



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

(11) PI 0912462-4 B1



* B R P I 0 9 1 2 4 6 2 B 1 *

(22) Data do Depósito: 05/08/2009

(45) Data de Concessão: 22/03/2022

(54) Título: USO DE UM AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE, USO DE UM POLIPEPTÍDEO E USO DE UM VETOR RECOMBINANTE

(51) Int.Cl.: A61K 38/00; A61K 48/00; A61P 35/00; A61P 37/04; C07K 14/47; (...).

(30) Prioridade Unionista: 05/08/2008 JP 2008-202065.

(73) Titular(es): TORAY INDUSTRIES, INC..

(72) Inventor(es): FUMIYOSHI OKANO; MASAKI SHIMIZU; TAKANORI SAITO.

(86) Pedido PCT: PCT JP2009063881 de 05/08/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/016525 de 11/02/2010

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

(57) Resumo: AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE, CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO ISOLADA, CÉLULA T ISOLADA, USO DE UM AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE, USO DE PELO MENOS UM POLIPEPTÍDEO E USO DE UM VETOR RECOMBINANTE. A invenção se refere a um agente indutor de imunidade compreendendo, como ingrediente ativo, pelo menos um polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade que é selecionado dentre os polipeptídeos (a), (b), e (c): (a) é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos representada por um número par dentre as SEQ ID NOS: 2 a 30 da Listagem de Sequência; (b) é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos que possui identidade de sequência de 90% em relação ao polipeptídeo (a); e (c) é um polipeptídeo que compreende o polipeptídeo (a) ou (b) como sequência parcial do mesmo, ou um vetor recombinante que compreende um polinucleotídeo que codifica o referido polipeptídeo e é capaz de expressar o referido polipeptídeo in vivo.

**“USO DE UM AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE, USO DE UM
POLIPEPTÍDEO E USO DE UM VETOR RECOMBINANTE”**

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção se relaciona a um novo agente indutor de imunidade que é útil como agente terapêutico e/ou preventivo no câncer e semelhantes.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[002] O câncer é a principal causa de óbitos. Na atualidade, a forma primária de técnica de tratamento do câncer é o tratamento cirúrgico, que é realizado em combinação com o tratamento com radiação e quimioterapia. Apesar do desenvolvimento de novas técnicas cirúrgicas e a descoberta de novos agentes anticâncer nos anos recentes, os resultados do tratamento do câncer ainda permanecem inalterados, exceto nos casos de alguns tipos de câncer. Recentemente, antígenos do câncer reconhecidos por células T citotóxicas que são reativas ao câncer e antígenos que codificam genes do câncer foram identificados em conjunto com o desenvolvimento da biologia molecular e imunologia do câncer, e as expectativas pela imunoterapia específica com antígenos se ampliaram (Tsuyoshi Akiyoshi, *Gan to Kagaku Ryouhou* (Cancer and Chemiotherapy), 1997, vol. 24, pp. 551-519, Cancer and Chemiotherapy Publishers Inc., Japan).

[003] A imunoterapia requer a presença, em uma célula específica de câncer, de um peptídeo, polipeptídeo ou de uma proteína que seja reconhecida como um antígeno-alvo, assim como uma substancial ausência dos mesmos em células normais, do ponto de vista de mitigação dos efeitos colaterais. Em 1991, Boon et al. (The Ludwig Institute for Cancer Research, Belgium) isolaram o antígeno humano do melanoma MAGE1 reconhecido pela célula T CD8+ através da expressão da clonagem do cDNA usando uma linha de célula cancerosa autóloga e células T câncer-reativas (Bruggen P. et al.,

Science, 254: 1643-1647, 1991). Desde então, foi descrito o SEREX (identificação sorológica de antígenos pelo método de clonagem de expressão recombinante), que identifica o antígeno do tumor reconhecido pelo anticorpo que é produzido em resposta ao câncer autólogo no corpo de um paciente com câncer, através de clonagem de expressão de gene (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 92: 11810-11813, 1995; e Patente do USA No. 5,698,396). Alguns antígenos de câncer foram isolados por essas técnicas (Int. J. Cancer, 72: 965-971, 1997; Cancer Res., 58: 1034-1041, 1998; Int. J. Cancer, 29: 652-658, 1998; Int. J. Oncol., 14: 703-708, 1999; Cancer Res., 56: 4766-4772, 1996; e Hum. Mol. Genet. 6: 33-39, 1997). Além disso, foi iniciado o teste clínico de imunoterapia do câncer com alvo nesses antígenos.

[004] Assim como nos humanos, os cães e gatos são conhecidos como sujeitos a uma variedade de tumores, tais como câncer das glândulas mamárias, leucemia e linfoma, e os tumores possuem uma graduação elevada nas estatísticas de doenças caninas ou felinas. No entanto, atualmente, não há agentes de diagnóstico efetivos para o câncer canino ou felino. A maioria dos donos de cães ou gatos não nota os tumores caninos ou felinos até que eles se tornaram avançados e aumentados. Mesmo quando os tumores que são extirpados através de operações cirúrgicas ou drogas de uso humano são administradas (por exemplo, drogas anticâncer), os tumores já estão além do ponto de cura e os animais frequentemente morrem após o tratamento. Diante dessas circunstâncias, se houver a disponibilidade de agentes terapêuticos, preventivos e diagnósticos do câncer, que forem efetivos em cães e gatos, sua aplicação no câncer canino ou felino pode ser esperada.

[005] A proteína citoplasmática e associada à proliferação, (CAPRIN-1) se expressa quando células normais adormecidas são ativadas ou sofrem a divisão celular. A CAPRIN-1 é uma proteína intracelular que é conhecida por formar grânulos de estresse intracelular com RNA na célula e

estar associada com a regulação do transporte e translação do mRNA. A CAPRIN-1 também é conhecida por vários outros nomes, e exemplos disso incluem a proteína de membrana ancorada GPI 1 e a proteína marcadora de superfície de componente de membrana 1 (M11S1). A CAPRIN-1 possui nomes que transmitem a impressão de que ela foi conhecida como proteína da membrana celular. Esses outros nomes derivam do relato de que a sequência de gene da CAPRIN-1 tem uma região de ligação GPI e é uma proteína de membrana expressa em uma linha celular derivada do intestino grosso (J. Biol. Chem., 270: 20717-20723, 1995). Posteriormente, no entanto, ficou conhecido que a sequência de gene da CAPRIN-1 estava incorreta nesse relato e que na sequência de gene, a supressão de um único nucleotídeo da sequência de gene da CAPRIN-1, atualmente registrado no GenBank ou similar, resulta em uma mudança de quadro, levando à supressão de 80 aminoácidos do terminal C, e, portanto, o artefato resultante (74 aminoácidos) era a região de ligação GPI mencionada no relato anterior. Além disso, ficou também conhecido que a sequência de gene da CAPRIN-1 apresentada no relato também apresentava um erro no lado 5' e 53 resíduos de aminoácidos haviam sido deletados do terminal N (J. Immunol., 172: 2389-2400, 2004). Também foi informado que a proteína codificada pela sequência de gene da CAPRIN-1 atualmente registrada no GenBank ou similar não é uma proteína de membrana celular (J. Immunol., 172: 2389-2400, 2004).

[006] Com base no relato de J. Biol. Chem., 270: 20717-20723, 1995, de que a CAPRIN-1 é uma proteína da membrana celular, os documentos US 2008/0075722 e WO 2005/100998 descreveram que a CAPRIN-1 pode ser alvo da terapia do câncer como proteína da membrana celular sob o nome de M11S1. No entanto, eles não incluem quaisquer descrições específicas nos Exemplos. Conforme relatado em J. Immunol., 172: 2389-2400, 2004, no entanto, foi aceito desde o depósito do documento US 2008/0075722 até agora que a

CAPRIN-1 não é expressa em uma superfície celular. É aparente que as revelações dos documentos US 2008/0075722 e WO 2005/100998 baseadas apenas na informação incorreta de que a CAPRIN-1 é uma proteína da membrana celular não devem ser entendidas como um conhecimento técnico geral. Além disso, não há relato de que o nível de expressão de CAPRIN-1 seja mais elevado em células de câncer tais como as células de câncer de mama do que em células normais.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

PROBLEMA A SER SOLUCIONADO PELA INVENÇÃO

[007] É objeto da presente invenção a descrição de um novo polipeptídeo útil para ser um agente terapêutico e/ou preventivo do câncer e fornecer o uso deste polipeptídeo como um agente indutor de imunidade.

