em estágio inicial ou bom prognóstico é nova para a presente invenção. Além disso, os elevados níveis de REG4 no sangue de pacientes de câncer pancreático sugere que este gene e sua proteína podem ser úteis como novos marcadores diagnósticos (isto é, sangue integral, soro, ou plasma). Além disso, os presentes inventores estabeleceram sanduíche ELISA para detectar REG4 em soro em pacientes com PDACs excisáveis.

Da mesma maneira, a presente invenção provê métodos para diagnóstico de câncer pancreático em um sujeito compreendendo as etapas de determinação de nível de REG4 em amostras de sangue derivadas de

sujeito e comparando este nível àquele encontrado em uma amostra de referência, tipicamente um controle normal. Um alto nível de REG4 em uma amostra indica que o sujeito sofre de ou está em risco de desenvolver câncer pancreático. O termo "nível de controle normal" indica um nível associado com um indivíduo saudável, normal ou uma população de indivíduos conhecidos não estarem sofrendo de câncer pancreático.

O nível de REG4 pode ser determinado através de detecção de proteína REG4 usando imunoensaio tal como ELISA.

Amostras de sangue derivadas de sujeito podem ser derivadas de sangue integral, soro, e derivadas de plasma de sujeitos, por exemplo, pacientes conhecidos ou suspeitos de terem câncer pancreático.

Em adição, a presente invenção provê os métodos descritos acima ainda compreendendo as etapas de determinação de nível de CA19-9 em uma amostra de sangue derivada de sujeito e comparação de nível de CA19-9 àquele encontrado em uma amostra de referência, tipicamente um controle normal. Os presentes inventores verificaram que pacientes com câncer pancreático podem ser identificados mais sensivelmente através de consideração de ambos os níveis de REG4 e CA19-9.

Além disso, a presente invenção também provê reagentes de imunoensaio para detecção de REG4 compreendendo anticorpo anti-REG4. O anticorpo anti-REG4 pode compreender anticorpo policlonal e anticorpo monoclonal ou pelo menos dois anticorpos monoclonais reconhecendo diferentes determinantes antigênicos de REG4.

Finalmente, a presente invenção também provê kits para detecção de um câncer pancreático compreendendo (i) um reagente de imunoensaio para determinação de nível de REG4 em uma amostra de sangue; e (ii) uma amostra controle positivo para REG4. Os kits ainda podem compreender (iii) um reagente de imunoensaio para determinação de um nível de CA19-9 em uma amostra de sangue; e (iv) uma amostra controle positivo para CA19-9.

Outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada e a partir das reivindicações. É para

ser entendido que ambos, o resumo anterior da presente invenção e as seguintes descrições detalhadas são de uma modalidade preferida, e não restritivos da invenção ou outras modalidades alternativas da presente invenção.

5 Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 mostra: (A) RT-PCR para a expressão de mRNA de REG4 e ACTB nas células de PDAC microdissecadas (1-12) comparando com células epiteliais ductais pancreáticas normais (N) que também foram microdissecadas; e (B) em estudo imunoistoquímico usando anticorpo anti-REG4, manchamento intenso em algumas células PDAC (painel superior, aumento original x200). Manchamento positivo de REG4 foi observado no citoplasma. Em tecido pancreático normal, células acinares mostraram manchamento fraco (painel inferior, aumento original x200), mas não em células de epitélio ductal normal e células de ilhotas.

15 A Figura 2 mostra a curva-padrão do sanduíche ELISA para determinação do nível de REG4.

A Figura 3 mostra a distribuição dos níveis de REG4 em 123 pessoas saudáveis. Concentrações de REG4 em soro foram determinadas através de processo ELISA.

20 A Figura 4 mostra nível de REG4 em soro na pré-operação e pós-operação de sete pacientes com PDACs excisáveis. Barra aberta, pré-operação; e barra fechada, pós-operação. Faixa normal de REG4 em soro foi putativamente definida abaixo de 9,0 ng/mL (linha pontilhada).

A Figura 5 mostra uma curva-padrão do sanduíche ELISA modificado para determinação do nível de REG4.

25 A Figura 6 mostra: (A) a lista de resultado diagnóstico usando REG4 ou CA19-9 como marcador; e (B) o diagrama Venn de sobreposição entre população positiva-REG4 e população positiva-CA19-9. "+" indica resultado positivo; e "-" indica resultado negativo. Existiram 59 amostras de câncer pancreático, 29 amostras positivas – REG4 e 45 amostras positivas – CA19-9. Entre elas, 22 amostras foram positivas para ambas as REG4 e CA19-9 e 7 amostras foram negativas para ambas as REG4 e CA19-9.

A Figura 7 mostra uma curva-padrão do sanduíche ELISA usando cada anticorpo monoclonal anti-REG4 (clone 21-1, 24-1, 34-1) para determinação do nível de REG4.

A Figura 8 mostra a detecção de proteína REG4 em soro de 9
5 pacientes de câncer pancreático e 28 pessoas saudáveis.

Descrição Detalhada da Invenção

Os termos "um", "uma", e "o" como aqui usados significam "pelo menos um" à menos que de outro modo especificamente indicado.

Na presente invenção, REG4, um novo membro de família REG
10 (regenerante derivada de ilhota) (Hartupee JC, et al., (2001) *Biochim Biophys Acta*; 1518(3):287-93) foi identificado como um biomarcador de adenocarcinoma pancreático. Os presentes inventores reportaram microarranjos de cDNA de amplitude de genoma de células de câncer pancreático microdissectada (Nakamura T, et al., (2004) *Oncogene*; 23(13):2385-400). Embora,
15 neste relatório, REG4 tenha sido verificada superexpressa em células de câncer pancreático, isto não provê evidência de como o nível de REG4 no sangue relaciona-se a câncer pancreático. A Família REG são moléculas secretadas associadas com regeneração de tecido e inflamação em órgãos digestivos (Hartupee JC, et al., (2001) *Biochim Biophys Acta*; 1518(3):287-
20 93, Watanabe T, et al., (1990) *J Biol Chem*; 265(13):7432-9, Unno M, et al., (1992) *Adv Exp. Med Biol*; 321:61-6; discussão 67-9) e família REG é regulada ascendentemente em vários cânceres gastrointestinais (Unno M, et al., (1992) *Adv. Exp. Med Biol*; 321:61-6; discussão 67-9, Lasserre C, et al., (1992) *Cancer Res.*; 52(18):5089-95, Kamarainen M, et al., (2003) *Am J Pathol.*; 163(1):11-20) e pode funcionar como um fator trófico ou antiapoptótico em cânceres (Lasserre C, et al., (1992) *cancer Res.*; 52(18):5089-95), mas suas funções patofisiológicas, especialmente o padrão de função e expressão de um novo membro, REG4, ainda não são claras. Os presentes inventores geraram anticorpos específicos –REG4 e validaram sua superexpressão de células PDAC através de imunistoquímica usando anticorpo anti-
25 REG4. Além disso, os presentes inventores estabeleceram sistemas ELISA de sanduíche para medir nível de REG4 em soro de pacientes com PDACs,
30

e demonstraram o uso de REG4 como um novo marcador sorológico de câncer pancreático.

Diagnosticando câncer pancreático:

5 Através de medição de nível de REG4 em amostras de sangue derivadas de sujeito, a ocorrência de câncer pancreático ou uma predisposição para desenvolvimento de câncer pancreático em um sujeito pode ser determinada. Da mesma maneira, a presente invenção envolve determinação (por exemplo, medição) de nível de REG4 em amostras de sangue. Na presente invenção, um processo para diagnóstico de câncer pancreático
10 também inclui um processo para testar ou detectar câncer pancreático. Alternativamente, na presente invenção, diagnóstico de câncer pancreático também refere-se a mostrar uma suspeita, risco, ou possibilidade de câncer pancreático em um sujeito.

 Quaisquer amostras de sangue podem ser usadas para determinação de nível de REG4 tanto quanto o gene REG4 ou a proteína REG4
15 possa ser detectada nas amostras. Preferivelmente, as amostras de sangue compreendem sangue integral, soro, e plasma.

 Na presente invenção, o "nível de REG4 em amostras de sangue" refere-se à concentração de REG4 presente no sangue após correção
20 de volume corpuscular no sangue integral. Aqueles versados reconhecerão que a porcentagem de volume corpuscular no sangue varia grandemente entre indivíduos. Por exemplo, a porcentagem de eritrócitos no sangue integral é muito diferente entre homens e mulheres. Além disso, diferenças entre indivíduos não podem ser ignoradas. Por isso, a concentração aparente de
25 uma substância no sangue integral que compreende componentes corpusculares varia grandemente dependendo da porcentagem de volume corpuscular. Por exemplo, mesmo se a concentração no soro é a mesma, o valor medido para uma amostra com uma maior quantidade de componente corpuscular será menor que o valor para uma amostra com uma pequena quantidade de componente corpuscular. Por isso, para comparar os valores medidos de componentes no sangue, valores para os quais o volume corpuscular
30 foi corrigido são usualmente usados.

Por exemplo, através de medição de componentes no sangue usando, como amostras, soro ou plasma obtido através de separação de células de sangue do sangue integral, valores medidos dos quais o efeito do volume corpuscular foi removido podem ser obtidos. Por isso, o nível de REG4 na presente invenção usualmente pode ser determinado como uma concentração no soro ou plasma. Alternativamente, ele pode ser primeiro medido como uma concentração no sangue integral, então o efeito a partir de volume corpuscular pode ser corrigido. Métodos para medição de um volume corpuscular em uma amostra de sangue integral são conhecidos.

10 Sujeitos diagnosticados para câncer pancreático de acordo com os presentes métodos são preferivelmente mamíferos e incluem seres humanos, primatas não-humanos, camundongo, ratos, cães, gatos, cavalos e vacas. Um sujeito preferível da presente invenção é um ser humano. Na presente invenção, um sujeito pode ser um paciente suspeito de ter câncer do sistema gastrointestinal (por exemplo, pâncreas) ou indivíduos saudáveis. O paciente pode ser diagnosticado através da presente invenção para facilitar obtenção de decisão clínica. Em uma outra modalidade, a presente invenção também pode ser aplicada a indivíduos saudáveis para seleção de câncer de sistema gastrointestinal (isto é, pâncreas).

20 Em uma modalidade da presente invenção, o nível de REG4 é determinado através de medição de quantidade ou concentração de proteína REG4 em amostras de sangue. Métodos para determinação de quantidade da proteína REG4 em amostras de sangue incluem métodos de imunoensaio.

25 Nos métodos de diagnóstico da presente invenção, a concentração em sangue de CA19-9 pode ser determinada, em adição à concentração no sangue de REG4, para detectar câncer pancreático. Por isso, a presente invenção provê métodos para diagnóstico de câncer pancreático, nos quais câncer pancreático é detectado quando tanto a concentração no sangue de REG4 como a concentração no sangue de CA19-9, ou ambas, são maiores comparadas com indivíduos saudáveis.

30 É bem-conhecido que CA19-9 é um marcador de tumor sorológico para carcinomas pancreáticos, de cólon, gástrico e ovariano. O epítipo

de CA19-9 é um glicolípido sobre uma glicoproteína (mucina) que corresponde ao determinante grupo de sangue (a) Lewis com resíduos de ácido siálico adicionados. O antígeno é definido como um anticorpo monoclonal elevado contra determinantes encontrados em linhas de células de câncer colorretal. O antígeno é também encontrado em tecido fetal normal assim como pâncreas adulto, dutos salivares, epitélio colônico e gástrico, fluido pancreático, fluido gástrico, saliva e meconium. CA19-9 é removido da circulação através de sistema biliar. O antígeno não é expresso em pessoas com genótipo Lewis (a-b), que corresponde a cerca de 5% da população.

10 Como descrito acima, CA19-9 já tem sido usado como marcador sorológico para diagnóstico ou detecção de câncer pancreático. Entretanto, a sensibilidade de CA19-9 como um marcador para câncer pancreático é um pouco insuficiente para detectar câncer pancreático, completamente. Da mesma maneira, é requerido que a sensibilidade de diagnóstico de câncer pancreático possa ser aperfeiçoada.

15 Na presente invenção, um novo marcador sorológico para câncer pancreático, REG4, é provido. Aperfeiçoamento na sensibilidade de métodos de detecção ou diagnósticos para câncer pancreático pode ser obtido através da presente invenção. Por exemplo, a presente invenção provê um processo para diagnóstico de câncer em um sujeito, compreendendo as etapas de:

- 20 (a) coleta de uma amostra de sangue de um sujeito a ser diagnosticado;
- (b) determinação de nível de REG4 na amostra de sangue;
- 25 (c) comparação de nível de REG4 determinado em etapa (b) com aquele de um controle normal onde um alto nível de REG4 na amostra de sangue, comparada ao controle normal, indica que o sujeito sofre de câncer pancreático.

30 Em modalidades preferíveis, o processo de detecção ou diagnóstico da presente invenção ainda pode compreender as etapas de:

- (e) determinação de nível de CA19-9 na amostra de sangue;
- (f) comparação de nível de CA19-9 determinado na etapa (e)

com aquele de um controle normal; e

(g) julgamento de que qualquer ou ambos os altos níveis de REG4 e CA19-9 na amostra de sangue, comparados ao controle normal, indicam que o sujeito sofre de câncer pancreático.

5 Através de combinação entre REG4 e CA19-9, a sensibilidade para detecção de câncer pancreático pode ser significativamente aperfeiçoada. Por exemplo, no grupo analisado no exemplo de trabalho discutido abaixo, taxa positiva de CA19-9 para câncer pancreático é cerca de 76,3%. Em comparação, aquela de combinação entre CA19-9 e REG4 aumenta para
10 88,1% (Figura 6). Na presente invenção, "combinação de CA19-9 e REG4" refere-se a qualquer ou ambos os níveis de CA19-9 e REG4 sendo usados como marcador. Nas modalidades preferíveis, um paciente com positivo de CA19-9 e REG4 pode ser julgado ter um alto risco de câncer pancreático. O uso de combinação de REG4 e CA19-9 como marcador sorológico para
15 câncer pancreático é novo.

 Por isso, a presente invenção pode grandemente aperfeiçoar a sensibilidade para detecção de pacientes com câncer pancreático, comparado a determinações baseadas em resultados de medição de somente CA19-9. Atrás deste aperfeiçoamento está o fato de que o grupo de pacientes positivos para CA19-9 e o grupo de pacientes positivos para REG4 não se ajustam completamente. Este fato é ainda descrito especificamente abaixo.

 Primeiro, entre pacientes que, como um resultado de medições de CA19-9, foram determinados terem um valor menor que um valor-padrão (isto é, não tendo câncer pancreático), há realmente uma certa porcentagem
25 de pacientes que têm câncer pancreático. Tais pacientes são referidos como pacientes negativos falsos para CA19-9. Através de combinação de uma determinação baseada em CA19-9 com uma determinação baseada em REG4, pacientes cujo valor de REG4 está acima de valor-padrão podem ser encontrados a partir de pacientes negativos falsos para CA19-9. Ou seja, a
30 partir de pacientes falsamente determinados serem "negativos" devido a uma baixa concentração de CA19-9 no sangue, a presente invenção provê um meio para identificar pacientes realmente tendo câncer pancreático. A

sensitividade para detecção de pacientes de câncer pancreático é assim aperfeiçoada pela presente invenção. Genericamente, combinação simples de resultados a partir de determinações usando marcadores múltiplos pode aumentar a sensibilidade de detecção, mas por outro lado, isto frequentemente causa uma diminuição em especificidade. Entretanto, através de determinação de melhor balanço entre sensibilidade e especificidade, a presente invenção determinou uma combinação característica que pode aumentar a sensibilidade de detecção sem comprometer a especificidade.

Na presente invenção, de modo a considerar os resultados de medições de CA19-9 ao mesmo tempo, por exemplo, a concentração no sangue de CA19-9 pode ser medida e comparada com valores-padrão, da mesma maneira como para a comparação mencionada acima entre os valores medidos e valores-padrão de REG4. Por exemplo, como medir a concentração de CA19-9 no sangue e comparar a mesma a valores-padrão já é conhecido. Além disso, kits ELISA para CA19-9 também são comercialmente disponíveis. Estes métodos descritos em relatórios conhecidos podem ser usados no processo da presente invenção para diagnóstico ou detecção de câncer pancreático.

Na presente invenção, o valor-padrão da concentração de REG no sangue pode ser determinado estatisticamente. Por exemplo, a concentração no sangue de REG4 em indivíduos saudáveis pode ser medida para determinar estatisticamente a concentração-padrão de REG4 no sangue. Quando uma população estatisticamente suficiente é reunida, um valor na faixa de duas ou três vezes o desvio padrão (S.D.) a partir do valor médio é frequentemente usado como o valor-padrão. Por isso valores correspondendo ao valor médio + 2 x S.D. ou valor médio + 3 x S.D. podem ser usados como valores-padrão. Os valores-padrão mostrados como descrito teoricamente compreendem 90% e 99,7% de indivíduos saudáveis, respectivamente.

Alternativamente, valores-padrão também podem ser fixados baseados na real concentração de REG4 no sangue em pacientes de câncer pancreático. Genericamente, valores-padrão fixados desta maneira minimizam a porcentagem de positivos falsos, e são selecionados de uma faixa de

valores satisfazendo condições que podem maximizar sensibilidade de detecção. Aqui, a porcentagem de positivos falsos refere-se a uma porcentagem, entre indivíduos saudáveis, de pacientes cuja concentração de REG4 no sangue é julgada ser maior que um valor-padrão. Ao contrário, a porcentagem, entre indivíduos saudáveis, de pacientes cuja concentração de REG4 no sangue é julgada ser menor que um valor-padrão indica especificidade. Ou seja, a soma da porcentagem de positivo falso e a especificidade é sempre 1. A sensibilidade de detecção refere-se à porcentagem de pacientes cuja concentração de REG4 no sangue é julgada ser maior que um valor-padrão, entre todos os pacientes de câncer pancreático dentro de uma população de indivíduos para os quais a presença de câncer pancreático foi determinada.