MEIOS PARA SOLUCIONAR O PROBLEMA

[008] Os inventores da presente invenção realizaram estudos concentrados e obtiveram proteínas codificadoras de cDNAs que se ligam a anticorpos no soro obtido de um corpo vivo portador de câncer através do método SEREX usando a genoteca de cDNA derivado de tecido testicular canino e o soro de um cão acometido por câncer de mama, e prepararam um polipeptídeo canino CAPRIN-1 que possui as sequências de aminoácidos apresentadas por SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, e 14 usando esses cDNAs. Utilizando o gene homólogo humano do gene obtido, igualmente, prepararam um polipeptídeo humano CAPRIN-1 com sequências de aminoácidos apresentadas por ID NOs: 2 e 4. Além disso, eles descobriram que esses polipeptídeos CAPRIN-1 estavam especificamente expressos no câncer de mama, em tumores cerebrais, na leucemia, no linfoma, no câncer de pulmão, no câncer de esôfago e no câncer cólono-retal. E descobriram que a administração desses Polipeptídeos CAPRIN-1 a corpos vivos levaria à indução de imunócitos contra os polipeptídeos CAPRIN-1 nos corpos vivos e a regressão de tumores

em corpos vivos expressando os genes CAPRIN-1. Além disso, descobriram que os anticorpos contra esses polipeptídeos CAPRIN-1 romperiam as células de célula cancerosas que expressam os genes CAPRIN-1 e induziriam efeitos antitumor *in vivo*. Isso levou à conclusão da presente invenção.

[009] Assim, a presente invenção possui as seguintes características:

(1) um agente indutor de imunidade compreendendo, como ingrediente ativo, pelo menos um polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade e é selecionado a partir dos polipeptídeos (a), (b), e (c), ou um vetor recombinante que compreende um polinucleotídeo que codifica o referido polipeptídeo e é capaz de expressar o referido polipeptídeo *in vivo*;

em que:

(a) é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30;

(b) é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos que possui identidade de sequência de 90% ou mais com o polipeptídeo (a); e

(c) é um polipeptídeo que compreende o polipeptídeo (a) ou (b) como sequência parcial do mesmo.

(2) O agente indutor de imunidade de acordo com (1), onde o polipeptídeo (b) é um polipeptídeo que possui identidade de sequência de 95% ou mais com o polipeptídeo (a).

(3) O agente indutor de imunidade de acordo com (1), onde o polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 ou um polipeptídeo que compreende esse polipeptídeo como sequência parcial do mesmo.

(4) O agente indutor de imunidade de acordo com (3), onde o polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade é um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30.

(5) O agente indutor de imunidade de acordo com (3), onde o polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos na região dos resíduos de aminoácidos (aa) 41 400 ou resíduos de aminoácidos (aa) 503 a 564 da sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30, com exceção das SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 18 ou um polipeptídeo que compreende esse polipeptídeo como sequência parcial do mesmo.

(6) O agente indutor de imunidade de acordo com (5), onde o polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade é um polipeptídeo da sequência de aminoácidos mostrada por uma das SEQ ID NOs: 43 a 76 ou um polipeptídeo de 8 a 12 aminoácidos que compreende a sequência de aminoácidos mostrada por uma das SEQ ID NOs: 43 a 76 como sequência parcial do mesmo.

(7) O agente indutor de imunidade de acordo com um dos itens (1) a (6), que compreende, como ingrediente ativo, um ou vários tipos desses polipeptídeos.

(8) O agente indutor de imunidade de acordo com (7), onde um polipeptídeo é um agente para tratar uma célula apresentadora de antígeno.

(9) O agente indutor de imunidade de com acordo com um dos itens (1) a (7), que é para uso no tratamento ou prevenção de câncer animal.

(10) O agente indutor de imunidade de acordo com (9), onde o câncer é selecionado a partir de câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer de esôfago, ou câncer colono-retal.

(11) O agente indutor de imunidade de acordo com (9), onde o animal é selecionado a partir de ser humano, cão ou gato.

(12) O agente indutor de imunidade de acordo com um dos itens (1) a (11), que compreende adicionalmente um agente imunopotencializador.

(13) O agente indutor de imunidade de acordo com (12), onde o agente imunopotencializador é pelo menos um adjuvante ou uma citocina selecionada do grupo que consiste em adjuvante incompleto de Freund's, Montanide, poli IC e um derivado do mesmo, oligonucleotídeo CpG, interleucina 12, interleucina 18, interferon α , interferon β , interferon ω , interferon γ , e ligante Flt3.

(14) Uma célula apresentadora de antígeno isolada que compreende um complexo do polipeptídeo acima mencionado, que possui atividade indutora de imunidade e uma molécula HLA.

(15) Uma célula T isolada, que se liga seletivamente a um polipeptídeo acima mencionado que possui atividade indutora de imunidade e uma molécula HLA.

(16) Um método para induzir a imunidade que compreende a administração a um indivíduo de pelo menos um polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade e é selecionado a partir dos polipeptídeos (a) a (c), ou um vetor recombinante que compreende um polinucleotídeo que codifica o referido polipeptídeo e é capaz de expressar o referido polipeptídeo *in vivo*;

em que

(a) é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos da sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30;

(b) é um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos que possui identidade de sequência de 90% ou mais com o polipeptídeo (a); e

(c) é um polipeptídeo que compreende o polipeptídeo (a) ou (b)

como sequência parcial do mesmo.

EFEITOS DA INVENÇÃO

[010] A presente invenção fornece um novo agente indutor de imunidade útil no tratamento e/ou prevenção do câncer. Conforme especificamente descrito nos exemplos abaixo, a administração do polipeptídeo usado na presente invenção a um animal portador de câncer permite a indução de um imunócito no corpo desse animal portador de câncer, o que posteriormente permite a redução ou regressão do câncer existente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[011] A Fig. 1 mostra o padrão de expressão do gene com codificação do polipeptídeo CAPRIN-1 no tecido normal e em uma linha de célula tumoral. O número de referência 1 representa o padrão de expressão do gene com codificação da proteína CAPRIN-1, e o número de referência 2 representa o padrão de expressão do gene GAPDH.

[012] Na Fig. 2, cada um dos números de referências 3 a 31 no eixo horizontal representa a capacidade das células T CD8+ HLA-A0201+ para produzir IFN- γ estimulado pelas células T2 pulsadas com os peptídeos das SEQ ID Nos: 43 a 71. O número de referência 32 representa os resultados relativos a um peptídeo de controle negativo da SEQ ID NO: 77 (um peptídeo que possui uma sequência fora do escopo da presente invenção).

[013] Na Fig. 3, cada um dos números de referência 33 a 37 no eixo horizontal representa a capacidade das células T CD8+ HLA-A24+ para produzir IFN- γ estimulados por células JTK-LCL pulsadas com os peptídeos de SEQ ID NOs: 72 a 76. O número de referência 38 representa os resultados referentes a um controle negativo da SEQ ID NO: 77.

[014] Na Fig. 4, cada um dos números de referências 39 a 67 no eixo horizontal representa a atividade citotóxica das células T CD8+ HLA-A0201+ estimulados pelo uso de peptídeos das SEQ ID NOs: 43 a 71 nas

células U-87MG. O número de referência 68 representa a atividade citotóxica das células T CD8+ induzidas pelo uso de um peptídeo de controle negativo (SEQ ID NO: 77).

[015] Na Fig. 5, cada um dos números de referências 69 a 73 no eixo horizontal representa a atividade citotóxica das células T CD8+ HLA-A24+ estimulada pelo uso dos peptídeos de SEQ ID NOs: 72 a 76 nas células JTK-LCL. O número de referência 74 representa a atividade citotóxica das células T CD8+ induzida pelo uso de um peptídeo de controle negativo (SEQ ID NO: 77).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

POLIPEPTÍDEOS

[016] Os polipeptídeos contidos no agente indutor de imunidade da presente invenção como ingrediente ativo incluem um ou vários polipeptídeos selecionados dos seguintes polipeptídeos (a), (b), e (c):

(a) um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos em um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração selecionadas dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 e que possui atividade indutora de imunidade;

(b) um polipeptídeo que possui identidade de sequência de 90% ou mais com um polipeptídeo (a), consistindo de pelo menos 7 aminoácidos, e que possui atividade indutora de imunidade; e

(c) um polipeptídeo que compreende o polipeptídeo (a) ou (b) como sequência parcial e que possui atividade indutora de imunidade.