Além disso, na presente invenção, a porcentagem de pacientes de câncer pancreático entre pacientes cuja concentração de REG4 foi julgada ser maior que um valor-padrão representa o valor anunciador positivo. Por outro lado, a porcentagem de indivíduos saudáveis entre pacientes cuja concentração de REG4 foi julgada ser menor que um valor-padrão representa o valor anunciador negativo. A relação entre estes valores é resumida na Tabela 1. Como a relação mostrada abaixo indica, cada um dos valores para sensibilidade, especificidade, valor anunciador positivo, e valor anunciador negativo, que são índices para avaliação de precisão diagnóstica para câncer pancreático, varia dependendo do valor-padrão para julgamento de nível da concentração de REG4 no sangue.

Tabela 1.

Concentração de REG4 no sangue	Pacientes de câncer pancreático	Indivíduos saudáveis	
Alta	a: positivo verdadeiro	B: positivo falso	Valor anunciador positivo $a/(a+b)$
Baixa	c: negativo falso	d: negativo verdadeiro	Valor anunciador negativo $d/(c+d)$
	Sensibilidade $a/(a+c)$	Especificidade $d/(b+d)$	

Como já mencionado, um valor-padrão é usualmente fixado de modo que a razão de positivo falso seja baixa e a sensibilidade seja alta. Entretanto, como também aparente a partir da relação mostrada acima, há uma troca entre a razão de positivo falso e sensibilidade. Ou seja, se o valor-padrão é diminuído, a sensibilidade de detecção aumenta. Entretanto, uma vez que a razão de positivo falso também aumenta, é difícil satisfazer as condições para ter uma "baixa razão positivo falso". Considerando esta situação, por exemplo, valores que rendem os seguintes resultados previstos podem ser selecionados como os valores-padrão preferíveis na presente invenção.

Valores padrões para os quais a razão de positivo falso é 50% ou menos (ou seja, valores-padrão para os quais a especificidade não é menos que 50%).

Valores padrões para os quais a sensibilidade não é menos que 20%.

Na presente invenção, os valores-padrão podem ser fixados usando uma curva de característica de operação receptora (ROC). Uma curva ROC é um gráfico que mostra a sensibilidade de detecção sobre o eixo vertical e uma razão de positivo falso (ou seja, "especificidade - 1") sobre o eixo horizontal. Na presente invenção, uma curva ROC pode ser obtida através de gráfico de mudanças na sensibilidade e a razão de positivo falso, que foram obtidas após variação contínua de valor-padrão para determinação de grau alto/baixo da concentração de REG4 no sangue.

O "valor-padrão" para obtenção de curva ROC é um valor temporariamente usado para as análises estatísticas. O "valor-padrão" para obtenção de curva ROC geralmente pode ser continuamente variado dentro de uma faixa que permite cobrir todos os valores selecionáveis. Por exemplo, o valor-padrão pode ser variado entre os menores e maiores valores de REG4 medidos em uma população analisada.

Baseado na curva ROC obtida, um valor-padrão preferível a ser usado na presente invenção pode ser selecionado de uma faixa que satisfaça as condições mencionadas acima. Alternativamente, um valor-padrão

pode ser selecionado baseado em uma curva ROC produzida através de variação de valores-padrão a partir de uma faixa que compreende maior parte dos valores de REG4 medidos.

REG4 no sangue pode ser medida através de qualquer processo que possa quantificar proteínas. Por exemplo, imunoensaio, cromatografia líquida, ressonância plasmon de superfície (SPR), espectrometria de massa, ou semelhantes pode ser usada na presente invenção. Em espectrometria de massa, proteínas podem ser quantificadas através do uso de apropriado padrão interno. Por exemplo, REG4 marcada com isótopo pode ser usada como o padrão interno. A concentração de REG4 no sangue pode ser determinada a partir da intensidade de pico de REG4 no sangue e aquela do padrão interno. Genericamente, o processo de ionização/dessorção com laser assistido – matriz (MALDI) é usado para espectrometria de massa de proteínas. Com um processo de análise que usa espectrometria de massa ou cromatografia líquida, REG4 também pode ser analisada simultaneamente com outros marcadores de tumor (por exemplo, CA19-9).

Um processo preferível para medição de REG4 na presente invenção é o imunoensaio. A seqüência de aminoácidos de REG4 é conhecida (Genbank Accession Number AY126670). A seqüência de aminoácidos de REG4 é mostrada em SEQ ID Nº: 14, e a seqüência de nucleotídeos do cDNA codificando a mesma é mostrada em SEQ ID Nº: 13. Por isso, aqueles versados na técnica podem preparar anticorpos através de síntese de necessários imunógenos baseado na seqüência de aminoácidos de REG4. O peptídeo usado como imunógeno pode ser facilmente sintetizado usando um sintetizador de peptídeo. O peptídeo sintético pode ser usado como um imunógeno através de ligação do mesmo a uma proteína-veículo.

Hemocianina de limpets fechadura, mioglobina, albumina e similares podem ser usados como a proteína-veículo. Proteínas carreadoras preferíveis são KLH, albumina de soro bovino, e tais. O processo de maleimido benzoil-N-hidro succinimida éster (daqui por diante abreviado como o processo MBS) e similares são geralmente usados para ligar peptídeos sintéticos a proteínas-veículo.

Especificamente, uma cisteína é introduzida no peptídeo sintético e o peptídeo é reticulado a KLH através de MBS usando o grupo SH de cisteína. O resíduo cisteína pode ser introduzido no terminus-N ou terminus-C do peptídeo sintetizado.

5 Alternativamente, REG4 pode ser preparada usando a seqüência de nucleotídeos de REG4 (Genbank Accession Number AY126670), ou uma sua porção. DNAs compreendendo a necessária seqüência de nucleotídeos podem ser clonados usando mRNAs preparados a partir de tecidos expressando REG4. Alternativamente, bibliotecas de cDNA comercialmente
10 disponíveis podem ser usadas como a fonte de clonagem. Os recombinantes genéticos obtidos de REG4, ou seus fragmentos, também podem ser usados como o imunógeno. Recombinantes de REG4 expressos desta maneira são preferíveis como o imunógeno para obtenção de anticorpos usados na presente invenção. Recombinantes de REG4 comercialmente disponíveis
15 (ProSpec-Tany TechnoGene Ltd., product No: PRO-424) também podem ser usados como o imunógeno.

Imunógenos obtidos desta maneira são misturados com um apropriado adjuvante e usados para imunização de animais. Adjuvantes conhecidos incluem adjuvante completo de Freund (FCA) e adjuvante incompleto. O procedimento de imunização é repetido em apropriados intervalos
20 até um aumento no título de anticorpo ser confirmado. Não existem particulares limitações sobre os animais imunizados na presente invenção. Especificamente, animais comumente usados para imunização tais como camundongo, ratos, ou coelhos podem ser usados.

25 Quando obtendo os anticorpos como anticorpos monoclonais, animais que são vantajosos para sua produção podem ser usados. Por exemplo em camundongo, muitas linhas de célula mieloma para fusão de célula são conhecidas, e técnicas para estabelecimento de hibridomas com uma alta probabilidade já são bem-conhecidas. Por isso, camundongos são
30 desejáveis animais imunizados para obtenção de anticorpos monoclonais.

Além disso, os tratamentos de imunização não são limitados a tratamentos in vitro. Métodos para sensibilização imunológica de células

imunocompetentes cultivadas *in vitro* também podem ser empregados. Células produzindo anticorpos obtidas através destes métodos são transformadas e clonadas. Métodos para transformação de células produzindo anticorpo para obtenção de anticorpos monoclonais não são limitados a fusão de
5 célula. Por exemplo, métodos para obtenção de transformantes clonáveis através de infecção com vírus são conhecidos.

Hibridomas que produzem os anticorpos monoclonais usados na presente invenção podem ser selecionados baseado em sua reatividade para REG4. Especificamente, células produzindo anticorpo são primeiro selecionadas através de uso de um índice de atividade de ligação na direção de
10 REG4, ou um seu peptídeo domínio, que foi usado como o imunógeno. Clones positivos que são selecionados através desta seleção são subclonados quando necessário.

Os anticorpos monoclonais a serem usados na presente invenção podem ser obtidos através de cultura de hibridomas estabelecidos sob condições apropriadas e coleta de anticorpos produzidos. Quando os hibridomas são homoibridomas, eles podem ser cultivados *in vivo* através de inoculação dos mesmos intraperitonealmente em animais singênicos. Neste caso, anticorpos monoclonais são coletados como fluido áscites. Quando
15 heteroibridomas são usados, eles podem ser cultivados *in vivo* usando camundongo ingênuo como um hospedeiro.

Em adição a culturas *in vivo*, hibridomas também são comumente cultivados *ex vivo*, em um apropriado ambiente de cultura. Por exemplo, meios basais como RPMI 1640 e DMEM são geralmente usados como o meio para hibridomas. Aditivos tais como soros de animais podem ser adicionados a estes meios para manter a habilidade de produção de anticorpo
25 em um alto nível. Quando hibridomas são cultivados *ex vivo*, os anticorpos monoclonais podem ser coletados como um sobrenadante de cultura. Sobrenadantes de cultura podem ser coletados através de separação a partir de células após cultura, ou através de coleta contínua enquanto cultivando
30 usando uma aparelhagem de cultura que usa uma fibra oca.

Anticorpos monoclonais usados na presente invenção são pre-

parados a partir de anticorpos monoclonais coletados como fluido de áscites ou sobrenadantes de cultura, através de separação de frações de imunoglobulina através de precipitação com sulfato de amônio saturado e ainda purificação através de filtração em gel, cromatografia de troca de íons ou tal. Em
5 adição, se os anticorpos monoclonais são IgGs, métodos de purificação baseados em cromatografia de afinidade com uma coluna de proteína A ou proteína G são efetivos.

Um exemplo de anticorpo monoclonal que pode ser usado nos imunoensaios da presente invenção é o anticorpo 21-1 clone monoclonal de
10 camundongo. Mais especificamente, anticorpo 21-1 clone monoclonal de camundongo, ou fragmentos de anticorpo compreendendo suas regiões variáveis, são preferíveis como anticorpos monoclonais usados nos imunoensaios da presente invenção. Por exemplo, anticorpo 21-1 clone monoclonal, ou anticorpos monoclonais tendo uma atividade de ligação de antígeno equi-
15 valente como este anticorpo, são úteis como anticorpos imobilizados para imunoensaios que são baseados no processo sanduíche. Em uma modalidade preferida da presente invenção, REG4 pode ser medida através de um processo de sanduíche que usa anticorpos monoclonais imobilizados sobre um veículo e anticorpos policlonais marcados. Uma tal combinação de anti-
20 corpos é uma combinação preferível que permite uma detecção altamente sensível de REG4.

As seqüências de aminoácidos de VH e VL do anticorpo 21-1 clone monoclonal são mostradas em SEQ ID NOs: 16 e 24, respectivamente. Aquele versado na técnica pode produzir anticorpos monoclonais tendo
25 uma mesma atividade ligante através de engenharia genética baseado nesta informação de seqüência de aminoácidos. Além disso, através de transplante de CDR1, CDR2 e CDR3 de VH e VL na estrutura de outras imunoglobulinas, anticorpos tendo uma equivalente atividade de ligação de antígeno podem ser reconstituídos. As CDRs de VH e VL de clone 21-1 são compostas
30 pelas seqüências de aminoácidos mostradas abaixo. Cada seqüência de aminoácidos é codificada pelas seqüências de nucleotídeos das SEQ ID NOs indicadas abaixo. Por isso, através de substituição de correspondentes

CDRs de outras imunoglobulinas com os DNAs compreendendo estas seqüências de nucleotídeos, a atividade de ligação de antígeno de clone 21-1 pode ser transplantada para outras imunoglobulinas.

Cadeia Pesada	Seqüência de Nucleotídeos	Seqüência de aminoácidos
CDR1	SEQ ID Nº: 17	SEQ ID Nº: 18
CDR2	SEQ ID Nº: 19	SEQ ID Nº: 20
CDR3	SEQ ID Nº: 21	SEQ ID Nº: 22
Cadeia Leve		
CDR1	SEQ ID Nº: 25	SEQ ID Nº: 26
CDR2	SEQ ID Nº: 27	SEQ ID Nº: 28
CDR3	SEQ ID Nº: 29	SEQ ID Nº: 30

O clone 21-1 provido pela presente invenção é um novo anticorpo monoclonal que é útil para imunoenaios de REG4. Assim, a presente invenção provê anticorpos monoclonais anti-REG4 compreendendo as seqüências de aminoácidos mencionadas anteriormente como as CDRs. Os anticorpos monoclonais da presente invenção preferivelmente compreendem as seqüências de aminoácidos de SEQ ID Nºs: 16 e 24 como as seqüências de aminoácidos de VH e VL, respectivamente.

Imunoglobulinas compreendendo as seqüências de aminoácidos de SEQ ID Nºs: 16 e 24 em suas regiões variáveis podem ser expressas através de incorporação de DNAs codificando as seqüências de aminoácidos em um apropriado vetor de expressão. Através de expressão de DNAs junto com DNAs codificando uma região constante, imunoglobulinas equipadas com uma região constante também podem ser obtidas. Nos imunoenaios da presente invenção, imunoglobulinas completas equipadas com uma região constante podem ser usadas como o anticorpo, ou fragmentos de imunoglobulinas carreando uma região de ligação de antígeno também podem ser usados como o anticorpo. Uma seqüência sinal pode ser adicionada ao terminus-N das regiões variáveis para secretar os produtos de expressão a partir de células hospedeiras. Seqüências de aminoácidos de VH e VL sobre as quais uma seqüência sinal foi adicionada são mostradas em SEQ ID Nºs: 32 e 34, respectivamente, e seqüências de nucleotídeos codificando estas se-

qüências de aminoácidos são mostradas em SEQ ID N^{os}: 31 e 33, respectivamente.

Por outro lado, para obter anticorpos usados na presente invenção como anticorpos policlonais, sangue é retirado de animais cujo título de anticorpo aumentou após imunização, e o soro é separado para obter anti-
5 soro. Imunoglobulinas são purificadas de anti-soros através de métodos conhecidos para preparação de anticorpos usados na presente invenção. Anticorpos específicos de REG4 podem ser preparados através de combinação de cromatografia de imunoafinidade que usa REG4 como um ligante com
10 purificação de imunoglobulina.

Quando anticorpos contra REG4 contatam REG4, os anticorpos se ligam ao determinante antigênico (epítipo) que os anticorpos reconhecem através de uma reação de anticorpo - antígeno. A ligação de anticorpos a antígenos pode ser detectada através de vários princípios de imunoensaio.
15 Imunoensaios podem ser amplamente classificados em métodos de análise heterogênea e métodos de análise homogênea. Para manter a sensibilidade e especificidade de ensaios imune em um alto nível, o uso de anticorpos monoclonais é desejável. Métodos da presente invenção para medição de REG4 através de vários formatos de imunoensaio são especificamente explicados.
20

Primeiro, métodos para medição de REG4 usando um imunoensaio heterogêneo são descritos. Em imunoensaios heterogêneos, um mecanismo para detecção de anticorpos que se ligam a REG4 após separação dos mesmos a partir daqueles que não se ligam a REG4 é requerido.

25 Para facilitar a separação, reagentes imobilizados são geralmente usados. Por exemplo, uma fase sólida sobre a qual anticorpos reconhecendo REG4 foram imobilizados é primeiro preparada (anticorpos imobilizados). REG4 é feita ligar-se a estes, e anticorpos secundários são ainda reagidos com os mesmos.

30 Quando a fase sólida é separada da fase líquida e ainda lavada, quando necessário, anticorpos secundários permanecem sobre a fase sólida em proporção à concentração de REG4. Através de marcação de anticorpos

secundários, REG4 pode ser quantificada através de medição de sinal derivado da marcação.

Qualquer processo pode ser usado para ligar os anticorpos à fase sólida. Por exemplo, anticorpos podem ser fisicamente adsorvidos a materiais hidrofóbicos como poliestireno. Alternativamente anticorpos podem ser quimicamente ligados a uma variedade de materiais tendo grupos funcionais sobre suas superfícies. Além disso, anticorpos marcados com um ligante de ligação podem ser ligados a uma fase sólida através de arraste dos mesmos usando um parceiro de ligação do ligante. Combinações de um ligante de ligação e seu parceiro de ligação incluem avidina – biotina e tais. A fase sólida e anticorpos podem ser conjugados ao mesmo tempo ou antes de reação entre os anticorpos primários e REG4.

Similarmente, os anticorpos secundários não precisam ser diretamente marcados. Ou seja, eles podem ser marcados indiretamente usando anticorpos contra anticorpos ou usando reações de ligação como aquela de avidina – biotina.

A concentração de REG4 em uma amostra é determinada baseado nas intensidades de sinais obtidas usando amostras-padrão com conhecidas concentrações de REG4.

Qualquer anticorpo pode ser usado como o anticorpo imobilizado e anticorpo secundário para os imunoensaios heterogêneos mencionados acima, tanto quanto seja um anticorpo, ou um fragmento compreendendo um seu sítio de ligação de antígeno, que reconhece REG4. Por isso, ele pode ser um anticorpo monoclonal, um anticorpo policlonal, ou uma mistura ou combinação de ambos. Por exemplo, uma combinação de anticorpos monoclonais e anticorpos policlonais é uma combinação preferível na presente invenção. Alternativamente, quando ambos anticorpos são anticorpos monoclonais, combinação de anticorpos monoclonais reconhecendo diferentes epítomos é preferível.

Uma vez que os antígenos a serem medidos são feitos sanduíches por anticorpos, tais imunoensaios heterogêneos são chamados métodos de sanduíche. Uma vez que métodos sanduíche são distinguidos na

medição de sensibilidade e a reproduzibilidade, eles são um princípio de medição preferível na presente invenção.

O princípio de reações de inibição competitivas também pode ser aplicado aos imunoenaios heterogêneos. Especificamente, eles são imunoenaios baseados no fenômeno onde REG4 em uma amostra inibe competitivamente a ligação entre REG4 com uma concentração conhecida e um anticorpo. A concentração de REG4 na amostra pode ser determinada através de marcação de REG4 com uma concentração conhecida e medindo a quantidade de REG4 que reagiu (ou não reage) com o anticorpo.

Um sistema de reação competitivo é estabelecido quando antígenos com uma concentração conhecida e antígenos em uma amostra são simultaneamente reagidos para um anticorpo. Além disso, análises através de um sistema de reação inibidor são possíveis quando anticorpos são reagidos com antígenos em uma amostra, e antígenos com uma concentração conhecida são reagidos a seguir. Em ambos os tipos de sistemas de reação, sistemas de reação que se distinguem na operabilidade podem ser construídos através de fixação de um dos antígenos com uma concentração conhecida usado como um componente reagente ou o anticorpo como o componente marcado, e o outro como o reagente imobilizado.

Radioisótopos, substâncias fluorescentes, substâncias luminescentes, substâncias tendo uma atividade enzimática, substâncias macroscopicamente observáveis, substâncias magneticamente observáveis, e tais são usadas nestes imunoenaios heterogêneos. Exemplos específicos destas substâncias de marcação são mostrados abaixo.

Substâncias tendo uma atividade enzimática:

peroxidase,

fosfatase alcalina,

urease, catalase,

glicose oxidase,

lactato desidrogenase, ou

amilase, etc.

Substâncias fluorescentes:

isotiocianato de fluoresceína,
isotiocianato de tetrametil rodamina,
isotiocianato de rodamina substituído, ou
isotiocianato de dicloro triazina, etc.

5 Radioisótopos:

trítio,
 ^{125}I , ou
 ^{131}I , etc.

10 Entre estes, marcadores não-radioativos tais como enzimas são um marcador vantajoso em termos de segurança, operabilidade, sensibilidade, e tais. Marcadores enzimáticos podem ser ligados a anticorpos ou a REG4 através de métodos conhecidos tal como o processo de ácido periódico ou processo maleimida.

15 Como a fase sólida, pérolas, paredes internas de um recipiente, partículas finas, veículos porosos, partículas magnéticas, ou tais são usadas. Fases sólidas formadas usando materiais tais como poliestireno, policarbonato, polivinil tolueno, polipropileno, polietileno, cloreto de polivinila, náilon, polimetacrilato, látex, gelatina, agarose, vidro, metal, cerâmica, ou tais podem ser usados. Materiais sólidos nos quais grupos funcionais para anticorpos ligarem quimicamente e tais foram introduzidos sobre a superfície dos
20 materiais sólidos acima também são conhecidos. Métodos de ligação conhecidos, incluindo ligação química tal como poli-L-lisina ou tratamento com glutaraldeído e adsorção física, podem ser aplicados para fases sólidas e anticorpos (ou antígenos).

25 Embora as etapas de separação de fase sólida da fase líquida e as etapas de lavagem sejam requeridas em todos os imunoenaios heterogêneos aqui exemplificados, estas etapas podem ser facilmente realizadas usando um processo de imunocromatografia, que é uma variação do processo sanduíche.

30 Especificamente, anticorpos a serem imobilizados são imobilizados sobre veículos porosos capazes de transportarem uma solução amostra através de fenômeno de capilaridade, então uma mistura de uma amostra

compreendendo REG4 e anticorpos marcados é ali disposta através deste fenômenos de capilaridade. Durante disposição, REG4 reage com os anticorpos marcados, e quando ela ainda contata os anticorpos imobilizados, ela é arrastada naquela localização. Os anticorpos marcados que não reagem com REG4 passam através, sem serem presos pelos anticorpos imobilizados.

Como um resultado, a presença de REG4 pode ser detectada usando, como um índice, os sinais dos anticorpos marcados que permanecem na localização dos anticorpos imobilizados. Se os anticorpos marcados são mantidos à montante no veículo poroso em avanço, todas as reações podem ser iniciadas e completadas através de justo gotejamento nas soluções amostras, e um sistema de reação extremamente simples pode ser construído. No processo de imunocromatografia, componentes marcados que podem ser distinguidos macroscopicamente, tais como partículas coloridas, podem ser combinados para construção de um dispositivo analítico que não requer mesmo um leitor especial.

Além disso, no processo de imunocromatografia, a sensibilidade de detecção para REG4 pode ser ajustada. Por exemplo, através de ajuste de sensibilidade de detecção próxima de valor de corte descrito abaixo, os componentes marcados mencionados anteriormente podem ser detectados quando o valor de corte é excedido. Através de uso de um tal dispositivo, se um sujeito é positivo ou negativo pode ser julgado muito simplesmente. Através de adoção de uma constituição que permite uma distinção macroscópica dos marcadores, resultados de exame necessários podem ser obtidos através de simples aplicação de amostras de sangue ao dispositivo para imunocromatografia.

Vários métodos para ajuste de sensibilidade de detecção do processo de imunocromatografia são conhecidos. Por exemplo, um segundo corpo imobilizado para ajuste de sensibilidade de detecção pode ser colocado entre a posição onde amostras são aplicadas e os anticorpos imobilizados (pedido de patente (JP-A)H06-341989 (pedido de patente JP publicado, não-examinado)). REG4 na amostra é retido pelo segundo anticorpo imobilizado.

zado enquanto desenvolvendo a partir da posição onde a amostra foi aplicada para a posição do primeiro anticorpo imobilizado para detecção de marcador. Após o segundo anticorpo imobilizado ser saturado, REG4 pode atingir a posição do primeiro anticorpo imobilizado localizado à jusante. Como

5 um resultado, quando a concentração de REG4 compreendida na amostra excede uma concentração predeterminada, REG4 ligada ao anticorpo marcado é detectada na posição do primeiro anticorpo imobilizado.

A seguir, imunoenaios homogêneos são explicados. Como oposto a métodos de imunoenaiológico heterogêneo que requerem uma

10 separação das soluções de reação como descrito acima, REG4 também pode ser medida usando métodos de análise homogênea. Métodos de análise homogênea permitem a detecção de produtos de reação anticorpo – antígeno sem sua separação das soluções de reação.

Um processo de análise homogênea representativo é a reação

15 de imunoprecipitação, na qual substâncias antigênicas são quantitativamente analisadas através de exame de precipitados produzidos seguindo uma reação de anticorpo – antígeno. Anticorpos policlonais são geralmente usados para as reações de imunoprecipitação. Quando anticorpos monoclonais são aplicados, múltiplos tipos de anticorpos monoclonais que se ligam a diferentes epítomos de REG4 são preferivelmente usados. Os produtos de

20 reações de precipitação que seguem as reações imunológicas podem ser macroscopicamente observados ou podem ser ópticamente medidos para conversão em dados numéricos.

A reação de aglutinação de partícula imunológica, que usa como

25 um índice a aglutinação por antígenos de partículas finas sensibilizadas por antígeno, é um processo de análise homogênea comum. Como na reação de imunoprecipitação mencionada anteriormente, anticorpos policlonais ou uma combinação de múltiplos tipos de anticorpos monoclonais também pode ser usada nesta processo. Partículas finas podem ser sensibilizadas com

30 anticorpos através de sensibilização com uma mistura de anticorpos, ou podem ser preparadas através de mistura de partículas sensibilizadas separadamente com cada anticorpo. Partículas finas obtidas desta maneira origi-

nam produtos de reação semelhantes a matriz com contato com REG4. Os produtos de reação podem ser detectados como agregação de partículas. Agregação de partículas pode ser macroscopicamente observada ou pode ser medida opticamente para conversão em dados numéricos.

5 Métodos de análise imunológica baseados em transferência de energia e canalização de enzima são conhecidos como imunoensaios homogêneos. Em métodos utilizando transferência de energia, diferentes marcadores óticos tendo uma relação doador/receptor são ligados a múltiplos anticorpos que reconhecem epítomos adjacentes sobre um antígeno. Quando ocorre uma reação imunológica, as duas partes são abordadas e ocorre um fenômeno de transferência de energia, resultando em um sinal tal como resfriamento brusco ou uma mudança no comprimento de onda de fluorescência. Por outro lado, canalização de enzima utiliza marcadores para múltiplos anticorpos que se ligam a epítomos adjacentes, onde os marcadores são uma combinação de enzimas tendo uma relação de modo que o produto de reação de uma enzima é o substrato da outra. Quando as duas partes se aproximam devido a uma reação imunológica, as reações de enzima são promovidas, sua ligação pode ser detectada como uma mudança na taxa de reação de enzima.

15 20 Na presente invenção, sangue para medição de REG4 pode ser preparado a partir de sangue retirado de pacientes. Preferíveis amostras de sangue são o soro ou o plasma. Amostras de soro ou plasma podem ser diluídas antes de medições. Alternativamente, o sangue integral pode ser medido como uma amostra e o valor medido obtido pode ser corrigido para determinar a concentração em soro. Por exemplo, concentração em sangue integral pode ser corrigida para a concentração em soro através de determinação de porcentagem de volume corpuscular na mesma amostra de sangue.

25 30 Em uma modalidade preferida, o imunoensaio compreende um ELISA. Os presentes inventores estabeleceram sanduíche ELISA para detectar REG4 em soro em pacientes com PDACs excisáveis.

O nível de REG4 nas amostras de sangue é então comparado

com o nível de REG4 associado com uma amostra de referência tal como uma amostra controle normal. A frase "nível de controle normal" refere-se ao nível de REG4 tipicamente encontrado em uma amostra de sangue de uma população não sofrendo de câncer pancreático. A amostra de referência é preferivelmente de uma natureza similar àquela da amostra de teste. Por exemplo, se as amostras de testes compreendem soro de paciente, a amostra de referência também deve ser soro. O nível de REG4 nas amostras de sangue de controle e sujeitos de testes pode ser determinado ao mesmo tempo ou, alternativamente, o nível de controle normal pode ser determinado através de um processo estatístico baseado nos resultados obtidos através de análise de nível de REG4 em amostras previamente coletadas de um grupo de controle.

O nível de REG4 também pode ser usado para monitorar o curso de tratamento de câncer pancreático. Neste processo, uma amostra de sangue de teste é provida a partir de um sujeito sofrendo tratamento para câncer pancreático. Preferivelmente, múltiplas amostras de sangue de testes são obtidas do sujeito em vários pontos de tempo antes, durante, ou após o tratamento. O nível de REG4 na amostra de pós-tratamento então pode ser comparado com o nível de REG4 na amostra pré-tratamento ou, alternativamente, com uma amostra de referência (por exemplo, um nível de controle normal). Por exemplo, se o nível de REG4 pós-tratamento é menor que o nível de REG4 pré-tratamento, pode-se concluir que o tratamento foi eficaz. Da mesma maneira, se o nível de REG4 pós-tratamento é similar ao nível de REG4 controle normal, pode-se também concluir que o tratamento foi eficaz.

Um tratamento "eficaz" é um que conduz a uma redução no nível de REG4 ou uma diminuição em tamanho, ou potencial de metástase de câncer pancreático em um sujeito. Quando um tratamento é aplicado profilaticamente, "eficaz" significa que o tratamento retarda ou previne ocorrência de câncer pancreático ou alivia um sintoma clínico de câncer pancreático. A avaliação de câncer pancreático pode ser feita usando protocolos-padrão clínicos. Além disso, a eficácia de um tratamento pode ser determinada em associação com qualquer processo conhecido para diagnóstico ou tratamen-

to de câncer pancreático. Por exemplo, câncer pancreático é rotineiramente diagnosticado histopatologicamente ou através de identificação de anomalias sintomáticas.

De acordo com os resultados dos Exemplos descritos abaixo, REG4, que é um marcador sorológico provido pela presente invenção para 5 câncer pancreático, também pode mostrar um alto valor medido em pacientes tendo um câncer outro que não câncer pancreático. Especificamente, uma alta concentração em sangue foi observada particularmente para câncer de estômago e câncer de cólon. Uma alta expressão de REG4 foi realmente confirmada através de manchamento imunoistológico em câncer de 10 estômago (Oue N., et al., (2005) J. Pathol., 207(2):185-98) e câncer de cólon (Violette S., et al., (2003) Int. J. Cancer, 103(2):185-93). Entretanto, a possibilidade de se ter tais cânceres pode ser facilmente excluída através de uso de outros indicadores diagnósticos. Por isso, a possibilidade de que um paciente julgado ter câncer pancreático baseado em REG4 ou uma combinação 15 de CA19-9 e REG4 também tenha câncer de estômago ou câncer de cólon pode ser facilmente excluída.

O diagnóstico e detecção de cânceres pancreáticos em estágios iniciais têm sido muito difíceis, enquanto o diagnóstico ou seleção para outras malignidades gastrointestinais (GI) foi estabelecida por métodos endoscópicos ou outros não-invasivos como sangue oculto fecal e pepsinogênio de soro que são bem-conhecidos na técnica. Se os métodos reivindicados são aplicados para selecionar doenças GI e detectar alto nível de REG4 em soro, procedimentos endoscópicos podem ser usados para detectar doenças 20 de GI, os quais já estão estabelecidos como métodos sensíveis e confiáveis. Se nenhuma lesão patogênica significativa no estômago ou colorreto é detectada através de estudo endoscópico, procedimentos diagnósticos invasivos ou não-invasivos (Colangiopancreatografia Retrógrada Endoscópica (ERCP), ultrasonoscopia endoscópica (EUS), colangiopancreatografia de ressonância magnética (MRCP), etc.), então podem ser usados para detecção 25 de câncer pancreático de estágio inicial. A técnica anterior, entretanto, não provê qualquer ferramenta confiável para selecionar câncer pancreático

de estágio inicial. Para seleção para outras malignidades de GI, sangue oculto fecal e pepsinogênio de soro são tipicamente usados. Os métodos presentemente reivindicados são uma ferramenta útil para selecionar câncer pancreático através de combinação com outros marcadores de soro, por exemplo, CA19-9, e procedimentos endoscópicos invasivos.

Componentes usados para realizar o diagnóstico de câncer pancreático de acordo com a presente invenção podem ser combinados em avanço e supridos como um kit de teste. Da mesma maneira, a presente invenção provê um kit para detecção de um câncer pancreático, compreendendo:

(i) um reagente de imunoenensaio para determinação de um nível de REG4 em uma amostra de sangue; e

(ii) uma amostra controle positivo para REG4.

Nas modalidades preferíveis, o kit da presente invenção ainda pode compreender:

(iii) um reagente de imunoenensaio para determinação de um nível de CA19-9 em uma amostra de sangue; e

(iv) uma amostra de controle positivo para CA19-9.

Os reagentes para os imunoenensaiois que constituem um kit da presente invenção podem compreender reagentes necessários para os vários imunoenensaiois descritos acima. Especificamente, os reagentes para os imunoenensaiois compreendem um anticorpo que reconhece a substância a ser medida. O anticorpo pode ser modificado dependendo do formato de ensaio do imunoenensaio. ELISA pode ser usado como um formato de ensaio preferível da presente invenção. Em ELISA, por exemplo, um primeiro anticorpo imobilizado sobre uma fase sólida e um segundo anticorpo tendo um marcador são geralmente usados.

Por isso, os reagentes de imunoenensaio para ELISA podem compreender um primeiro anticorpo imobilizado sobre um veículo de fase sólida. Partículas finas ou as paredes internas de um recipiente de reação podem ser usadas como o veículo de fase sólida. Partículas magnéticas podem ser usadas como as partículas finas. Alternativamente, placas de multicavidades

tais como microplacas de 96 cavidades são freqüentemente usadas como os recipientes de reação. Recipientes para processamento de um grande número de amostras, que são equipados com cavidades tendo um volume menor que em microplacas de 96 cavidades em uma alta densidade, também são conhecidos. Na presente invenção, as paredes internas destes recipientes de reação podem ser usadas como os veículos de fase sólida.

Os reagentes de imunoenensaio para ELISA ainda podem compreender um segundo anticorpo tendo um marcador. O segundo anticorpo para ELISA pode ser um anticorpo sobre o qual uma enzima é ligada direta ou indiretamente. Métodos para ligação química de uma enzima a um anticorpo são conhecidos. Por exemplo, imunoglobulinas podem ser enzimaticamente clivadas para obtenção de fragmentos compreendendo as regiões variáveis. Através de redução de ligações -SS- compreendidas nestes fragmentos a grupos -SH, ligadores bifuncionais podem ser ligados. Através de ligação de uma enzima aos ligadores bifuncionais em avanço, enzimas podem ser ligadas aos fragmentos de anticorpos.

Alternativamente, para ligar indiretamente uma enzima, por exemplo, a ligação avidina – biotina pode ser usada. Ou seja, uma enzima pode ser ligada indiretamente a um anticorpo através de contato de um anticorpo biotinilado com uma enzima à qual avidina foi ligada. Em adição, uma enzima pode ser ligada indiretamente a um segundo anticorpo usando um terceiro anticorpo que é um anticorpo marcado com enzima reconhecendo o segundo anticorpo. Por exemplo, enzimas tais como aquelas exemplificadas acima podem ser usadas como as enzimas para marcar os anticorpos.

Kits da presente invenção compreendem um controle positivo para REG4. Um controle positivo para REG4 compreende REG4 cuja concentração foi determinada em avanço. Concentrações preferíveis são, por exemplo, uma concentração mostrada como o valor-padrão em um processo de teste da presente invenção. Alternativamente, um controle positivo tendo uma maior concentração também pode ser combinado. O controle positivo para REG4 na presente invenção adicionalmente pode compreender CA19-9 cuja concentração foi determinada em avanço. Um controle positivo compre-

endendo ambas as REG4 e CA19-9 é preferível como o controle positivo da presente invenção.

Por isso, a presente invenção provê um controle positivo para detecção de câncer pancreático, que compreende ambas as REG4 e CA19-9 em concentrações acima de um valor normal. Alternativamente, a presente invenção refere-se ao uso de uma amostra de sangue compreendendo REG4 e CA19-9 em concentrações acima de um valor normal na produção de um controle positivo para a detecção de câncer pancreático. É conhecido que CA19-9 pode servir como um índice para câncer pancreático; entretanto, que REG4 pode servir como um índice para câncer pancreático é uma nova verificação obtida através da presente invenção. Por isso, controles positivos compreendendo REG4 em adição a CA19-9 são novos. Os controles positivos da presente invenção podem ser preparados através de adição de CA19-9 e REG4 em concentrações acima de um valor-padrão a amostras de sangue. Por exemplo, soros compreendendo CA19-9 e REG4 em concentrações acima de um valor-padrão são preferíveis como os controles positivos da presente invenção.