[017] O termo "polipeptídeo" aqui usado se refere à molécula formada através de ligações peptídicas de vários aminoácidos. O termo se refere não apenas a uma molécula de polipeptídeo constituída por um grande número de aminoácidos, mas também a uma molécula de peso molecular baixo constituída por um pequeno número de aminoácidos (um oligopeptídeo) e uma

proteína de sequência completa. Na presente invenção, o termo "polipeptídeo" também se refere a uma proteína de sequência completa mostrada por uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30.

[018] As sequências de nucleotídeo de polinucleotídeos que codificam proteínas separadas consistindo das sequências de aminoácidos conforme mostradas pelas sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 (por exemplo, SEQ ID NOs: 2, 4, 6...28, e 30) são mostradas pelas sequências de numeração ímpar dentre as SEQ ID NOs: 1 a 29 (ou seja, SEQ ID NOs: 1, 3, 5...27, e 29).

[019] O termo "que possui a sequência de aminoácidos" usado aqui se refere a uma sequência composta de resíduos de aminoácidos em uma determinada ordem. Por exemplo, o termo "um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 2" se refere a um polipeptídeo de 709 resíduos de aminoácidos em extensão, possuindo a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 2, ou seja, Met Pro Ser Ala Thr...(snip)...Gln Gln Val Asn,. O termo "um polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 2" pode ser ocasionalmente abreviado como "o polipeptídeo da SEQ ID NO: 2." O mesmo se aplica à expressão "que possui a sequência de nucleotídeo." Neste contexto, o termo "que possui" é passível de troca pela expressão "que consiste em".

[020] O termo "atividade indutora de imunidade" usado aqui se refere à capacidade de induzir um imunócito que secrete citocina, tal como o interferon ou interleucina, *in vivo*.

[021] Se um polipeptídeo tem ou não a atividade indutora de imunidade pode ser confirmado através de, por exemplo, o conhecido ensaio ELISPOT. Especificamente, células tais como as células mononucleares periféricas do sangue são obtidas de um ser vivo no qual tenha sido administrado um polipeptídeo a ser testado para atividade indutora de

imunidade, tais células são co-culturas na presença desse polipeptídeo, e a quantidade de produção de citocina e/ou quimocina, tais como IFN- γ ou interleucina (IL), das células é medida com o uso de um anticorpo específico, conforme descrito nos Exemplos abaixo, por exemplo. Assim, o número de imunócitos entre as células pode ser testado. Isso permite a avaliação da atividade indutora de imunidade.

[022] Por outro lado, um polipeptídeo recombinante preparado com base em uma sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 pode ser administrado a um animal portador de câncer, para que um tumor possa regredir através da atividade indutora de imunidade, conforme descrito nos Exemplos abaixo. Assim sendo, a atividade indutora de imunidade pode ser avaliada como a capacidade de suprimir o crescimento de células de câncer que expressa um polipeptídeo mostrado por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 ou a capacidade de reduzir ou eliminar o tecido canceroso (tumor) (doravante, essa capacidade é referida como "atividade antitumor"). A atividade antitumor dos polipeptídeos pode ser determinada, por exemplo, pela administração efetiva desse polipeptídeo a um ser vivo portador de câncer e do exame para ver se o tumor regrediu ou não, conforme especificamente descrito nos Exemplos abaixo.

[023] Por outro lado, se as células T estimuladas pelo polipeptídeo (ou seja, células T colocadas em contato com células apresentadoras de antígenos que apresentem esse polipeptídeo) apresentam ou não atividade citotóxica nas células do tumor *in vitro*, podem ser examinadas para avaliar a atividade antitumor do polipeptídeo. As células T podem ser colocadas em contato com as células apresentadora de antígenos através da co-cultura das mesmas em um meio líquido conforme descrito abaixo. A atividade citotóxica pode ser testada através de uma técnica conhecida como Técnica de teste de

liberação de Cr, descrita, por exemplo em, Int. J. Cancer, 58: p. 317, 1994. Quando os polipeptídeos são usados para o tratamento e/ou a prevenção do câncer, é preferível que a atividade indutora de imunidade seja avaliada usando uma atividade antitumor como indicador, embora um método de avaliação não seja especificamente limitado.

[024] As sequências de aminoácidos mostradas pelas sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 descritas pela presente invenção são as sequências de aminoácidos dos Polipeptídeos CAPRIN-1 isolados como os polipeptídeos que se ligam aos anticorpos existentes especificamente no soro obtido de humanos, cães, bovinos, cavalos, camundongos e galinhas portadores de câncer homólogos desses polipeptídeos através do método SEREX, usando a genoteca de cDNA de tecido testicular canino normal e o soro de um cão acometido por câncer de mama (ver Exemplo 1 abaixo).

[025] O polipeptídeo (a) indicado acima tem pelo menos 7 e preferivelmente pelo menos 8, 9, 10 ou mais aminoácidos contíguos em um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 e possui atividade indutora de imunidade. É especialmente preferível que esse polipeptídeo tenha uma sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID Nos: 2 a 30. Conforme reconhecido pelo estado da técnica, um polipeptídeo de pelo menos cerca de 7 resíduos de aminoácidos pode exercer antigenicidade. Igualmente, um polipeptídeo de pelo menos 7 resíduos contíguos de aminoácidos da sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 pode exercer antigenicidade e imunogenicidade. Ou seja, um polipeptídeo de pelo menos 7 resíduos contíguos de aminoácidos da sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 pode ter

atividade indutora de imunidade, e esse polipeptídeo pode ser usado para preparar o agente indutor de imunidade da presente invenção. Baseado no fato de que os anticorpos produzidos de uma substância antigênica *in vivo* são anticorpos policlonais, um polipeptídeo composto de um número maior de resíduos de aminoácidos pode induzir uma maior variedade de anticorpos reconhecendo vários locais da substância antigênica, aumentando assim a atividade indutora de imunidade. Para ampliar a atividade indutora de imunidade, assim, o número de resíduos de aminoácidos pode ser, preferivelmente, de pelo menos 30 ou mais, ou 50 ou mais, preferivelmente de pelo menos 100 ou mais, 150 ou mais e, além disso, preferivelmente de pelo menos 200 ou mais, ou ainda preferivelmente de 250 ou mais.

[026] Como princípio da indução de imunidade através da administração de um polipeptídeo do câncer, sabe-se que um polipeptídeo é incorporado em uma célula apresentadora de antígeno, o polipeptídeo é degradado por uma peptidase na célula em um fragmento menor (doravante pode ser referido como "epítipo"), tal fragmento é apresentado na superfície da célula, células T citotóxicas ou similares reconhecem o fragmento e seletivamente destroem as células apresentadoras de antígenos. O tamanho de um polipeptídeo apresentado na superfície de célula apresentadora de antígeno é relativamente pequeno e é cerca de 7 a 30 em termos do número de aminoácidos. Do ponto de vista de apresentação na célula apresentadora de antígeno, portanto, basta que o polipeptídeo (a) seja de cerca de 7 a 30 e preferivelmente cerca de 8 a 30 ou 9 a 30 aminoácidos contíguos na sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30. Esse polipeptídeo de tamanho relativamente pequeno pode ser diretamente apresentado à superfície da célula apresentadora de antígeno sem ser incorporado na célula apresentadoras de antígeno.

[027] O polipeptídeo incorporado na célula apresentadora de

antígeno é clivado em posições ao acaso com uma peptidase presente nas células, uma variedade de fragmentos de polipeptídeo é gerada, e esses fragmentos de polipeptídeo são apresentados na superfície da célula apresentadora de antígeno. Se um polipeptídeo grande tal como a sequência completa mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 for administrado, conseqüentemente os fragmentos de polipeptídeo que são eficazes para a indução de imunidade mediada por células apresentadoras de antígenos através da degradação na célula apresentadora de antígeno são gerados naturalmente. Assim sendo, um polipeptídeo de tamanho grande pode ser preferivelmente usado para indução da imunidade mediada por células apresentadoras de antígenos, e o número de aminoácidos pode ser de pelo menos 30, mais preferivelmente pelo menos 100, e mais preferivelmente ainda de pelo menos 200, e mais preferivelmente ainda de pelo menos 250.