Os controles positivos da presente invenção estão preferivelmente em uma forma líquida. Na presente invenção, amostras de sangue são usadas como amostras. Por isso, amostras usadas como controles também precisam estar em forma líquida. Alternativamente, através de dissolução de um controle positivo seco com uma quantidade predeterminada de líquido no momento de uso, um controle que rende a concentração testada pode ser preparado. Através de embalagem, junto com um controle positivo seco, de uma quantidade de líquido necessária para dissolver o mesmo, o usuário pode obter o necessário controle positivo através de justa mistura dos mesmos. REG4 usada como o controle positivo pode ser uma proteína derivada naturalmente ou ela pode ser uma proteína recombinante. Similarmente, para CA19-9 que é um antígeno carboidrato, um antígeno carboidrato derivado naturalmente ou um antígeno carboidrato tipo Lewis sialila sintetizado quimicamente pode ser usado como o controle. Não somente controles positivos, mas também controles negativos podem ser combinados nos

kits da presente invenção. Os controles positivos ou controles negativos são usados para verificar que os resultados indicados pelos imunoenaios são corretos.

Os exemplos que se seguem são apresentados para ilustrarem a presente invenção e para auxiliarem àqueles versados na técnica na obtenção e uso da mesma. Os exemplos não são pretendidos em qualquer maneira para de outro modo limitarem o escopo da presente invenção.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou testes da presente invenção, apropriados métodos e materiais são descritos abaixo. Quaisquer patentes, pedidos de patente, e publicações aqui citadas são incorporados por referência.

Abaixo, a presente invenção será especificamente descrita usando Exemplos, mas ela não deve ser construída como limitada aos mesmos.

Exemplos

[Exemplo 1] Amostras Clínicas

Amostras de soro pré-operativas e pós-operativas (um mês após a operação) foram obtidas de sete pacientes sofrendo pancreaticoduodenotomia para adenocarcinoma pancreático sob as apropriadas regras para consentimento informado. Seções de tecido embutidas em parafina convencionais de PDACs foram obtidas de espécimes cirúrgicos sob as apropriadas regras para consentimento informado. Amostras de soro foram obtidas de 59 pacientes de câncer pancreático, 35 outros pacientes de doenças pancreáticas, e 56 doadores saudáveis normais.

[Exemplo 2] Análises RT-PCR SemiQuantitativas para REG4

Purificação de células de PDAC e epitélio ductal pancreático normal foi descrita previamente (Nakamura T, et al., (2004) Oncogene; 23(13):2385-400); RNAs das populações de células purificadas foram submetidos a dois ciclos de amplificação através de transcrição in vitro baseada

em T7 (Epicentre Technologies, Madison, WI). Os presentes inventores prepararam apropriadas diluições de cada cDNA de filamento simples para subsequente amplificação PCR através de monitoração de β -actina (ACTB) como controle quantitativo. As seqüências iniciadoras foram

- 5 5'-CATCCACGAAACTACCTTCAACT-3' (SEQ ID Nº: 1) e
 5'-TCTCCTTAGAGAGAAGTGGGGTG-3' (SEQ ID Nº: 2) para ACTB;
 5'-CCAATTGCTATGGTTACTTCAGG-3' (SEQ ID Nº: 3) e
 5'-GAAAAACAAGCAGGAGTTGAGTG-3' (SEQ ID Nº: 4) para REG4.

10 Todas as reações foram realizadas sob condições de: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos; e 21 ciclos (para ACTB) ou 28 ciclos (para REG4) de 94°C por 30 s, 58°C por 30 s, e 72°C por 1 minuto, sobre um sistema GeneAmp PCR 9700 (PE Applied Biosystems, Foster, CA).

[Exemplo 3] produção de hREG4 recombinante (rhREG4)

(1) Construção de vetor cassete de expressão

15 Um vetor de expressão de gene-alvo que coexpressa um gene-alvo e uma proteína de fusão EGFP – puromicina por IRES sob o controle de um promotor CMV foi construído.

KOD-Plus-(TOYOBO; KOD-201) foi usado para todos os métodos PCR para amplificação de gene.

20 Primeiro, gene Tag His-myc foi amplificado de pcDNA3.1/myc-His A (Invitrogen; V800-2) por PCR usando

5'-TTAATTAAGTTCGAGGGATCCCCCTTCGAACAAAACTCATC-3' (SEQ ID Nº: 5)

e 5'-GGCGAGAAAGGAAGGGAAG-3' (SEQ ID Nº: 6), e inserido no sítio

25 Smal em pBluescriptII SK+(TOYOBO) para construir pBlue/myc-His. pBlue/myc-His/EGFP foi então preparado através de inserção de um gene EGFP amplificado usando

ATCAGATCTATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3' (SEQ ID Nº: 7) e

5'-ATCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3' (SEQ ID Nº: 8) no sítio EcoRV em pBlue/myc-His. Adicionalmente, seqüência de gene IRES-puromicina foi

30 amplificada de pQCXIP (Clontech; 9136-1) usando

5'-AATAGATATCCGCCCTCTCCCTCCCC-3' (SEQ ID Nº: 9) e

5'-AATAGGATCCGGCACCGGGCTTGCG-3' (SEQ ID Nº: 10),

e então digerido com EcoRV e BamHI, e introduzido no sítio PmeI-Bg1II de pBlue/myc-His/EGFP para construir pBlue/myc-His/IRES-Puro-EGFP. Finalmente, o fragmento PacI-EcoRV de pQCXIP foi substituído com um segmento de gene de myc-His/IRES-Puro-EGFP excisado de pBlue/myc-His/IRES-Puro-EGFP por PacI e EcoRV para construir o vetor de expressão de gene-alvo pQCXmHIPG.

(2) Construção de vetor de expressão REG4mH

O gene REG4 foi amplificado por PCR usando 5'-AATATTAATTAAGGAAGATGGCTTCCAGAAGCA-3' (SEQ ID Nº: 11) e 5'-AATAGGATCCTGGTCCGGTACTTGACACAGGA-3' (SEQ ID Nº: 12), e então inserido no sítio PacI-BamHI de pQCXmHIPG para construir pQC/REG4mH/IPG.

(3) Estabelecimento de linha de célula de expressão

Sistema de Expressão Retroviral Pantrópico (Clontech; K1063-1) foi empregado para estabelecer uma linha de células expressando antígeno.

Células GP2-293 confluentes (Clontech; K1063-1) foram preparadas sobre placas de 100 mm revestidas com colágeno, e co-transfectadas com 11,2 µg de cada um de pQC/REG4mH/IPG e pVSV-G (Clontech; K1063-1) usando Lipofectamina 2000. Após 48 horas, o sobrenadante compreendendo partículas de vírus foi coletado, os vírus foram precipitados por ultracentrifugação (18000 rpm, 1,5 h, 4°C), e o precipitado foi suspenso em 30 µL de TNE (Tris-HCl a 50 mM [pH 7,8], NaCl 130 mM, EDTA a 1 mM) para preparar uma solução de vetor retroviral.

5 µL da solução de vetor retroviral foram diluídos com 150 µL de DMEM (SIGMA; D5796)-FBS a 10% contendo 8 µg/mL de brometo de hexadimetrina (SIGMA; H-9268), para preparar um meio contendo partículas de vírus. Um meio no qual células 293T foram crescidas para uma confluência de cerca de 40% em uma placa de 96 cavidades foi substituído com o meio contendo as partículas de vírus preparadas, pelo que introduzindo pQC/REG4mH/IPG nas células. Após a introdução de gene, as células foram cultivadas em DMEM (SIGMA; D5796)-FBS a 10% contendo 5 µg/mL de Puromicina (SIGMA; P-8833) para estabelecer uma linha de célula de expres-

são (REG4mH/293T).

(4) Purificação de antígeno

Cerca de 1 L de sobrenadante de cultura da linha de células de expressão estabelecida foi coletado e usado para purificar proteína marcada-His usando TALON Purification Kit (Clontech; K1253-1). A proteína purificada foi então dializada com PBS e confirmada por SDS-PAGE e Western blotting. A concentração de proteína foi determinada usando Protein Assay Kit II (BioRad; 500-0002JA). Esta proteína foi tomada ser o antígeno purificado.

10 [Exemplo 4] Anticorpo Policlonal

Proteína rhREG4 foi preparada para injeção através de emulsificação de solução de antígeno com adjuvante (adjuvante completo de Freund). Anticorpo anti-REG4 policlonal (anti-REG4 pAb) foi elevado em coelhos (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan) contra o inteiro comprimento purificado de proteína rhREG4.

Purificação de afinidade dos anti-soros foi realizada como se segue. Resina Sepharose 4B (Amersham) foi ativada por solução de bromociano e acoplada com proteína rhREG4. O anti-soro filtrado foi adicionado à resina descrita acima, então lavada com tampão fosfato (pH 8,0) por 3 vezes. Anticorpo específico de rhREG4 foi eluído através de tampão HCl – glicina (pH 2,3), neutralizado com tris-HCl (pH 8,0), e dializado com PBS.

[Exemplo 5] Anticorpo monoclonal

(1) Imunização

Camundongos BALB/C (4 semanas de idade, fêmeas) (Japan SLC) foram usados como animais a serem imunizados, e a imunização foi feita através do processo de almofada de pata. 50 μ L de uma emulsão preparada através de mistura de 100 μ L de imunógeno ajustados para 0,1 mg/mL e um adjuvante (adjuvante completo (FREUND) Mitsubishi Kagaku Iatron RM606-1) foram injetados em ambas as almofadas de patas de quatro camundongos, respectivamente. As segunda e terceira (final) imunizações foram realizadas cada três dias (intervalos de dois dias), e fusão de célula foi conduzida três dias após a terceira imunização.

(2) Fusão de célula

Nódulos linfáticos aumentados foram excisados de ambas as patas do camundongo imunizado, os nódulos linfáticos foram cortados, as células foram empurradas fora por fórceps ou semelhante, e as células obtidas dos nódulos linfáticos foram coletadas por centrifugação. Células de mieloma (P3U1) foram então misturadas em uma taxa de 2:1 a 10:1. A mistura foi centrifugada e então PEG 50% (PEG4000; MERCK Cat Nº 1097270100) diluída com um igual volume de RPMI (RPMI1640; SIGMA Cat Nº R8758) foi adicionado ao pélete obtido para conduzir a fusão de célula. Após lavagem, as células foram suspensas em 160 mL de meio FBS-HAT 15% suplementado com suplemento HAT (x50) (GIBCO Cat Nº 21060-017) e revestidas sobre dezesseis placas de 96 cavidades em 200 µL/cavidade. O meio foi trocado após três dias, e após formação de colônia ser confirmada (uma a duas semanas depois), a primeira seleção foi realizada através de imunoprecipitação.

(3) Imunoprecipitação

50 µL de contas de Protein G Sepharose lavadas em PBS foram preparadas em cada cavidade de uma placa de cavidade profunda, e 350 µL do sobrenadante de cultura de hibridoma foram vertidos sobre as contas para permitir reação por uma hora a 4°C, sob rotação. Após lavagem com PBS, 350 µL de sobrenadante de cultura (substâncias ligadas não-especificamente adsorvidas por contas de Protein G Sepharose) foram adicionados como antígeno a cada cavidade, e uma reação anticorpo – antígeno foi conduzida sob rotação por uma hora a 4°C. A placa foi lavada novamente com PBS. 30 µL de 2x Tampão Amostra foram adicionados a cada cavidade e levados à ebulição para preparar amostras, e clones que podem ser imunoprecipitados foram selecionados através de detecção de antígeno marcado por Western blotting.

(4) Preparação de hibridomas monoclonais

Os hibridomas selecionados foram clonados através do processo de diluição limitante para obter hibridomas monoclonais. Os hibridomas foram revestidos em uma placa de 96 cavidades, sobrenadantes de cultura

de cavidades com colônias simples foram coletados, e atividade de anticorpo foi confirmada através de imunoprecipitação acima. Células em cavidades nas quais atividade foi confirmada foram proliferadas e clones 21-1, 24-1, e 34-1, que foram fortemente positivos em imunoprecipitação, foram obtidos.

5 (5) Purificação de anticorpo

Os sobrenadantes de cultura dos hibridomas foram aplicados sobre colunas de proteína A em uma taxa de uma gota por segundo para adsorver os anticorpos, e lavados com PBS/ NaN₃ a 0,1% (até A280 tornar-se 0,05 ou menos quando medida com um espectrômetro de absorção), e os anticorpos adsorvidos eluídos com tampão Arginina a 0,5 M – HCl (pH 4,1). Na etapa de eluição, 1/5 de volume de tampão Tris-HCl a 1M (pH 8,0) foi imediatamente adicionado às amostras eluídas para neutralização. Após medição de A280 para cada fração, frações das quais A280 foi 0,1 ou mais foram reunidas e dialisadas em PBS. Após diálise as concentrações foram determinadas baseado na seguinte fórmula: concentração = A280 x 0,7 [mg/mL].

[Exemplo 6] Manchamento imunohistoquímico

Seções de microarranjo – tecido de carcinomas pancreáticos (AccuMax Array) foram adquiridas de Petagene Inc. (Seoul, Korea), onde 31 tecidos de PDAC e 2 tecidos de tumor endócrino foram feitos pontos em duplicata. As seções foram desparafinadas e autoclavadas por 15 minutos a 108°C em tampão citrato, pH 6,0. Atividade de peroxidase endógena foi rapidamente resfriada através de incubação por 30 minutos em peróxido de hidrogênio a 0,33% diluído em metanol. Após incubação com soro fetal bovino para bloqueio, as seções foram incubadas com anticorpo policlonal anti-REG4 por uma hora em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, imunodeteção foi realizada com imunoglobulina anticamundongo marcada com peroxidase (Envision kit, Dako Cytomation, carpinteria, CA). Finalmente, os reagentes foram desenvolvidos com 3,3'-diamino benzidina (Dako) e as células foram contramanchadas com hematoxilina.

Análises imuno – histoquímicas usando anticorpo policlonal para REG4 em uma outra série de tecidos de PDAC revelaram fortes sinais de

REG4 no citoplasma de células de câncer, enquanto células acinares em pâncreas mostraram fraco manchamento de REG4 (Figura 1B). Em adição, microarranjo – tecido com outras séries de 31 tecidos de PDAC feitos pontos mostraram que 15 de 31 PDACs expressaram altos níveis de REG4 (dados não mostrados). No total 35 de 64 PDACs (55%) mostraram manchamento positivo através de anticorpo anti-REG4 (dados não mostrados). Este resultado é consistente com aquele do estudo de RNA prévio de células micro – dissecadas.

[Exemplo 7] Sistema de ensaio ELISA

10 (1) Sistema ELISA sanduíche para avaliação de anticorpo

C8 MAXI NUNC-Immuno BreakApart Module (NUNC) foi usada como uma microplaca para o ELISA sanduíche. Anticorpos monoclonais anti-REG4 (clone 21-1, 24-1 e 34-1) foram diluídos com tampão carbonato a 0,1 M (pH 9,6) para 10 µg/mL, adicionados à microplaca em 50 µL/cavidade, então deixados em repouso por toda noite a 4°C para imobilizar cada anti-
15 corpo através de adsorção física. Após bloqueio com BAS/PBS a 1% (temperatura ambiente, duas horas), a solução de bloqueio foi descartada, e os resíduos foram secos ao ar para preparar uma placa de ensaio. Espécimes foram diluídos 5 vezes em tampão de reação (PBS, Tween 20 a 0,1%, BSA a 1%, pH 7,3), adicionados à placa de ensaio em 50 µL/cavidade, e reagidos em temperatura ambiente por uma hora. Após lavagem quatro vezes com
20 tampão de lavagem (Tween a 20 a 0,13%, NaCl a 0,15 M/NaH₂PO₄ a 10 mM), um anticorpo policlonal anti-REG4 marcado com HRP foi ajustado para 1,5 ug/mL com um diluente anticorpo marcado com enzima (BAS a 1%, NaCl a 0,135 M/HEPES a 20 mM) e adicionado em 50 µL/cavidade. Após reação em temperatura ambiente por uma hora, a placa foi lavada quatro vezes com
25 tampão de lavagem. Uma solução de substrato de enzima (Moss Inc.; TMB Ultra sensitive Substrate) foi adicionada em 50 µL/cavidade para coloração, e após 30 minutos, H₂SO₄ a 0,36 N foi adicionado em 50 µL/cavidade para
30 terminar a reação de cor. A absorbância (A₄₅₀/A₆₂₀) foi medida para calcular concentração de REG4 no soro baseado nas curvas de calibração de cada anticorpo (Figura 7).

Usando o sistema ELISA sanduíche acima, concentração de REG4 foi determinada em espécimes de 9 pacientes com câncer pancreático e 28 sujeitos saudáveis para avaliar o título de anticorpo de cada clone. A sensibilidade de detecção de clones 24-1 e 34-1 foi baixa como comparada a clone 21-1 (Figura 7), e REG4 nos espécimes de pacientes de câncer pancreático pode ser detectada somente em clone 21-1 (Figura 8). Em adição, concentração de REG4 em espécimes medidos pelo sistema ELISA sanduíche usando clone 21-1 mostrou um alto valor em pacientes de câncer pancreático comparado a sujeitos saudáveis, confirmando uma significativa diferença ($P < 0,05$) em concentrações de REG4 em espécimes de sujeitos saudáveis e pacientes de câncer pancreático (Figura 8).

Seqüências de aminoácidos das regiões variáveis e cada CDR em clone 21-1, e seqüências de nucleotídeos de DNAs codificando os mesmos são como se segue:

	Seqüência de nucleotídeos	Seqüência de aminoácidos
15	Cadeia pesada	SEQ ID Nº:15
	CDR1	SEQ ID Nº:17
	CDR2	SEQ ID Nº:19
	CDR3	SEQ ID Nº:21
20	Cadeia leve	SEQ ID Nº:23
	CDR1	SEQ ID Nº:25
	CDR2	SEQ ID Nº:27
	CDR3	SEQ ID Nº:29

Ainda, a cadeia pesada e cadeia leve foram verificadas terem seqüências sinais como mostrado em SEQ ID Nºs: 32 e 34, respectivamente. Seqüências de nucleotídeos de cDNA's codificando as regiões variáveis da cadeia pesada e cadeia leve, que compreendem seqüências sinais, são mostradas em SEQ ID Nºs: 31 e 33.

(2) Sistema ELISA sanduíche

30 Como uma microplaca para o sistema ELISA sanduíche, C8 MAXI NUNC-Immuno BreakApart Module (NUNC) foi usado. Um anticorpo monoclonal anti-REG4 (clone 21-1) foi diluído com tampão carbonato a 0,1

M (pH 9,6) para 10 µg/mL, adicionado à microplaca em 100 µL/cavidade, e deixado em repouso por toda noite a 4°C para sensibilizar o anticorpo através de adsorção física. Após bloqueio (temperatura ambiente, duas horas), a solução de bloqueio foi descartada, e os resíduos foram secos para preparação de uma placa de ensaio. Os soros de pacientes foram diluídos 5 vezes em um diluente espécime (PBS, Tween a 20 0,1%, BSA a 1%, pH 7,3) ao qual 0,5 µg/mL de anticorpo policlonal anti-PEG4 biotilado foi adicionado. Após reação por 15 minutos, os soros foram adicionados à placa de ensaio em 100 µL/cavidade e reagidos por duas horas. Após lavagem cinco vezes, streptavidina marcada com HRP diluída 8000 vezes (Amersham; RPN4401) foi adicionada em 100 µL/cavidade, reagida por uma hora, e então lavada cinco vezes. 100 µL/cavidade de solução de substrato TMB (MOSS Inc.; TMB Ultra Sensitive Substrate) foram adicionados para coloração. Após 15 minutos, 100 µL/cavidade de ácido sulfúrico a 0,18 M foram adicionados para terminar a reação de cor, e concentração de REG4 nos soros pré-operativos e pós-operativos obtidos de sete pacientes foi determinada usando a absorbância (A450/A620).

O sistema ELISA sanduíche acima foi ainda aperfeiçoado, e a concentração de REG4 nos soros de 59 pacientes com câncer pancreático, 35 pacientes com doença pancreática inflamatória, e 56 pacientes saudáveis, foi determinada através do seguinte sistema ELISA sanduíche. C8 MAXI NUNC-Immuno BreakApart Module (NUNC) foi usado como uma microplaca. Um anticorpo monoclonal anti-REG4 (clone 210-1) foi diluído com tampão carbonato a 0,1 M (pH 9,6) para 10 µg/mL, adicionado à microplaca em 50 µL/cavidade, e deixado em repouso por toda noite a 4°C para sensibilizar o anticorpo através de adsorção física. Após bloqueio com BSA/PBS a 1% (temperatura ambiente, duas horas), a solução de bloqueio foi descartada, e os resíduos foram secos para preparar um placa de ensaio. Os soros dos pacientes foram diluídos cinco vezes com um diluente espécime (PBS, Tween 20 a 0,1%, BSA a 1%, pH 7,3) ao qual 0,5 µg/mL de anticorpo policlonal anti-REG4 biotilado foi adicionado. Após reação por 15 minutos, os soros foram adicionados à placa de ensaio em 50 µL/cavidade e reagidos

por uma hora. Após lavagem quatro vezes com tampão de lavagem (Tween 20 a 0,13%, NaCl a 0,15 M/NaH₂PO₄ a 10 mM), um anticorpo policlonal específico – REG4 foi ajustado com o tampão de reação (o mesmo como acima) para 0,25 µg/mL, adicionado em 50 µL/cavidade, e reagido por uma hora em temperatura ambiente. Após lavagem quatro vezes com o tampão de lavagem, streptavidina marcada com HRP (Amersham; RPN4401) diluída 150 000 vezes com um diluente anticorpo marcado com enzima (BSA a 1%, NaCl a 0,135 M/HEPES a 20 mM) foi adicionado em 50 µL/cavidade, reagida em temperatura ambiente por uma hora, e então lavada quatro vezes com o tampão de lavagem. 50 µL/cavidade de solução substrato TMB (Moss Inc.; TMB Ultra Sensitive Substrate) foram adicionados e isto foi deixado em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos para coloração. 50 µL/cavidade de ácido sulfúrico a 0,36 N foram adicionados para terminar a reação de cor, e então a absorbância (A450/620) foi medida para determinar concentração de REG4 nos soros usando uma curva de calibração (Figura 5).

(3) Nível de REG4 em soro medido por ELISA

REG4 é uma proteína secretada. Os presentes inventores validaram que proteína REG4 foi secretada no meio de cultura de linhas de célula de câncer pancreático por imunoprecipitação usando anticorpos gerados pelos presentes inventores (dados não mostrados). De modo a medir nível de REG4 em soro de pacientes de câncer pancreático, os presentes inventores estabeleceram um sistema ELISA sanduíche usando anticorpo monoclonal de camundongo (clone 21-1), que revelou a afinidade mais forte para REG4 humana, e anticorpo policlonal de coelho para REG4 humana. As características de desempenho do ELISA sanduíche (curva-padrão) foram mostradas na Figura 2. Em adição, os presentes inventores estabeleceram o ELISA sanduíche modificado usando estes anticorpos. As características de desempenho do ELISA sanduíche modificado (curva-padrão) foram mostradas em Figura 5.

Para determinar a sensibilidade de REG4 elevada como um teste diagnóstico, os presentes inventores mediram REG4 de soro de 123 pessoas saudáveis e definiram um valor de corte de 9,0 ng/mL, um nível de 2

DPs acima de nível médio de REG4 nestes controles saudáveis (Figura 3).

Então os presentes inventores analisaram soro pré-operativo e pós-operativo de sete pacientes com adenocarcinoma pancreático operável (Figura 4). Quatro destes sete casos mostraram mais que 9,0 ng/mL de nível de REG4 em pré-operação (Caso 2, 3, 4, e 5) e níveis de REG4 destes quatro casos caíram para a faixa normal de nível de REG4 quatro semanas após a excisão de seus tumores. Estes resultados sugerem que REG4 em soro foi derivada dos tecidos de câncer pancreático e REG4 foi potencialmente um marcador de soro para cânceres pancreáticos. Os casos restantes mostraram menos que 9,0 ng/mL de REG4 ambos em pré-operação e pós-operação.

Além disso, os presentes inventores mediram REG4 em soro de 59 casos de câncer pancreático, 35 outros casos de doença pancreática, e 56 pessoas saudáveis normais usando ELISA sanduíche modificado. Houve uma significativa diferença entre os casos de câncer pancreático e pessoas saudáveis normais ($p < 0,01$), e entre os casos de câncer pancreático e os outros casos de doença pancreática ($p < 0,05$). Para determinar a sensibilidade de REG4 elevada como um teste diagnóstico, os presentes inventores definiram um valor de corte de 3,78 ng/mL, um nível 3 DPs acima do nível médio de REG4 nestes controles saudáveis. Como um resultado, 29 de 59 casos de câncer pancreático (49,2%), 10 de 35 outros casos de doença pancreática (28,6%), e 1 de 56 controles saudáveis normais (1,8%) foram julgados como positivos. Por outro lado, 45 de 59 casos de câncer pancreático (76,3%), 13 de 35 outros casos de doença pancreática (37,1%), e 5 de 56 controles saudáveis normais (8,9%) foram julgados como positivos pelo sistema ELISA para detecção de CA19-9 (valor de corte de 25 ng/mL) (CA19-9 EIA Kit; CanAg Diagnostics AB). Pelo menos uma das duas proteínas foi positiva em 52 de 59 casos de câncer pancreático (88,1%), 19 de 35 outros casos de doença pancreática (54,3%), e 6 de 56 casos saudáveis normais (10,7%) (Figura 6).

Aqui, os presentes inventores verificaram que aproximadamente metade de PDACs mostrou superexpressão de proteína REG4 e que REG4 em soro pode ser detectada em alguns pacientes com PDACs através de

sistema ELISA construído pelos presentes inventores. Na Tabela 2, os presentes inventores resumiram as características clínico – patológicas e níveis de soro pré-operativos de REG4, CA19-9, e CEA nos sete casos examinados pelos presentes inventores, e quatro destes sete casos mostram maior nível de REG4 em soro que controle saudável normal (mais que 9,0 ng/mL). Interessantemente, REG4 de soro estava em alto nível nos pacientes com câncer pancreático não-invasivo ou de estágio inicial (casos 3 e 4) e também em pacientes que sobreviveram mais (Casos 3, 4, e 5) sugerindo que pode haver mais potencial que REG4 de soro pode detectar nos pacientes PDAC que podem ser esperados terem câncer de estágio inicial ou bom prognóstico. CA19-9 em soro e CEA não encontram estes casos não-invasivos ou de estágio inicial e REG4 de soro pode ser um promissor marcador de soro para seleção de câncer pancreático.

Tabela 2 níveis de marcadores em soro e características clínico – patológicas

Caso	Idade	Localização	TNM	Está- gio	Histologia	REG4 ¹	CA19- ²⁾	CEA ³⁾	Prognós- tico ⁴⁾
1	56	Cabeça	T2N1M0	III	Adenoca tubular po- baramente diferenciado	6,2	84	1,3	14 M morte
2	64	Cabeça	T2N1M0	III	Adenoca tubular dife- renciado moderado	20,5	1945	12,1	9 M morte
3	69	Cabeça	T2N0M0	I	Adenoca tubular intra- ductal	24,7	24	4,2	14 M vivo
4	78	Cabeça	T1N0M0	I	Carcinoma mucinoso papilar intraductal	24,6	16	2,8	18 M vivo
5	56	Cabeça	T2N1M0	III	Adenoca tubular dife- renciado moderado	14,5	311	1,6	13 M vivo
6	68	Cauda	T2N0M0	I	Adenoca tubular dife- renciado moderado	8,0	5	1,0	8 M morte
7	70	Cabeça	T2N1M0	III	Adenoca tubular po- baramente diferenciado	2,5	17	4,6	3 M morte

15 ¹⁾ faixa normal < 9,0 ng/mL

²⁾ faixa normal < 36 U/mL

³⁾ faixa normal < 5,0 ng/mL, valor acima de faixa normal de cada marcador é sublinhado.

⁴⁾ M: mês

A sensibilidade e especificidade de REG4 de soro como marcador de tumor de PDACs devem ser determinadas através de análise de estudos de grandes números. Alguns estudos anteriores reportaram que expressão de REG4 em câncer colorretal (Violette S, et al., (2003) Int J Cancer; 103(2):185-93), câncer gástrico (Oue N, et al., (2005) Cancer Res.; 64(7):2397-405) e doenças inflamatórias de intestino (Hartupee JC, et al., (2004) Biochim Biophys Acta; 1518(3):287-93), e ainda estudos são requeridos para examinar se REG4 em soro pode distinguir câncer pancreático destas doenças. Em adição, pancreatite crônica é uma das doenças benignas a serem distinguidas de PDACs pelos presentes inventores. Considerando que família REG é provável de estar associada com regeneração de tecido, os presentes inventores também precisam analisar o soro de pacientes com pancreatite crônica. Entretanto, cânceres pancreáticos, especialmente PDACs de estágio inicial, são extremamente difíceis de detectar, enquanto outras lesões gástricas ou de intestino que podem ser associadas com alto nível de REG4 em soro são facilmente detectadas através de exame endoscópico, e mesmo se REG4 em soro é elevada nestas doenças digestivas, medição de REG4 em soro é pensada ser valiosa para selecionar cânceres pancreáticos. Como outros marcadores de tumor, REG4 em soro pode não ter habilidade suficiente para detectar todos os casos de PDACs ou para distinguir PDACs de outras doenças, mas combinação de REG4 de soro com outros marcadores de tumor como CA19-9 ou formação de imagem diagnóstica nos provê habilidade promissora para abordagem para detecção de lesões precursoras ou de estágio inicial de PDACs e seleção destas doenças mais eficientemente.

Aplicabilidade Industrial

A presente invenção envolve a verificação de que níveis de REG4 são elevados nos soros de pacientes de câncer pancreático comparado com controles normais. Da mesma maneira, a proteína REG4 tem utili-

dade como um marcador diagnóstico (isto é, soro). Usando o nível de REG4 como um índice, a presente invenção provê métodos para diagnóstico, e monitoramento de progresso de tratamento de câncer, de pacientes de câncer. A técnica anterior falha para prover um apropriado marcador sorológico para câncer pancreático. Novo marcador sorológico REG4 da presente invenção pode aperfeiçoar a sensibilidade para detecção de câncer pancreático. Em adição, a combinação de REG4 e CA19-9 contribui para aumentar a sensibilidade para detecção de câncer pancreático.

Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhes e com referência a suas específicas modalidades, será aparente para aqueles versados na técnica que várias mudanças e modificações podem ser feitas ali sem se fugir do espírito e escopo da invenção.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado como comumente entendido por aqueles versados na técnica à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, apropriados métodos e materiais são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outra referências aqui mencionadas são incorporadas por referência em sua totalidade. Em caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo definições, controlará. Em adição, os materiais, métodos e exemplos são somente ilustrativos e não pretendidos serem limitantes.

A invenção foi ilustrada por referência a exemplos específicos e modalidades preferidas. Deve ser entendido que a invenção é pretendida não ser limitada pela descrição anterior, mas ser definida pelas reivindicações apostas e seus equivalentes.

<400> 3
 ccaattgcta tggttacttc agg 23
 <210> 4
 <211> 23
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR
 <400> 4
 10 gaaaaacaag caggagttga gtg 23
 <210> 5
 <211> 41
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR
 <400> 5
 ttaattaact cgagggatcc cccttcgaac aaaaactcat c 41
 <210> 6
 20 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR
 25 <400> 6
 ggcgagaaag gaaggaag 19
 <210> 7
 <211> 29
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR

<400> 7
 atcagatcta tggtagca gggcgagga 29
 <210> 8
 <211> 26
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR
 <400> 8
 10 atcttacttg tacagctcgt ccatgc 26
 <210> 9
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial
 15 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR
 <400> 9
 aatagatc cgcccctctc cctcccc 27
 <210> 10
 20 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para RT-PCR
 25 <400> 10
 aataggatcc ggcaccgggc ttgcg 25
 <210> 11
 <211> 33
 <212> DNA
 30 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para PCR

<400> 11
 aatattaatt aaggaagatg gcttccagaa gca 33
 <210> 12
 <211> 30
 5 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220>
 <223> Um iniciador artificialmente sintetizado para PCR
 <400> 12
 10 aataggatcc tggtcggtac ttgcacagga 30
 <210> 13
 <211> 1518
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 15 <220>
 <221> CDS
 <222> (441)..(917)
 <400> 13
 ataagacttt tatggatgga ttgttttct caaataatat tatcgcttag tgactaaagt 60
 20 aaagattatt aattcctgag gcaagaagat ataaaagctc cagaaacggt gactgggacc 120
 actggagaca ctgaagaagg caggggccct tagagtcttg gttgccaaac agaatgccca 180
 tatccgtctt acctgtgagg aagcttgccct tggggccct ctgctggccc tctgaagct 240
 aacaggggcg agtgctcggt ggtttcaaaa ttgcctccat gcagactatg aaactgttca 300
 gctgctata gttagatctc tggcactggc ccaggaggtc ttgcagattt gcagatcaag 360
 25 gagaaccag gagtttcaaa gaagcgctag taaggctctt gagatccttg cactagctac 420
 atcctcaggg taggaggaag atg gct tcc aga agc atg cgg ctg ctc cta ttg 473
 Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu
 1 5 10
 ctg agc tgc ctg gcc aaa aca gga gtc ctg ggt gat atc atc atg aga 521
 30 Leu Ser Cys Leu Ala Lys Thr Gly Val Leu Gly Asp Ile Ile Met Arg
 15 20 25
 ccc agc tgt gct cct gga tgg ttt tac cac aag tcc aat tgc tat ggt 569

Pro Ser Cys Ala Pro Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly
 30 35 40
 tac ttc agg aag ctg agg aac tgg tct gat gcc gag ctc gag tgt cag 617
 Tyr Phe Arg Lys Leu Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Leu Glu Cys Gln
 5 45 50 55
 tct tac gga aac gga gcc cac ctg gca tct atc ctg agt tta aag gaa 665
 Ser Tyr Gly Asn Gly Ala His Leu Ala Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu
 60 65 70 75
 gcc agc acc ata gca gag tac ata agt ggc tat cag aga agc cag ccg 713
 10 Ala Ser Thr Ile Ala Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Gln Arg Ser Gln Pro
 80 85 90
 ata tgg att ggc ctg cac gac cca cag aag agg cag cag tgg cag tgg 761
 Ile Trp Ile Gly Leu His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp
 95 100 105
 15 att gat ggg gcc atg tat ctg tac aga tcc tgg tct ggc aag tcc atg 809
 Ile Asp Gly Ala Met Tyr Leu Tyr Arg Ser Trp Ser Gly Lys Ser Met
 110 115 120
 ggt ggg aac aag cac tgt gct gag atg agc tcc aat aac aac ttt tta 857
 Gly Gly Asn Lys His Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn Asn Asn Phe Leu
 20 125 130 135
 act tgg agc agc aac gaa tgc aac aag cgc caa cac ttc ctg tgc aag 905
 Thr Trp Ser Ser Asn Glu Cys Asn Lys Arg Gln His Phe Leu Cys Lys
 140 145 150 155
 tac cga cca tag agcaagaatc aagattctgc taactcctgc acagccccgt 957
 25 Tyr Arg Pro
 cctcttcctt tctgctagcc tggctaaatc tgctcattat ttcagagggg aaacctagca 1017
 aactaagagt gataagggcc ctactacact ggctttttta ggcttagaga cagaaacttt 1077
 agcattggcc cagtagtggc ttctagctct aaatgtttgc cccgccatcc ctttccacag 1137
 tatccttctt cctcctccc ctgtctctgg ctgtctcgag cagtctagaa gagtgcattc 1197
 30 ccagcctatg aacagctgg gtctttggcc ataagaagta aagatttgaa gacagaagga 1257
 agaaactcag gagtaagctt ctagccccct tcagcttcta cacccttctg cctctctccc 1317
 attgcctgca cccacccca gccactcaac tctgtctgtg ttttcctttg gccatgggaa 1377

ggtttaccag tagaatcctt gctagggtga tgtgggcat acattccttt aataaacctat 1437
 tgtgtacata agagggttgc gtgttccagt tcagtaatgg tgaatgtgga aaagtgaat 1497
 aagaccaaga aatacaccca g 1518
 <210> 14
 5 <211> 158
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14
 Met Ala Ser Arg Ser Met Arg Leu Leu Leu Leu Leu Ser Cys Leu Ala
 10 1 5 10 15
 Lys Thr Gly Val Leu Gly Asp Ile Ile Met Arg Pro Ser Cys Ala Pro
 20 25 30
 Gly Trp Phe Tyr His Lys Ser Asn Cys Tyr Gly Tyr Phe Arg Lys Leu
 35 40 45
 15 Arg Asn Trp Ser Asp Ala Glu Leu Glu Cys Gln Ser Tyr Gly Asn Gly
 50 55 60
 Ala His Leu Ala Ser Ile Leu Ser Leu Lys Glu Ala Ser Thr Ile Ala
 65 70 75 80
 Glu Tyr Ile Ser Gly Tyr Gln Arg Ser Gln Pro Ile Trp Ile Gly Leu
 20 85 90 95
 His Asp Pro Gln Lys Arg Gln Gln Trp Gln Trp Ile Asp Gly Ala Met
 100 105 110
 Tyr Leu Tyr Arg Ser Trp Ser Gly Lys Ser Met Gly Gly Asn Lys His
 115 120 125
 25 Cys Ala Glu Met Ser Ser Asn Asn Asn Phe Leu Thr Trp Ser Ser Asn
 130 135 140
 Glu Cys Asn Lys Arg Gln His Phe Leu Cys Lys Tyr Arg Pro
 145 150 155
 <210> 15
 30 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Uma seqüência nucleotídica de VH do anticorpo anti-REG4 de camundongo.