[028] Ademais, o polipeptídeo da presente invenção pode ser rastreado para um peptídeo sendo um possível epítipo com o uso de um meio correspondente que possa procurar um peptídeo útil como possível epítipo, que possui uma razão de ligação para cada tipo HLA, tal como as Previsões de Bioinformática e Seleção de Análise Molecular de Ligação de Peptídeo HLA (BIMAS) (http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/index.html). Especificamente, um polipeptídeo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos na região dos resíduos de aminoácidos (aa) 41 a 400 ou resíduos de aminoácidos (aa) 503 a 564 na sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par selecionada dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 com exceção das SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 18 ou um polipeptídeo compreendendo esse polipeptídeo como sequência parcial do mesmo é preferível. No polipeptídeo da SEQ ID NO: 2, um polipeptídeo mostrado por uma das SEQ ID NOs: 43 a 76 é ainda mais preferível.

[029] O polipeptídeo (b) acima é derivado do polipeptídeo (a) por substituição, deleção, adição, e/ou inserção de um pequeno número de resíduos de aminoácidos (preferivelmente um ou vários), possui identidade de sequência de 80% ou mais, 85% ou mais, preferivelmente 90% ou mais, mais preferivelmente 95% ou mais, e ainda mais preferivelmente 98% ou mais, 99% ou mais, ou 99,5% ou mais com a sequência original, e possui atividade indutora de imunidade. Quando um pequeno número de resíduos de aminoácidos (preferivelmente um ou vários) for substituído por, retirado de, adicionado a, ou inserido na sequência de aminoácidos do antígeno da proteína, em geral, é de conhecimento geral no estado da técnica que a proteína resultante ocasionalmente tem substancialmente a mesma antigenicidade ou imunogenicidade que a proteína original. Assim sendo, o polipeptídeo (b) acima é capaz de exercer a atividade indutora de imunidade e pode ser usado para preparar o agente indutor de imunidade da presente invenção. Por outro lado, o polipeptídeo (b) acima é preferivelmente um polipeptídeo que possui uma sequência de aminoácidos derivada da sequência de aminoácidos mostrada por uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 por substituição, deleção, adição, e/ou inserção de um ou vários resíduos de aminoácidos. O termo "vários" usado aqui se refere a um número inteiro de 2 a 10, preferivelmente um número inteiro de 2 a 6, e mais preferivelmente um número inteiro de 2 a 4.

[030] O termo "identidade de sequência" usado aqui relativamente à sequência de aminoácidos ou sequência de nucleotídeo representa a porcentagem (%) determinada pelo alinhamento de duas sequências de aminoácidos (ou sequências de nucleotídeo) para serem comparadas no sentido de maximizar o número de resíduos de aminoácidos (ou nucleotídeos) correspondentes e dividir o número de resíduos de aminoácidos correspondentes (ou o número de nucleotídeos correspondentes) pelo número

total de resíduos de aminoácidos (ou o número total de nucleotídeos). Ao alinhar as sequências conforme descrito acima, um intervalo é adequadamente inserido em uma ou nas duas sequências a serem comparadas, de acordo com a necessidade. Esse alinhamento de sequência pode ser executado com o uso de um programa bem conhecido, por exemplo, o BLAST, FASTA, ou CLUSTAL W (Karlin e Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 2264-2268, 1993; Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389-3402, 1997). Quando um intervalo é inserido, o número total de resíduos de aminoácidos (ou o número total de nucleotídeos) é o número de resíduos (ou o número de nucleotídeos) contados pela designação de um intervalo como resíduo de aminoácido (ou um nucleotídeo). Quando o número total de resíduos de aminoácidos (ou o número total de nucleotídeos) determinados dessa forma difere entre as duas sequências a serem comparadas, a identidade (%) é determinada dividindo o número de resíduos de aminoácidos correspondentes (ou o número de nucleotídeos) pelo número total de resíduos de aminoácidos (ou o número total de nucleotídeos) de uma sequência mais longa.

[031] Uma substituição preferencial de aminoácido é uma substituição conservadora de aminoácido. Vinte tipos de aminoácidos constituindo uma proteína que ocorre naturalmente podem ser classificados em grupos de aminoácidos que possuem propriedades similares: ou seja, aminoácidos neutros que possuem cadeias laterais de baixa polaridade (Gly, Ile, Val, Leu, Ala, Met e Pro); aminoácidos neutros que possuem cadeias laterais hidrofílicas (Asn, Gln, Thr, Ser, Tyr, e Cys); aminoácidos ácidos (Asp, e Glu); aminoácidos básicos (Arg, Lys, e His); e aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr, Trp, e His). Sabe-se que a substituição nesses grupos, ou seja, a substituição conservadora, não alteraria as propriedades do polipeptídeo em muitos casos. Quando os resíduos de aminoácidos no polipeptídeo (a) da presente invenção são substituídos, conseqüentemente, a substituição pode ser

feita dentro desses grupos, para que a possibilidade de manter a atividade indutora de imunidade possa ser ampliada. Na presente invenção, no entanto, o polipeptídeo alterado pode ter uma substituição não conservadora, desde que o polipeptídeo resultante tenha a atividade indutora de imunidade equivalente ou substancialmente equivalente àquela do polipeptídeo inalterado.

[032] O polipeptídeo (c) compreende o polipeptídeo (a) ou (b) como sequência parcial do mesmo e tem atividade indutora de imunidade. Especificamente, o polipeptídeo (c) corresponde ao polipeptídeo (a) ou (b) aos quais outro(s) aminoácido(s) ou polipeptídeo(s) é(são) adicionados em uma ou mais extremidades do mesmo e possuindo uma atividade indutora de imunidade. Esse polipeptídeo pode ser usado para preparar o agente indutor de imunidade da presente invenção.

[033] O polipeptídeo acima mencionado pode ser quimicamente sintetizado de acordo com, por exemplo, o método Fmoc (Fluorenil metil oxicarbonila) ou o método tBoc (t-butil oxicarbonil) (The Japanese Biochemical Society (ed.), *Seikagaku Jikken Kouza* (the Course for Biochemical Experiment) 1, *Tanpakushitsu no Kagaku* (Chemistry of Protein) IV, *Kagaku Shushoku to Peptide Gousei* (Chemical Modification and Peptide Synthesis), Tokyo Kagaku Dojin, Japan, 1981). Também, uma variedade de sintetizadores de peptídeos comercialmente disponíveis pode ser usada para sintetizar o polipeptídeo de acordo com a técnica convencional. Além disso, técnicas conhecidas de engenharia genética (por exemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning*, vol. 2, *Current Protocols in Molecular Biology*, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press; e Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology*, vol. 3, *A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, John Wiley & Sons) podem ser usadas para preparar um polinucleotídeo com codificação do polipeptídeo acima, e o polipeptídeo resultante pode ser incorporado em um vetor de expressão e então introduzido em uma célula

hospedeira, e o polipeptídeo pode ser produzido nessa célula hospedeira para obter o polipeptídeo alvo.

[034] Um polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo acima pode ser facilmente preparado através de uma técnica conhecida de engenharia genética ou uma técnica convencional usando um sintetizador de ácido nucléico comercialmente disponível. Por exemplo, um DNA que possui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 1 pode ser preparado através de PCR com o uso da genoteca de DNA ou cDNA de cromossoma humano como modelo e um par de *primers* designados para ampliar a sequência de nucleotídeo mostrada pela SEQ ID NO: 1. Igualmente, um DNA que possui a sequência de nucleotídeo de SEQ ID NO: 5 pode ser preparado com o uso da genoteca de DNA ou cDNA de cromossoma canino como modelo. As condições PCR podem ser adequadamente determinadas. Por exemplo, o ciclo de reação de desnaturação a 94°C por 30 segundos, com recozimento a 55°C por 30 segundos a 1 minuto, e extensão a 72°C por 2 minutos com o uso de polimerase DNA termoestável (ou seja, Taq polimerase) e Mg²⁺-contendo *buffer* PCR é repetido 30 vezes, seguido de reação a 72°C por 7 minutos, embora as condições de reação não sejam limitadas a isso. Técnicas e condições de PCR e similares são descritas em, por exemplo, Ausubel *et al.*, Short Protocols in Molecular Biology, vol. 3, A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, 1995, John Wiley & Sons (Chapter 15, em especial). Igualmente, *probes* ou *primers* adequados podem ser preparados com base na informação das sequências de nucleotídeo e da sequência de aminoácidos mostrada pelas SEQ ID NOs: 1 a 30 da presente invenção, e genotecas de cDNA humano, canino, bovino, ou outras genotecas podem ser examinadas para o uso de tais *probes* ou *primers*, para que o DNA de interesse possa ser isolado. As genotecas cDNA são preferivelmente preparadas a partir de células, órgãos, ou tecido nos quais uma proteína mostrada por uma sequência de número par dentre as SEQ ID NOs: 2

a 30 esteja expressa. Procedimentos, tais como a preparação de *probes* ou *primers*, construção da genoteca cDNA, exame da genoteca cDNA, e clonagem de genes-alvo, descritos acima são conhecidos no estado da arte. Por exemplo, tais procedimentos podem ser executados de acordo com os métodos descritos em Sambrook *et al.*, (Molecular Cloning, vol. 2, Current Protocols in Molecular Biology, 1989), Ausubel *et al.* (segundo acima). O polipeptídeo com codificação DNA (a) acima pode ser obtido do DNA assim obtido. Uma vez que a codificação de um códon de cada aminoácido é conhecida, a sequência de nucleotídeo da codificação de um polinucleotídeo com uma sequência particular de aminoácidos pode ser facilmente identificada. Igualmente a sequência de nucleotídeo de um polinucleotídeo com codificação de polipeptídeo (b) ou (c) pode ser facilmente identificada, e esse polinucleotídeo pode também ser facilmente sintetizado com o uso de um sintetizador de ácido nucléico comercialmente disponibilizado, de acordo com uma técnica convencional.

[035] As células T hospedeiras podem ser quaisquer células, desde que o polipeptídeo previamente mencionado possa ser expresso nas mesmas. As células T hospedeiras incluem, mas não se limitam a uma célula de *E. coli* como as células procarióticas; e células de rim de macaco (COS 1), células de ovário de hamster chinês (CHO), a linha celular de rim humano embrionário (HEK293), e a linha celular de pele fetal de camundongos (NIH3T3), células T de levedura em brotamento, células T de levedura em divisão, células de lagarta de seda, e células de ovos de *xenopus* como células eucarióticas.

[036] Quando células T procarióticas hospedeiras são usadas, vetores de expressão que possuem, por exemplo, uma origem, um *promoter*, um sítio de ligação de ribossomo, um sítio de multi clonagem, um *terminator*, um gene tolerante a droga e um gene complementar auxotrófico que pode ser replicado em células procarióticas são usados. Exemplos de vetores de expressão de *E. coli* incluem pUC, pBluescriptII, o sistema de expressão pET, e

o sistema de expressão pGEX. O DNA que codifica o polipeptídeo acima pode ser incorporado nesse vetor de expressão, as células T procarióticas hospedeiras podem ser transformadas com esse vetor e o transformando obtido pode ser cultivado. Assim sendo, um polipeptídeo codificado pelo DNA pode ser expresso em células T procarióticas hospedeiras, esse polipeptídeo pode ser expresso na forma de uma fusão proteica com outra proteína.

[037] Quando células T eucarióticas hospedeiras são usadas, vetores de expressão de células eucarióticas que possuem, por exemplo, um promotor, uma região de divisão, e um sítio de poli adição (A) adição são usados. Exemplos desses vetores de expressão incluem vetores pKA1, pCDM8, pSVK3, pMSG, pSVL, pBK-CMV, pBK-RSV, EBV, pRS, pcDNA3 e pYES2. Conforme descrito acima, o DNA que codifica o polipeptídeo acima pode ser incorporado nesse vetor de expressão, as células T eucarióticas hospedeiras podem ser transformadas com esse vetor e o transformando resultante pode então ser cultivado. Assim sendo, um polipeptídeo codificado pelo DNA pode ser expresso em células T eucarióticas hospedeiras. Quando pIND/V5-His, pFLAG-CMV-2, pEGFP-N1, pEGFP-C1, ou outros vetores de expressão são usados, o polipeptídeo pode ser expresso na forma de uma proteína de fusão com uma variedade de ligações, tais como ligação His (ou seja, (His)₆ a (His)₁₀), ligação FLAG, ligação myc, ligação HA ou GFP.

[038] Vetores de expressão podem ser introduzidos em células T hospedeiras através de técnicas convencionais, tais como a eletroporação, o método do fosfato de cálcio, o método lipossoma, o método DEAE-dextran, microinjeção, infecção por vírus, lipofecção, ou ligação com um peptídeo de célula permeável.

[039] O polipeptídeo-alvo pode ser isolado e purificado das células T hospedeiras através da utilização de técnicas conhecidas combinadas. Exemplos disso incluem, mas não se limitam ao tratamento com o uso de um

agente desnaturizante tal como a ureia ou um surfactante, a ultrassonificação, digestão de enzima, precipitação com um solvente ou salgação, diálise, centrifugação, ultrafiltração, gel filtração, SDS-PAGE, concentração isoelétrica, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, cromatografia de afinidade e cromatografia de fase reversa.

[040] Alguns polipeptídeos obtidos por tais métodos estão na forma de proteínas de fusão com quaisquer outras proteínas conforme descrito acima. Exemplos disso incluem proteínas de fusão com a glutationa-S-transferase (GST) ou *tag* His. Esses polipeptídeos na forma de proteínas de fusão estão no escopo da presente invenção como polipeptídeo (c). Além disso, os polipeptídeos expressos em células transformadas são traduzidos e os polipeptídeos traduzidos ocasionalmente sofrem vários tipos de modificação nas células. Esses polipeptídeos modificados pós-tradução estão igualmente no escopo da presente invenção, desde que esses polipeptídeos possuam atividade indutora de imunidade. Exemplos dessa modificação pós-tradução incluem eliminação da meotina do N-terminal, acetilação do N-terminal, adição à cadeia de açúcar, degradação limitada com protease intracelular, miristoilação, isoprenilação e fosforilação.

AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE

[041] Conforme especificamente descrito nos exemplos abaixo, a administração polipeptídeo acima mencionado que possui atividade indutora de imunidade em ser vivo portador de câncer possibilita regressão de um tumor existente. Assim sendo, o agente indutor de imunidade da presente invenção pode ser usado como terapêutico e/ou agente preventivo do câncer.

[042] Os termos "tumor" e "câncer" usados aqui se referem a neoplasias malignas e esses termos são usados alternadamente entre si.

[043] Nesse caso, os cânceres-alvo são aqueles que expressam um gene que codifica um polipeptídeo que compreende uma sequência de

aminoácidos mostrada em uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 ou a sequência parcial do mesmo consistindo de pelo menos 7 aminoácidos contíguos. Preferivelmente, esses cânceres são o câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, câncer de pulmão, linfoma, tumor de mastócito, câncer de esôfago, e câncer colono-retal. Exemplos desses cânceres especificados incluem, mas não se limitam a câncer de glândula mamária, câncer combinado de glândula mamária, tumor misto maligno da glândula mamária, adenocarcinoma papilar intraductal, leucemia linfocítica crônica, linfoma gastrointestinal, linfoma digestivo e linfoma de células pequenas a médias.

[044] Animais-alvo são mamíferos e exemplos disso incluem animais mamíferos, incluindo primatas, animais domésticos, gado e animais de competição, com humanos, cães e gatos sendo especialmente preferíveis.

[045] O agente indutor de imunidade da presente invenção pode ser administrado oralmente ou de forma parenteral a um organismo. A administração parenteral, como a intramuscular, subcutânea, intravenosa ou administração intra-arterial é preferível. Quando esse agente indutor de imunidade é usado para fins de tratamento do câncer, o agente pode ser administrado ao nódulo linfático regional na vizinhança do tumor a ser tratado, de forma a melhorar os efeitos antitumorais conforme descrito nos exemplos abaixo. A dose pode ser qualquer quantidade desde que seja efetiva na indução de imunidade. Quando o agente é usado para tratamento e/ou prevenção do câncer, por exemplo, uma quantidade efetiva para o tratamento e/ou prevenção do câncer é suficiente, e essa quantidade pode ser alterada dependendo de, por exemplo, peso corporal, sexo (masculino ou feminino) ou sintoma de um animal. A quantidade efetiva por tratamento e/ou prevenção de câncer é adequadamente determinada de acordo com o tamanho do tumor, sintomas ou outras condições. Em geral, uma quantidade efetiva por animal-alvo por dia é de

0,0001 µg a 1.000 µg, e preferivelmente 0,001 µg to 1.000 µg, e o agente pode ser administrado via uma dose única ou várias doses. Preferivelmente, o agente é administrado através de várias doses separadas por vários dias ou meses. Conforme especificamente descrito nos exemplos abaixo, o agente indutor de imunidade da presente invenção possibilita regressão de um tumor existente. Assim sendo, o agente pode exercer os efeitos antitumorais em um pequeno número de células cancerosas em um estágio precoce de desenvolvimento. A utilização do mesmo antes da instalação do câncer ou após o tratamento leva à prevenção do desenvolvimento ou recorrência do câncer. Especificamente o agente indutor de imunidade da presente invenção é útil no tratamento e prevenção de câncer.