<400> 15

5 gaggttcagc tccagcagtc tgggactgtg ctggcaaggc ctggggcttc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttacc agctactgga tgcactgggt aaaacagagg 120
 cctggacagg gtctggaatg gattggcgct atttactctg gaaatagtga tactagctac 180
 aaccagaagt tcaagggcaa ggccaaactg actgcagtca catccaccag cactgcctac 240
 atggagctca gcagcctgac aaatgaggac tctgcggctt attactgtac aggcccatct 300
 10 ctactgggat ttgcttactg gggccaaggg actctgggtca ctgtctctgc a 351

<210> 16

<211> 117

<212> PRT

<213> Mus musculus

15 <220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Uma seqüência de aminoácido de VH do anticorpo anti-REG4 do camundongo.

<400> 16

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

Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 17

<211> 15

5 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Uma seqüência nucleotídica de VH CDR1 do anticorpo anti-REG4 de camun-
dongo.

<400> 17

agctactgga tgcac

15

<210> 18

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

20 <223> Uma seqüência de aminoácido de VH CDR1 do anticorpo anti-REG4 de ca-
mundongo.

<400> 18

Ser Tyr Trp Met His

1

5

<210> 19

25 <211> 14

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

30 <223> Uma seqüência nucleotídica de VH CDR2 do anticorpo anti-REG4 de ca-
mundongo.

<400> 19

gatactagct acaa 14

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

5 <213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Uma seqüência de aminoácido de VH CDR2 do anticorpo anti-REG4 de ca-
mundongo.

10 <400> 20

Asp Thr Ser Tyr Asn

1 5

<210> 21

<211> 23

15 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Uma seqüência nucleotídica de VH CDR3 do anticorpo anti-REG4 de ca-
mundongo.

20 <400> 21

ccatctctac tgggatttgc tta 23

<210> 22

<211> 8

25 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Uma seqüência de aminoácido de VH CDR3 do anticorpo anti-REG4 de ca-
mundongo.

30 <400> 22

Pro Ser Leu Leu Gly Phe Ala Tyr

1 5

<210> 23

<211> 312

5 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Uma seqüência nucleotídica de VL do anticorpo anti-REG4 de camundon-
go.

10

<400> 23

gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggatca acagaaacca 120

ggacaatctc ctaaactact gatttactcg gcatcctacc ggtacactgg agtccctgat 180

15 cgcttcactg gcagtggatc tgggacggat ttcactttca ccatcagcag tgtgcaggct 240

gaagacctgg cagtttatta ctgtcagcaa cattatagta ctctcggac gttcgggtgga 300

ggcaccaagc tg 312

<210> 24

<211> 104

20 <212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Uma seqüência de aminoácido de VL do anticorpo anti-REG4 de camundon-
go.

25

<400> 24

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala

30

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65

70

75

80

5 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg

85

90

95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

100

<210> 25

10 <211> 33

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

15 <223> Uma seqüência nucleotídica de VL CDR1 de anticorpo anti-REG4 de camundongo.

<400> 25

aaggccagtc aggatgtgag tactgctgta gcc

33

<210> 26

20 <211> 11

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

25 <223> Uma seqüência de aminoácido de VL CDR1 de anticorpo anti-REG4 de camundongo.

<400> 26

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1

5

10

30 <210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus musculus
 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Uma seqüência nucleotídica de VL CDR2 de anticorpo anti-REG4 de ca-
 5 mundongo.
 <400> 27
 tcggcatcct accggtacac t 21
 <210> 28
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <223> Uma seqüência de aminoácido de VL CDR2 de anticorpo anti-REG4 de
 15 camundongo.
 <400> 28
 Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
 1 5
 <210> 29
 20 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <220>
 <221> misc_feature
 25 <223> Uma seqüência nucleotídica de VL CDR3 de anticorpo anti-REG4 de ca-
 mundongo.
 <400> 29
 cagcaacatt atagtactcc tcgg 24
 <210> 30
 30 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Uma seqüência de aminoácido de VL CDR3 de anticorpo anti-REG4 de camundongo.

5 <400> 30

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg

1 5

<210> 31

<211> 408

10 <212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> misc_feature

<223> Uma seqüência nucleotídica de VH de anticorpo anti-REG4 de camundongo com seqüência sinal.

15 <220>

<221> CDS

<222> (1)..(408)

<222> (1)..(408)

<220>

20 <221> sig_peptide

<222> (1)..(57)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(408)

25 <400> 31

atg gaa tgt aac tgg ata ctt cct ttt att ctg tgc gta act tca ggg 48

Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly

-15

-10

-5

gtc tac tca gag gtt cag ctc cag cag tct ggg act gtg ctg gca agg 96

30 Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg

-1 1

5

10

cct ggg gct tca gtg aag atg tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttt 144

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25
 acc agc tac tgg atg cac tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg 192
 Thr Ser Tyr Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 5 30 35 40 45
 gaa tgg att ggc gct att tat cct gga aat agt gat act agc tac aac 240
 Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn
 50 55 60
 cag aag ttc aag ggc aag gcc aaa ctg act gca gtc aca tcc acc agc 288
 10 Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Thr Ser
 65 70 75
 act gcc tac atg gag ctc agc agc ctg aca aat gag gac tct gcg gtc 336
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Asn Glu Asp Ser Ala Val
 80 85 90
 15 tat tac tgt aca ggc cca tct cta ctg gga ttt gct tac tgg ggc caa 384
 Tyr Tyr Cys Thr Gly Pro Ser Leu Leu Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
 95 100 105
 ggg act ctg gtc act gtc tct gca 408
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 20 110 115
 <210> 32
 <211> 136
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 25 <400> 32
 Met Glu Cys Asn Trp Ile Leu Pro Phe Ile Leu Ser Val Thr Ser Gly
 -15 -10 -5
 Val Tyr Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Thr Val Leu Ala Arg
 -1 1 5 10
 30 Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 15 20 25

-20 -15 -10

ctc tgg ttg tct ggt gtt gac gga gac att gtg atg acc cag tct cac 96
 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His

-5 -1 1 5

5 aaa ttc atg tcc aca tca gta gga gac agg gtc agc atc acc tgc aag 144
 Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys

10 15 20

gcc agt cag gat gtg agt act gct gta gcc tgg tat caa cag aaa cca 192
 Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro

10 25 30 35 40

gga caa tct cct aaa cta ctg att tac tcg gca tcc tac cgg tac act 240
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

45 50 55

gga gtc cct gat cgc ttc act ggc agt gga tct ggg acg gat ttc act 288

15 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

60 65 70

ttc acc atc agc agt gtg cag gct gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt 336
 Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys

75 80 85

20 cag caa cat tat agt act cct cgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg 384
 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

90 95 100

<210> 34
 <211> 128

25 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 34

Met Gly Ile Lys Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe

-20 -15 -10

30 Leu Trp Leu Ser Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His

-5 -1 1 5

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

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para diagnóstico de câncer pancreático em um sujeito, compreendendo as etapas de:

5 (a) provimento de uma amostra de sangue de um sujeito a ser diagnosticado;

(b) determinação de nível de REG4 na amostra de sangue;

(c) comparação de nível de REG4 determinado na etapa (b) com aquele de um controle normal, em que um alto nível de REG4 na amostra de sangue, comparado ao controle normal, indica que o sujeito sofre de câncer pancreático.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que a amostra de sangue é selecionada do grupo consistindo em sangue integral, soro, e plasma.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, em que o nível de REG4 é determinado através de detecção de proteína REG4 na amostra de sangue.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, em que a proteína REG4 é detectada através de imunensaio.

5. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que o imunensaio é um ELISA.

6. Processo de acordo com a reivindicação 4, em que o imunensaio é processo sanduíche que usa um anticorpo monoclonal anti-REG4 imobilizado sobre um veículo.

7. Processo de acordo com a reivindicação 6, em que o anticorpo monoclonal compreende uma cadeia VH e VL, cada cadeia VH e VL compreendendo seqüências de aminoácido CDR designadas CDR1, CDR2 e CDR3 separadas por seqüências de aminoácidos de estrutura, a seqüência de aminoácido de cada CDR em cada cadeia VH e VL é selecionada do grupo consistindo em:

30 VH CDR1: SEQ ID N^o: 18

VH CDR2: SEQ ID N^o: 20

VH CDR3: SEQ ID N^o: 22

VL CDR1: SEQ ID Nº: 26

VL CDR2: SEQ ID Nº: 28 e

VL CDR3: SEQ ID Nº: 30,

ou um fragmento compreendendo sua região de ligação de antígeno.

5 8. Processo de acordo com a reivindicação 7, em que a VH compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 16, e VL compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 24.

 9. Processo de acordo com a reivindicação 1, ainda compreendendo as etapas de:

10 (e) determinação de um nível de CA19-9 na amostra de sangue;
 (f) comparação de nível de CA19-9 determinado na etapa (e) com aquele de um controle normal, em que qualquer um ou ambos os altos níveis de REG4 e CA19-9 na amostra de sangue, comparados ao controle normal, indicam que o sujeito sofre de câncer pancreático.

15 10. Reagente de imunoensaio para detecção de REG4 em uma amostra de sangue, em que o reagente compreende um anticorpo anti-REG4.

 11. Reagente de acordo com a reivindicação 10, em que o anticorpo monoclonal está imobilizado sobre um veículo.

20 12. Reagente de acordo com a reivindicação 11, em que o anticorpo anti-REG4 compreende um anticorpo monoclonal que compreende uma cadeia VH e VL, cada cadeia VH e VL compreendendo seqüências de aminoácidos CDR designadas CDR1, CDR2 e CDR3 separadas por seqüências de aminoácidos de estrutura, a seqüência de aminoácidos de cada
25 CDR em cada cadeia VH e VL é selecionada do grupo consistindo em:

VH CDR1: SEQ ID Nº: 18

VH CDR2: SEQ ID Nº: 20

VH CDR3: SEQ ID Nº: 22

VL CDR1: SEQ ID Nº: 26

30 VL CDR2: SEQ ID Nº: 28 e

VL CDR3: SEQ ID Nº: 30,

ou um fragmento compreendendo sua região de ligação de antígeno.

13. Reagente de acordo com a reivindicação 12, em que a VH compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 16, e VL compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 24.

5 14. Kit para detecção de um câncer pancreático, em que o kit compreende:

(i) um reagente de imunoenensaio para determinação de um nível de REG4 em uma amostra de sangue; e

(ii) uma amostra controle positivo para REG4.

10 15. Kit de acordo com a reivindicação 14, que ainda compreende:

(iii) um reagente de imunoenensaio para determinação de um nível de CA19-9 em uma amostra de sangue; e

(iv) uma amostra controle positivo para CA19-9.

15 16. Kit de acordo com a reivindicação 15, em que a amostra de controle positivo é positiva para ambas as REG4 e CA19-9.

17. Kit de acordo com a reivindicação 16, em que a amostra de controle positivo está em forma líquida.

20 18. Amostra de sangue de controle positivo para detecção de um câncer pancreático, em que a amostra de sangue compreende mais que nível normal de ambas as REG4 e CA19-9.

25 19. Anticorpo monoclonal anti-REG4 que compreende uma cadeia VH e VL, cada cadeia VH e VL compreendendo seqüências de aminoácidos designadas CDR1, CDR2 e CDR3 separadas por seqüências de aminoácidos de estrutura, a seqüência de aminoácidos de cada CDR em cada cadeia VH e VL é selecionada do grupo consistindo em:

VH CDR1: SEQ ID Nº: 18

VH CDR2: SEQ ID Nº: 20

VH CDR3: SEQ ID Nº: 22

VL CDR1: SEQ ID Nº: 26

30 VL CDR2: SEQ ID Nº: 28 e

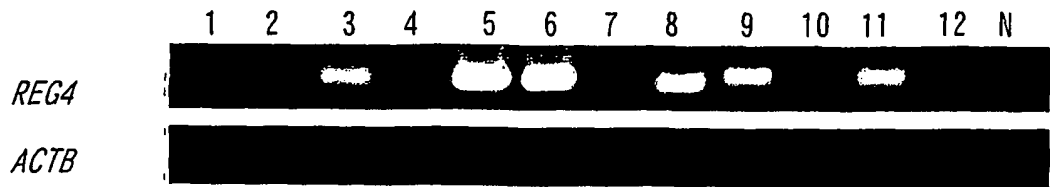
VL CDR3: SEQ ID Nº: 30,

ou um fragmento compreendendo sua região de ligação de antígeno.

20. Anticorpo monoclonal de acordo com a reivindicação 19, em que a VH compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 16, e VL compreende a seqüência de aminoácidos de SEQ ID Nº: 24.

FIG. 1

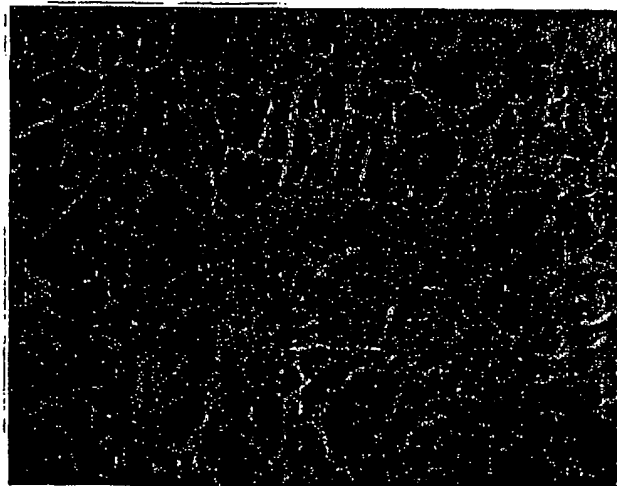
(A)



(B)