[046] O agente indutor de imunidade da presente invenção pode consistir de um polipeptídeo, ou pode ser adequadamente misturado a um aditivo que seja apropriado para a forma de dosagem pertinente, tal como um veículo farmacêuticamente aceitável, um diluente, um excipiente, ou similar. Métodos de preparar um agente e aditivos que podem ser usados são conhecidos no campo de preparação médica e quaisquer métodos e aditivos podem ser empregados. Exemplos específicos de aditivos incluem, mas não se limitam a: diluentes, tais como soluções fisiológicas *buffer*; excipientes, tais como açúcar, lactose, goma de milho, fosfato de cálcio, sorbitol e glicina; ligantes, tais como xarope, gelatina, goma arábica, sorbitol, cloro polivinil e tragacanto; e lubrificantes, tais como estearato de magnésio, álcool polietileno, talco e sílica. Exemplos de formas de preparações incluem agentes orais, tais como tabletes, cápsulas, grânulos, pós, e soluções de xarope, e agentes parenterais tais como inalantes, preparações de injeção, supositórios e drogas líquidas. Esses agentes podem ser preparados por métodos comuns.

[047] O agente indutor de imunidade da presente invenção pode ser usado em combinação com um agente imunopotencializador capaz de

potencializar uma reação imunológica *in vivo*.

[048] O agente imunopotencializador pode ser incorporado ao agente indutor de imunidade da presente invenção, ou pode ser administrado a um paciente como outra composição em combinação com o agente indutor de imunidade da presente invenção.

[049] O termo "paciente" usado aqui se refere a um animal, a um animal mamífero em particular, e que seja preferivelmente um ser humano, cão ou gato.

[050] Um exemplo de agente imunopotencializador é um adjuvante. Um adjuvante fornece um reservatório de antígeno (fora da célula ou no macrófago), ativa o macrófago e estimula os linfócitos de um determinado tecido. Dessa forma, um adjuvante pode potencializar uma reação imunológica e ampliar os efeitos antitumorais. Quando o agente indutor de imunidade da presente invenção for usado para tratamento e/ou prevenção do câncer, conseqüentemente é especialmente preferível que o agente indutor de imunidade, além disso, compreenda um adjuvante além do polipeptídeo como ingrediente ativo. Vários tipos de adjuvantes são bem conhecidos no estado da arte e quaisquer desses adjuvantes podem ser usados. Exemplos específicos disso incluem: MPL (SmithKline Beecham); um equivalente obtido pela purificação da hidrólise ácida de um lipopolissacarídeo da *Salmonella minnesota* Re 595; QS21 (SmithKline Beecham); uma saponina pura QA-21 purificada do extrato de *Quillja saponaria*; DQS21 revelado na aplicação PCT (WO 96/33739, SmithKline Beecham); QS-7, QS-17, QS-18, e QS-L1 (So et al., *Molecules and Cells*, 1997, 7: 178-186); o adjuvante incompleto de Freund; o adjuvante completo de Freund adjuvante; vitamina E; Montanide; alum; CpG oligonucleotídeo (por exemplo, Kreig et al., *Nature*, 1995, 374: 546-549); poli IC e um derivado dele (por exemplo, poli ICLC); e várias emulsões de água no óleo preparadas de óleo biodegradável, tais como squalene e/ou tocoferol. o

Adjuvante incompleto de Freund, Montanide, poli I:C, um derivado dele e o oligonucleotídeo CpG são especialmente preferíveis. A proporção do adjuvante misturado a um polipeptídeo é geralmente de 1:10 a 10:1, preferivelmente cerca de 1:5 to 5:1, e mais preferivelmente de cerca de 1:1. Deve-se notar que adjuvantes não se limitam aos exemplos acima e outros adjuvantes conhecidos no estado da arte também podem ser usados no momento da administração do agente indutor de imunidade da presente invenção (tal como, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, vol. 2, 1986). Um método para preparar uma mistura de polipeptídeo e adjuvante ou uma emulsão é algo bem conhecido de pessoas experientes no campo da imunização.

[051] Como agente imunopotencializador, fatores que estimulam uma reação imunológica de interesse podem ser usados além dos adjuvantes previamente mencionados. Por exemplo, várias citocinas que estimulam linfócitos ou células apresentadoras de antígenos podem ser usadas como agente de imunopotencialização em combinação com o agente indutor de imunidade da presente invenção. Muitas citocinas que podem potencializar reações são conhecidas no estado da arte. Exemplos disso incluem, mas não se limitam a, interleucina-12 (IL-12), GM-CSF, IL-18, interferon α , interferon β , interferon ω , interferon γ , e ligante Flt3 que são conhecidos por potencializar os efeitos protetores de uma vacina. Esse fator pode ser usado como agente imunopotencializador e pode ser administrado na forma de uma mistura do mesmo com o agente indutor de imunidade da presente invenção ou em combinação com o agente indutor de imunidade da presente invenção como outra composição.

CÉLULA APRESENTADORA DE ANTÍGENO

[052] Ademais, os polipeptídeos mencionados acima podem ser colocados em contato com as células apresentadoras de antígenos *in vitro* para apresentar esses polipeptídeos às células apresentadoras de antígenos.

Especificamente, os polipeptídeos (a) a (c) podem ser usados como agentes para o tratamento das células apresentadoras de antígenos. Exemplos de células apresentadoras de antígenos incluem células dendríticas, células B e macrófagos, e células dendríticas ou células B que possuam moléculas MHC são preferivelmente usadas. Uma variedade de moléculas MHC classe I foram identificadas e são bem conhecidas. Moléculas humanas MHC são referidas como "HLA." Exemplos de moléculas HLA classe I incluem HLA-A, HLA-B, e HLA-C. Exemplos específicos incluem HLA-A1, HLA-A0201, HLA-A0204, HLA-A0205, HLA-A0206, HLA-A0207, HLA-A11, HLA-A24, HLA-A31, HLA-A6801, HLA-B7, HLA-B8, HLA-B2705, HLA-B37, HLA-Cw0401 e HLA-Cw0602.

[053] Células dendríticas ou Células B possuindo moléculas MHC classe I podem ser preparadas do sangue periférico através de uma técnica bastante conhecida. Por exemplo, células dendríticas são induzidas da medula óssea, sangue umbilical ou do sangue periférico de uma paciente com o uso de fatores estimulantes da colônia granulócito-macrófago (GM-CSF) e IL-3 (ou IL-4), e peptídeos associados a tumores são adicionados ao sistema de cultura. Dessa forma, células dendríticas tumor- específicas podem ser induzidas.