câncer



pâncreas normal

FIG. 2

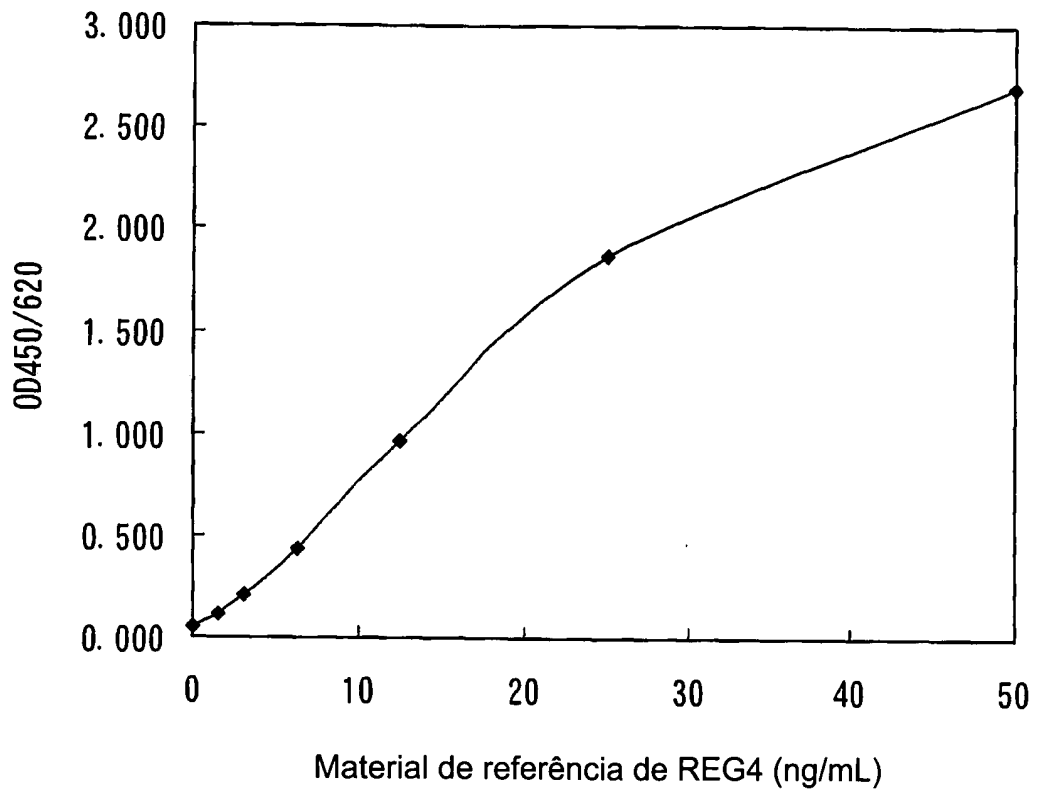


FIG. 3

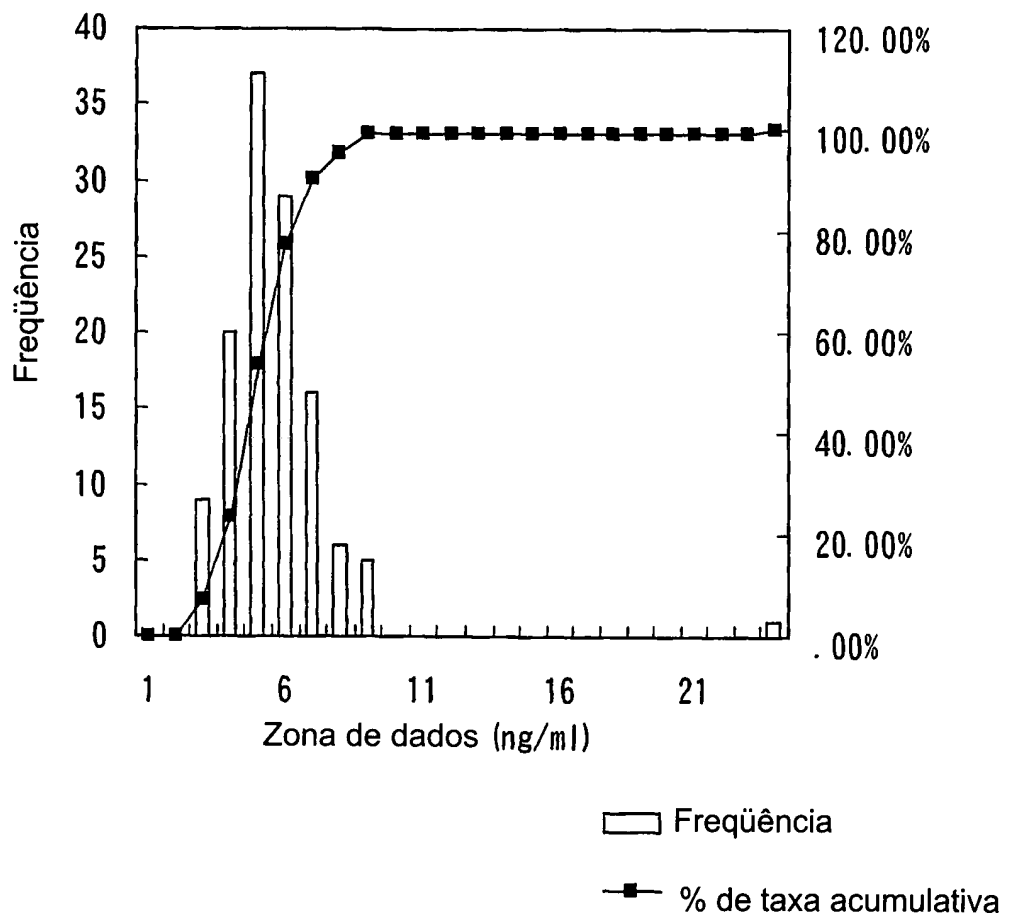


FIG. 4

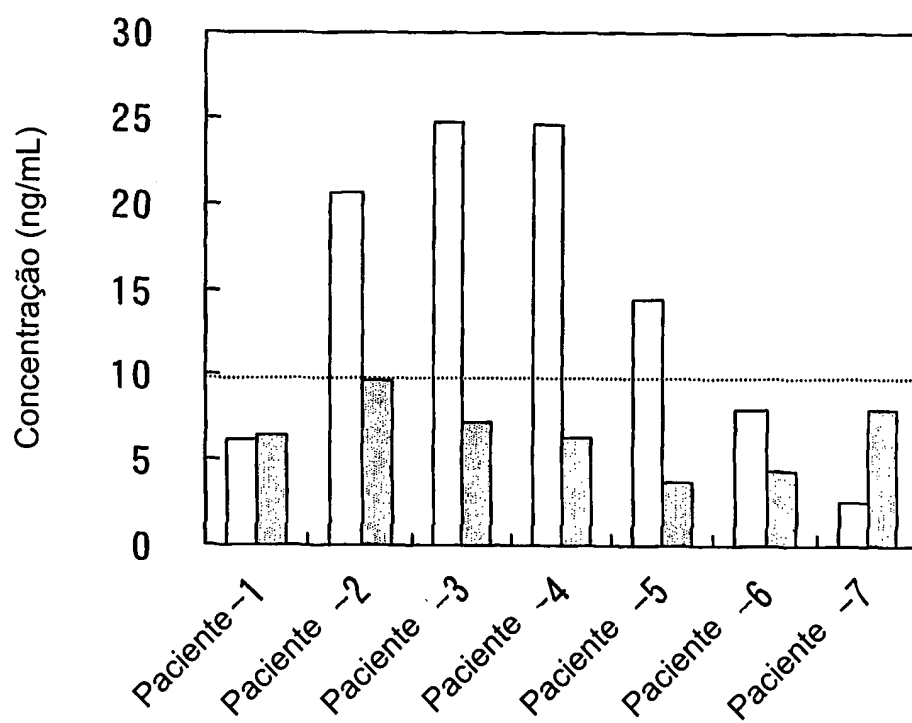


FIG. 5

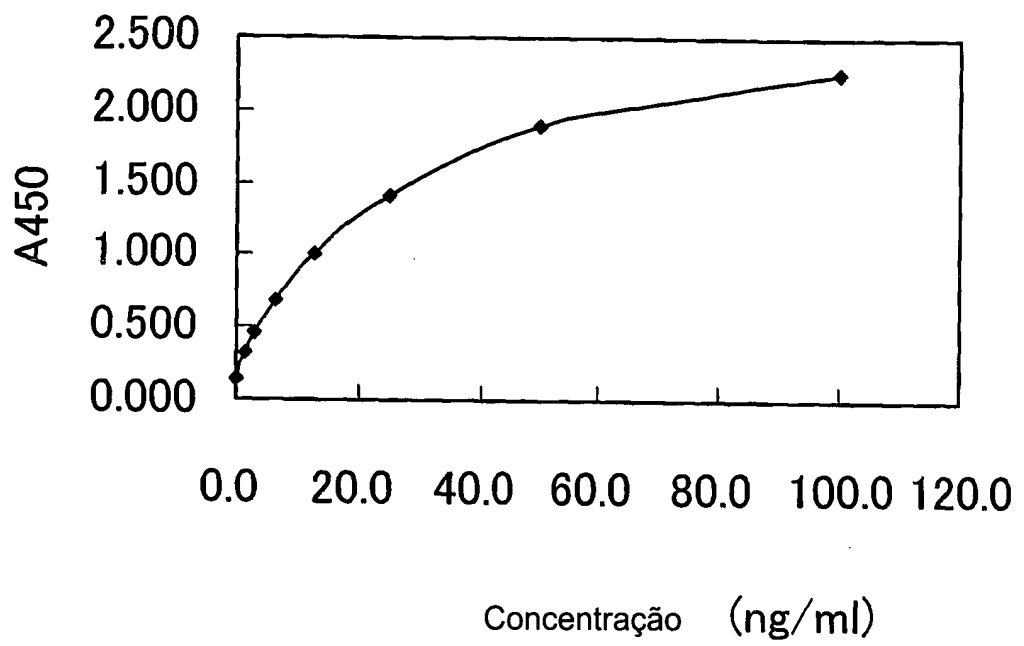


FIG. 6

(A)

		CA19-9		
		+	-	
REG4	+	22	7	29
	-	23	7	30
		45	14	59

	Taxa positiva
REG4	49.2%
CA19-9	76.3%
REG4 + CA19-9	88.1%

(B)

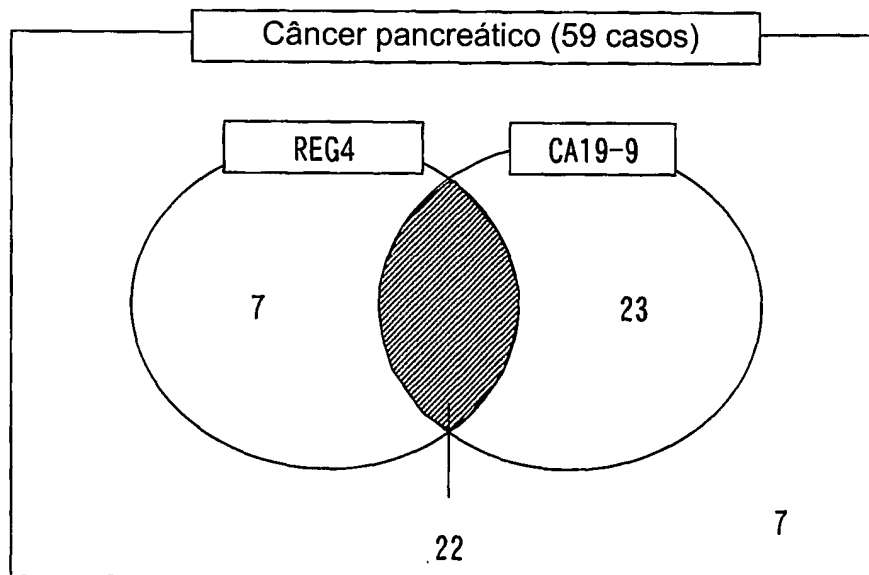
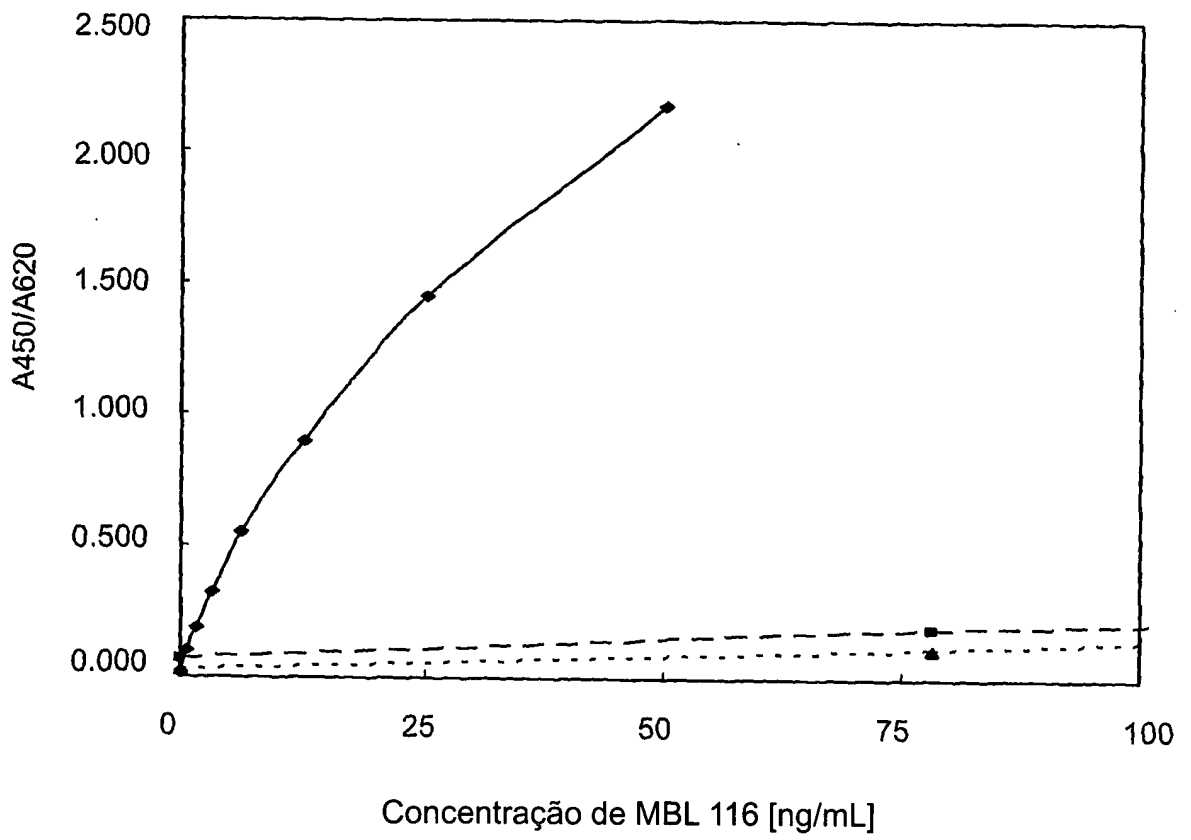


FIG. 7

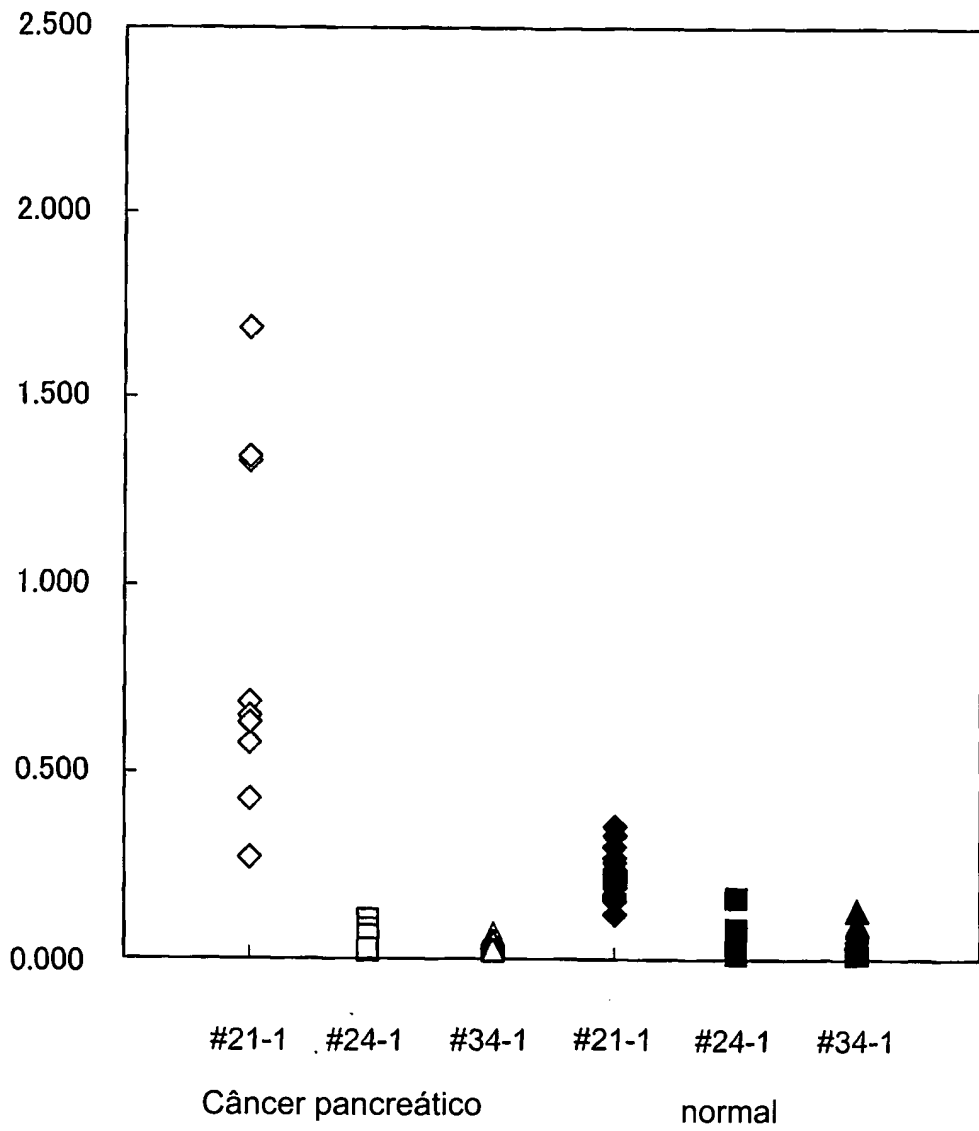


* 21-1 —◆—

* 24-1 -■-

* 34-1 ...▲...

FIG. 8



RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA DIAGNÓSTICO DE CÂNCER PANCREÁTICO USANDO PROTEÍNA REG4"**.

5 A presente invenção refere-se a REG4, um novo membro da família REG que foi identificada como um biomarcador de adenocarcinoma pancreático. A presente invenção provê sanduíche ELISA para detectar REG4 de soro em pacientes com cânceres pancreáticos excisáveis, isto é, PDACs. A presente invenção também provê um processo para diagnóstico de câncer pancreático usando REG4 como um marcador sorológico.

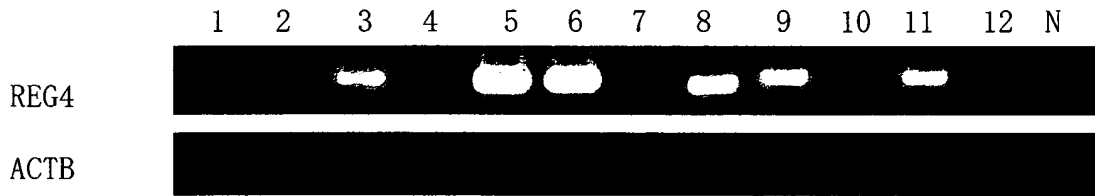
10 Este pedido de patente reivindica o benefício de pedido de patente provisório U.S. 60/779 161 depositado em 2 de março de 2006, os conteúdos do qual são aqui incorporados por referência em sua totalidade.