[054] A administração de uma quantidade efetiva dessas células dendríticas possibilita a indução de uma reação desejável para o tratamento do câncer. Exemplos de células que podem ser usadas incluem as de medula óssea e de sangue umbilical fornecido de um indivíduo saudável e as de medula óssea e de sangue periférico do paciente. Quando as células próprias autólogas do paciente são usadas, o nível de segurança é alto e graves efeitos colaterais podem ser evitados. O sangue periférico ou da medula óssea pode ser de amostra fresca, armazenada hipotermicamente ou criopreservada. O sangue periférico pode ser preparado através da cultura de todo o sangue ou da cultura de componentes separados de leucócitos, sendo esse último preferível segundo

o ponto de vista da eficiência. Além disso, as células mononucleares podem ser isoladas dos componentes do leucócito. Quando a amostra é preparada da medula óssea ou do sangue umbilical, todas as células que constituem a medula óssea podem ser cultivadas ou células mononucleares podem ser separadas das mesmas e cultivadas. O sangue periférico, o componente leucócito do mesmo e as células da medula óssea compreendem células mononucleares, células tronco hematopoiéticas, células dendríticas imaturas, ou células CD4+ das quais as células dendríticas se originam. As citocinas podem ser de ocorrência natural ou do tipo recombinante de gene e métodos para produzi-las não são limitados, desde que atividades seguras e fisiológicas tenham sido observadas. Preferivelmente, a exigência mínima de amostras com qualidades médicas observadas é utilizada. A concentração de citocina adicionado não é especialmente limitada, desde que sejam induzidas células dendríticas. Em geral, uma concentração total de citocina de aproximadamente 10 a 1.000 ng/ml é preferível, e cerca de 20 a 500 ng/ml é ainda mais preferível. A cultura pode ser conduzida com o uso de um meio conhecido que seja geralmente usado para a cultura de leucócitos. A temperatura da cultura não é especialmente limitada, desde que os leucócitos possam ser multiplicados, e a temperatura corporal humana (ou seja, aproximadamente 37°C) é a preferida. Um ambiente gasoso durante a cultura não é especialmente limitado, desde que os leucócitos possam ser multiplicados. A aeração com 5% de CO₂ é preferível. Além disso, não há limite para a duração da cultura, desde que o número necessário de células seja induzido. Geralmente varia de 3 dias a 2 semanas. Um dispositivo adequado pode ser usado para a separação de células na cultura, e é preferível que esse dispositivo tenha segurança médica aprovada e operacionalidade estável e simples. Em especial, dispositivos de cultura de células não se limitam a contêineres comuns tais como o Prato Petri, frascos e garrafas, e contêineres laminados ou de multiestágios, garrafas giratórias,

dispositivo de cultura do tipo saco, colunas de fibra oca ou similares também podem ser usados.

[055] Os polipeptídeos mencionados acima podem ser colocados em contato com células apresentadoras de antígenos *in vitro* através de uma técnica conhecida. Por exemplo, células apresentadoras antígenos podem ser cultivadas em uma solução de cultura contendo tais polipeptídeos. A concentração de peptídeo em um meio não é especialmente limitada. Em geral, é de cerca de 1 para 100 $\mu\text{g/ml}$, e preferivelmente cerca de 5 a 20 $\mu\text{g/ml}$. A densidade da célula durante a cultura não é especialmente limitada, e em geral de cerca de 10^3 to 10^7 células/ml, e preferivelmente cerca de 5×10^4 to 5×10^6 células/ml. É preferível que a cultura seja conduzida a 37°C em 5% de CO_2 de acordo com a técnica convencional. O comprimento do peptídeo que pode ser apresentado na superfície de célula apresentadora de antígeno é geralmente de cerca de 30 resíduos de aminoácidos no máximo. Quando as células apresentadoras de antígenos são colocadas em contato com polipeptídeos *in vitro*, conseqüentemente, o comprimento do polipeptídeo pode ser ajustado para cerca de 30 resíduos de aminoácidos ou menos, embora o comprimento não seja especialmente limitado a isso.

[056] Ao cultivar células apresentadoras de antígenos na presença de polipeptídeos, os peptídeos são incorporados às moléculas MHC das células apresentadoras de antígenos e são apresentados em sua superfície. Assim sendo, as células apresentadoras de antígenos isoladas que contêm o complexo de polipeptídeos e moléculas MHC podem ser preparadas com o uso de tais polipeptídeos. Tais células apresentadoras de antígenos podem apresentar os polipeptídeos a células T *in vivo* ou *in vitro*, induzir células T citotóxicas específicas para polipeptídeos, e multiplicar tais células T.

[057] As células apresentadoras de antígenos preparadas dessa forma, que contêm o complexo de polipeptídeos e moléculas MHC podem ser

postas em contato com células T *in vitro*, de forma que as células T citotóxicas específicas para tais polipeptídeos possam ser induzidas e multiplicadas. Isso pode ser obtido através do cultivo de células apresentadoras de antígenos juntamente com as células T em um meio líquido. Por exemplo, a cultura pode ser conduzida através de suspensão de células apresentadoras de antígeno em um meio líquido, introduzindo a suspensão resultante em um contêiner tais como cavidades de uma microplaca e adicionando células T ao mesmo. A proporção de mistura de células apresentadoras de antígenos às células T no momento da co-cultura não é especialmente limitada, e é geralmente cerca 1:1 a 1:10, e preferivelmente cerca 1:5 a 1:20 em termos de contagem de célula. Igualmente, a densidade das células apresentadoras de antígenos suspensas em um meio líquido não é especialmente limitada, e é geralmente cerca 100 a 10^7 células/ml, e preferivelmente cerca 10^4 a 10^6 células/ml. A co-cultura é preferivelmente realizada de acordo com a técnica convencional a 37°C in 5% de CO₂. A duração da cultura não é especialmente limitada, e é geralmente de 2 dias a 3 semanas, e preferivelmente cerca 4 dias a 2 semanas. É preferível que a co-cultura seja realizada na presença de um tipo único ou de vários tipos de interleucinas, tais como IL-2, IL-6, IL-7, e IL-12. Nesse caso, a concentração de IL-2 ou IL-7 é geralmente cerca de 5 U/ml a 20 U/ml, a concentração de IL-6 é geralmente cerca de 500 U/ml a 2.000 U/ml, e a concentração de IL-12 é geralmente cerca de 5 ng/ml a 20 ng/ml, embora a concentração não seja limitada a isso. A unidade "U" usada aqui indica uma unidade de atividade. A co-cultura pode ser repetida uma vez ou várias vezes com a adição de novas células apresentadoras de antígenos. Por exemplo, a cultura sobrenadante após a co-cultura é descartada, a co-cultura é então realizada com a adição de uma suspensão de células apresentadoras de antígenos novas, e esse procedimento pode ser repetido uma ou várias vezes. A condição de co-cultura pode ser conforme descrito acima.

[058] Células T citotóxicas específicas para os polipeptídeos são induzidas e multiplicadas através da co-cultura. Assim sendo, as células T isoladas que seletivamente se unem ao complexo de polipeptídeos e moléculas MHC podem ser preparadas com o uso dos polipeptídeos acima.

[059] Conforme descrito nos Exemplos abaixo, genes que codificam polipeptídeos de uma sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 são expressos especificamente nas células de câncer, células de leucemia e nas células de linfoma. Portanto, considera-se que um número significativamente maior de polipeptídeos de sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30 estejam presentes nessas células de câncer do que em células normais. Quando alguns polipeptídeos nas células de câncer são apresentados às moléculas MHC na superfície da célula cancerosa e as células T citotóxicas, preparadas conforme descrito acima, são administradas a um ser vivo, as células T citotóxicas podem romper as células cancerosas usando as mesmas como marcador. Assim, as células apresentadoras de antígenos que apresentam os polipeptídeos são capazes de induzir e multiplicar células T citotóxicas específicas para os polipeptídeos *in vivo*, a administração de células apresentadoras de antígenos em um ser vivo também pode romper as células cancerosas. Ou seja, as células T citotóxicas preparadas com o uso de polipeptídeos ou as células apresentadoras antígenos são úteis como agentes terapêuticos e/ou preventivos do câncer com o agente indutor de imunidade da presente invenção.

[060] Quando as células apresentadoras de antígenos isoladas ou as células T isoladas são administradas a um ser vivo, é preferível que tais células isoladas sejam preparadas das células apresentadoras de antígenos ou células T de amostra de um paciente que receba o tratamento com o uso de polipeptídeos (a) a (c) para evitar reação imunológica que reconheça essas células como objetos estranhos e ataque tais células *in vivo*.

[061] A via de administração de um agente terapêutico e/ou preventivo do câncer compreendendo, como ingrediente ativo, as células apresentadoras de antígenos ou células T isoladas é preferivelmente uma via parenteral, tal como administração intravenosa ou intra-arterial. Uma dosagem é adequadamente escolhida de acordo com o sintoma, a finalidade da administração, e outras condições, e em geral, 1 a 10^{13} células, e preferivelmente 10^6 a 10^9 células são usadas para a administração, e tais células são preferivelmente administradas uma vez por vários dias ou vários meses. Uma preparação pode ser, por exemplo, uma suspensão de células em uma solução salina fisiologicamente abrandada em combinação com outros agentes antitumorais ou citocinas. Igualmente, um ou mais aditivos conhecidos no campo de preparações médicas podem ser adicionados.