02008 0134 238
23/10/08

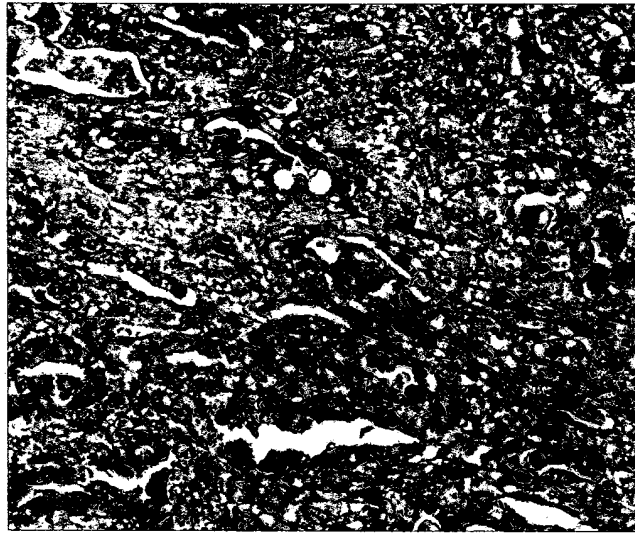
1/8

FIG. 1

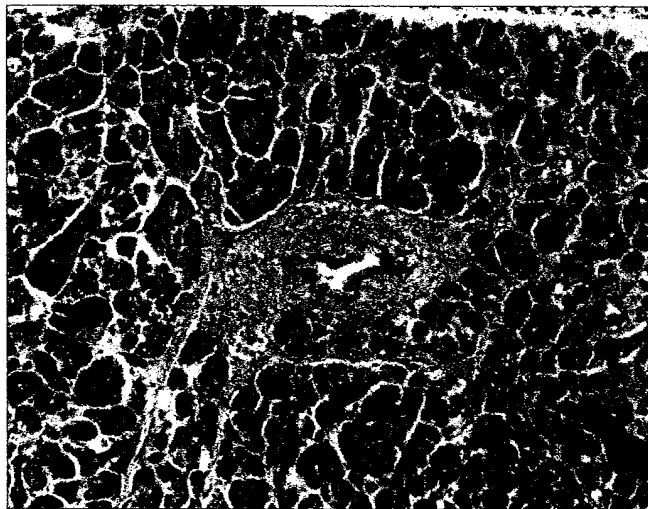
(A)



(B)



câncer



pâncreas normal

FIG. 2

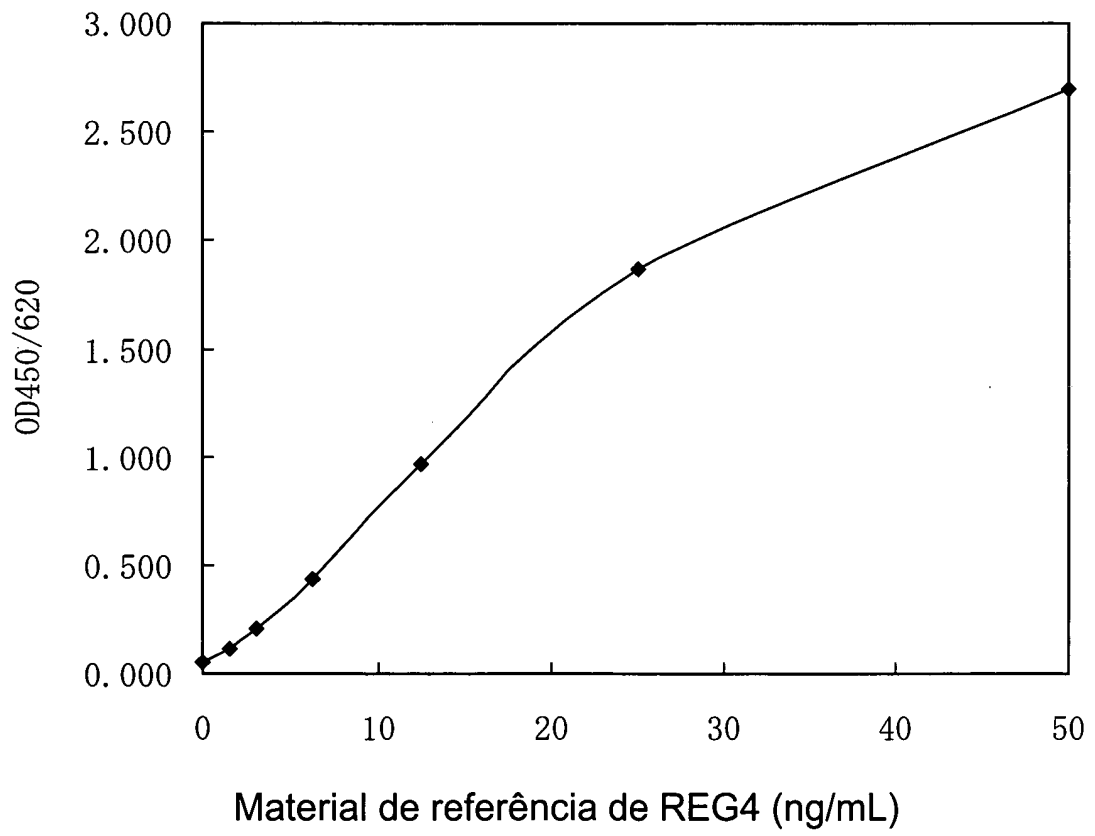


FIG. 3

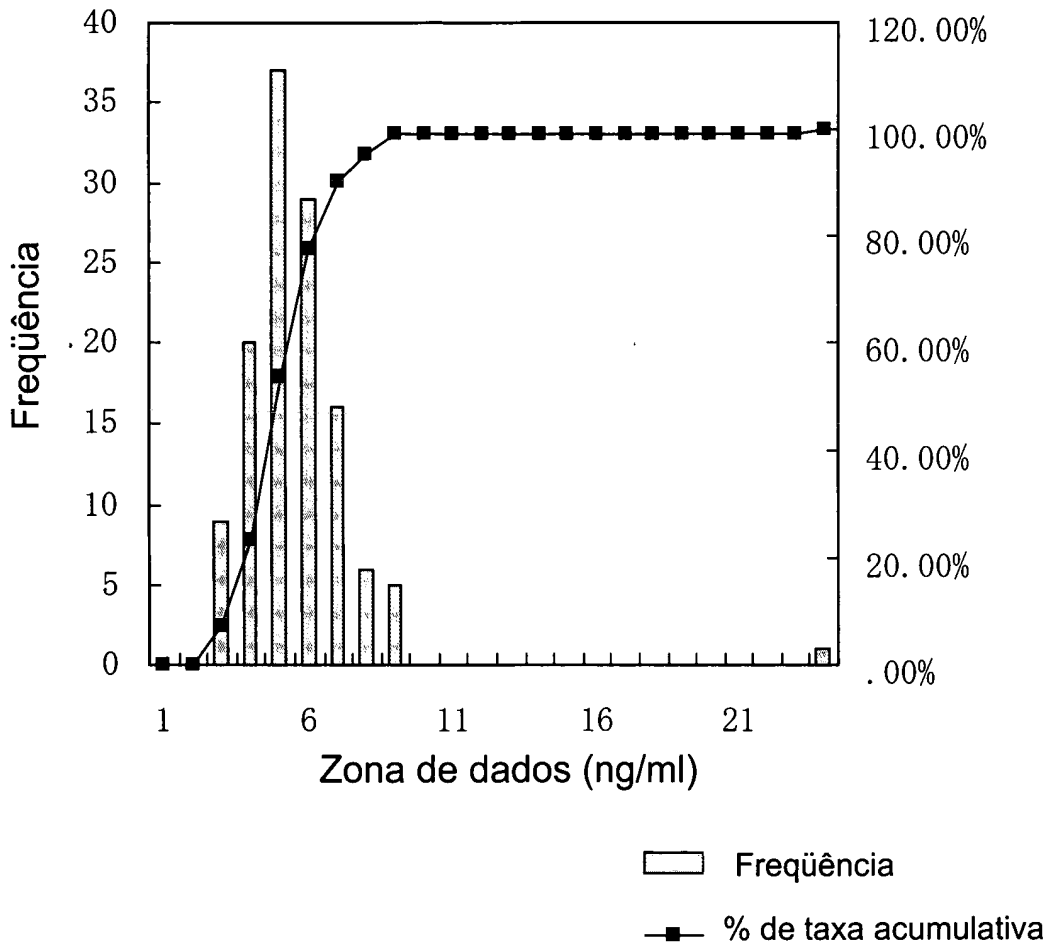


FIG. 4

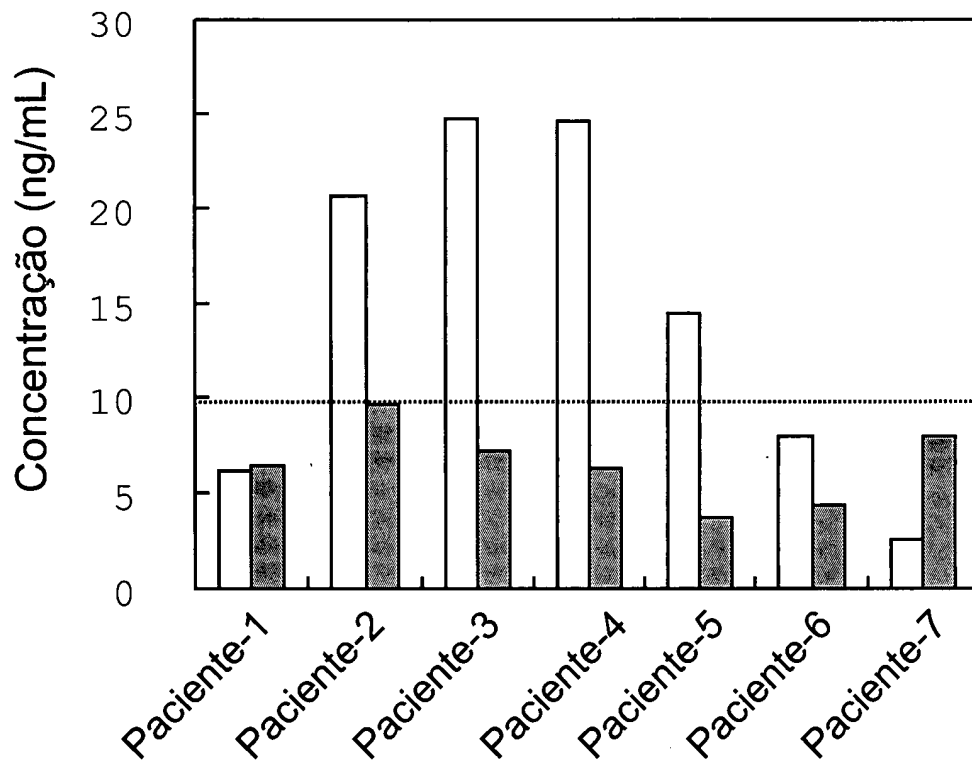


FIG. 5

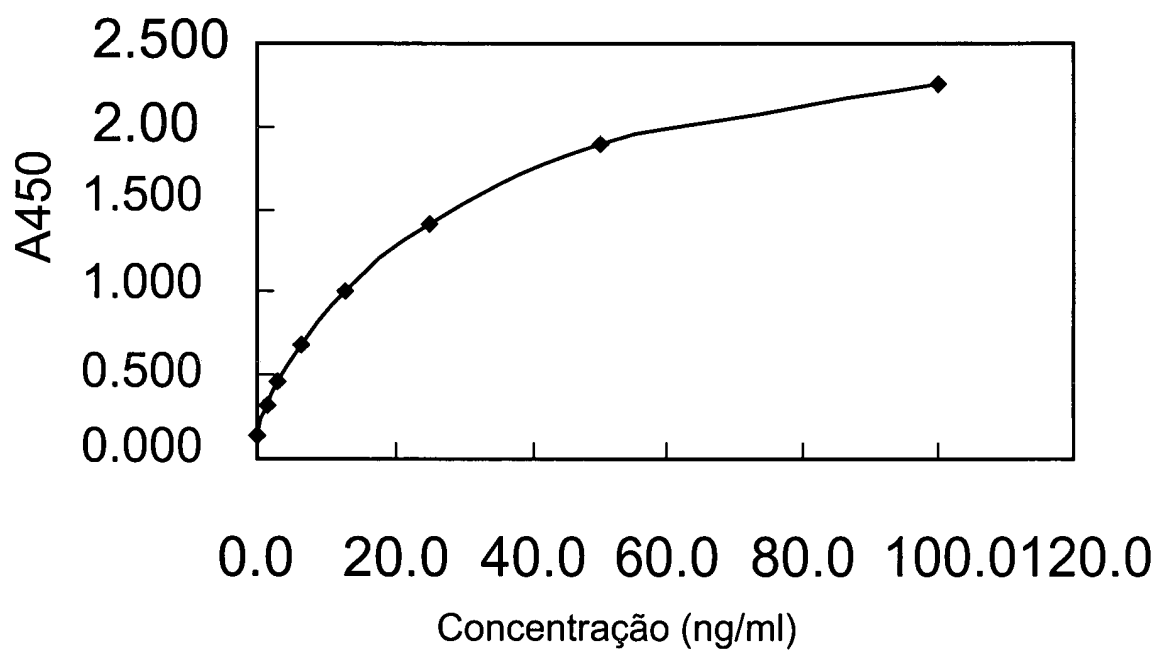


FIG. 6

(A)

		CA19-9		
		+	-	
REG4	+	22	7	29
	-	23	7	30
		45	14	59

	Taxa positiva
REG4	49.2%
CA19-9	76.3%
REG4 + CA19-9	88.1%

(B)

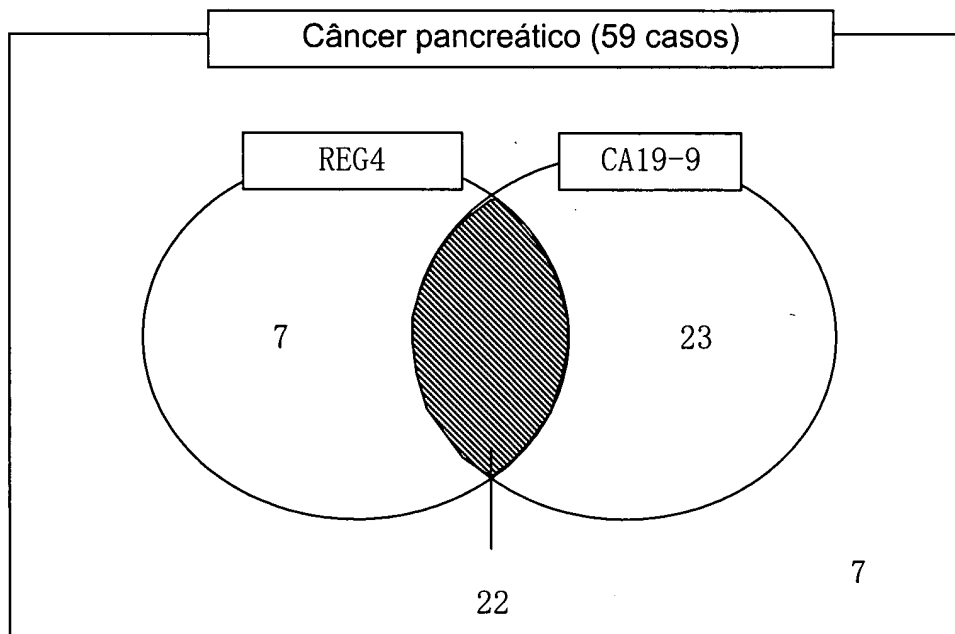
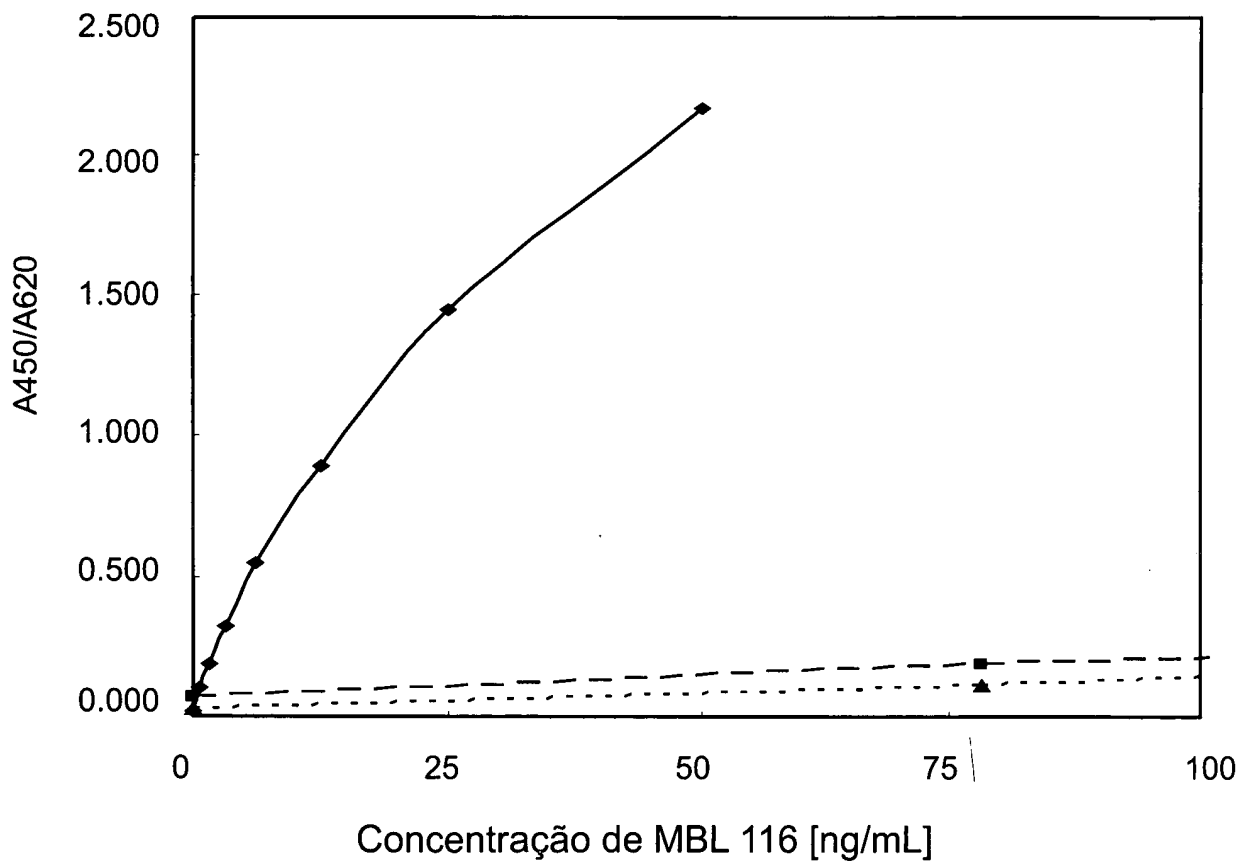


FIG. 7



*-21-1 —◆—
*-24-1 - -■- - -
*-34-1▲.....

FIG. 8