VACINA BASEADA EM GENE

[062] Polinucleotídeos que codificam os polipeptídeos(a) a (c) podem ser expressos no corpo de um animal-alvo, para que a produção de anticorpos ou de células T citotóxicas possa ser induzida no corpo e efeitos equivalentes aos dos obtidos da administração de um polipeptídeo possam ser obtidos. Especificamente, o agente indutor de imunidade da presente invenção pode abranger polinucleotídeos que codifiquem os polipeptídeos (a) a (c) e incluir como agente ativo, um vetor recombinante capaz de expressar esse polipeptídeo *in vivo*. Esse vetor recombinante capaz de expressar um polipeptídeo antígeno também é chamado de "vacina baseada em gene."

[063] Um vetor usado para preparar uma vacina baseada em gene não é especialmente limitado, desde que possa expressar polipeptídeos de interesse nas células do animal-alvo (preferivelmente células de animal mamífero). Pode ser um vetor plasmídeo ou de vírus, e qualquer vetor conhecido no campo de vacina baseada em gene pode ser usado. Polinucleotídeos, tais como o DNA ou RNA que codificam os polipeptídeos,

podem ser facilmente preparados de acordo com uma técnica convencional descrita acima. Igualmente, os polinucleotídeos podem ser incorporados em um vetor por um método conhecido no estado da arte.

[064] Preferivelmente, uma vacina baseada em gene é administrada de forma parenteral (ou seja, administração intramuscular, subcutânea, intravenosa ou intra-arterial), e a dosagem pode ser selecionada adequadamente de acordo com um tipo de antígeno ou outras condições. Uma dosagem é geralmente de cerca 0,1 µg a 100 mg, e preferivelmente cerca 1 µg a 10 mg, em termos de peso da vacina baseada em gene por kg de peso corporal.

[065] Exemplos de métodos envolvendo o uso de vetores de vírus incluem métodos nos quais o polinucleotídeo que codifica o polipeptídeo acima é incorporado no vírus RNA ou vírus DNA, tais como retrovírus, lentivírus, adenovírus, vírus adeno-associado, herpes vírus, *vaccinia* vírus, poxvírus, poliovírus, ou Sindbis vírus e o animal-alvo é infectado com os mesmos. Os métodos envolvendo o uso de retrovírus, adenovírus, vírus adeno-associado ou *vaccinia* vírus são especialmente preferíveis.

[066] Exemplos de outros métodos incluem um método no qual a expressão plasmídica é administrada diretamente no músculo (o método vacina DNA), o método lipossoma, o Lipofectin método, microinjeção, o método de fosfato de cálcio e eletroporação, com o método de vacina DNA e o método lipossoma sendo especialmente preferíveis.

[067] O gene que codifica o polipeptídeo usado na presente invenção é efetivamente permitido a funcionar como produto farmacêutico pelo método *in vivo* no qual o gene é introduzido diretamente ao corpo ou o método *ex vivo*, no qual uma determinada célula é retirada como amostra do animal alvo, o gene é introduzido na célula *ex vivo*, e a célula é então colocada de volta no corpo (*Nikkei Science* (versão japonesa do Scientific American), April 1994, pp.

20-45, Japan; *Gekkan Yakuji* (the Pharmaceuticals Monthly), 1994, vol. 36, No. 1, pp. 23-48, Japan; *Jikken Igaku Zoukan* (uma edição extra da Experimental Medicine), 1994, vol. 12, No. 15, Japan; e documentos citados a respeito). O método *in vivo* é preferido.

[068] Quando um agente farmacêutico é administrado através do método *in vivo*, o agente pode ser administrado através de uma via adequada, de acordo com as doenças, os sintomas e outras condições do alvo de tratamento. Por exemplo, a administração pode ser feita por via intravenosa, intra-arterial, subcutânea ou intramuscular. Quando o agente é administrado através do método *in vivo*, por exemplo, o agente pode ser na forma de uma droga líquida. Em geral, o agente está em forma de preparação de injeção contendo o DNA que codifica o peptídeo da presente invenção como ingrediente ativo e veículos comuns também podem ser adicionados de acordo com a necessidade. Igualmente, o lipossoma ou lipossoma de fusão de membrana (ou seja, lipossoma vírus hemoaglutinado japonês (HVJ)) compreendendo o DNA pode estar na forma de uma preparação de lipossoma tal como uma suspensão, um criogênio, ou um criogênio condensado por centrifugação.

[069] Na presente invenção, o termo "a sequência de nucleotídeo mostrada pela SEQ ID NO: 1" se refere não apenas à sequência de nucleotídeo que é efetivamente mostrada pela SEQ ID NO: 1, mas também a sequência complementar da mesma. Portanto, o termo "um polinucleotídeo que possui a sequência de nucleotídeo mostrada pela SEQ ID NO: 1" se refere a um polinucleotídeo de cepa única que é efetivamente mostrado pela SEQ ID NO: 1, um polinucleotídeo de cepa única compreendendo uma sequência de nucleotídeo complementar a ele, e um polinucleotídeo de cepa dupla compreendido em tais polinucleotídeos de cepa única. Ao preparar um polinucleotídeo com codificação do polipeptídeo usado na presente invenção,

uma sequência adequada de nucleotídeo deve ser selecionada. Uma pessoa especializada no estado da arte selecionará prontamente essa sequência adequada.

EXEMPLOS

[070] Daqui por diante, a presente invenção é descrita em maior detalhe com referência aos Exemplos, embora o escopo técnico da presente invenção não se limite aos exemplos concretos abaixo.

EXEMPLO 1: AQUISIÇÃO DE NOVA PROTEÍNA ANTÍGENO DE CÂNCER PELO MÉTODO

SEREX:

(1) Preparação da Genoteca cDNA.

[071] O RNA total foi extraído do tecido testicular de um cão saudável pelo método ácido-guanidino-fenol- clorofórmio e o RNA e poli(A) foi purificado com o uso do kit de purificação Oligotex-dT30 mRNA (Takara Shuzo Co., Ltd.) de acordo com os protocolos incluídos no kit.

[072] A genoteca de fagos de cDNA de testículos caninos foi sintetizada usando o mRNA (5 µg) obtido. Uma genoteca de fago cDNA foi preparada usando o Kit de Síntese de cDNA, o Kit de Síntese ZAP-cDNA e o Kit de Clonagem ZAP-cDNA GigapackIII Gold (STRATAGENE) de acordo com os protocolos incluídos nos kits. O tamanho da genoteca de fagos cDNA foi de $7,73 \times 10^5$ pfu/ml.

(2) Triagem da Genoteca cDNA com o uso de soro.

[073] Foi feita a imuno-seleção usando a genoteca de fago de cDNA de testículo canino preparada acima. Especificamente, células hospedeiras *E. coli* (XL1-Blue MRF') foram infectadas com a genoteca de fagos em 2.210 clones através de uma placa de agarose NZY (Φ90 x 15 mm), cultivada a 42°C por 3 a 4 horas para formar placas, a placa estava coberta com uma membrana de nitrocelulose (Hybond C Extra: GE Healthcare Bio-Science) infiltrada com IPTG (isopropil-β-D-tiogalactosida) a 37°C por 4 horas para

induzir e expressar proteínas, e as proteínas foram transferidas para a membrana. Então, a membrana foi recuperada, imersa em TBS contendo 0,5% de leite magro seco (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5), e agitado a 4°C durante uma noite para bloquear uma reação não específica. Permitiu-se que o filtro reagisse com 500 vezes o soro diluído de um cão clinicamente afetado a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas.

[074] Como o soro do cão clinicamente afetado, o soro retirado como amostra de um cão com câncer de mama foi usado. As amostras de soro foram armazenadas a -80°C e pré-tratadas imediatamente antes do uso. As amostras de soro foram pré-tratadas da seguinte forma: especificamente, células hospedeiras *E. coli* (XL1-BLue MRF') foram infectadas com fagos λ ZAP Express nos quais não foram introduzidos quaisquer genes estranhos, e foi então realizada a cultura no meio de placa NZY a 37°C durante uma noite. Em seguida, o *buffer* 0,2 M NaHCO₃ (pH 8,3) contendo 0,5M de NaCl foi adicionado às placas. A placa suportou a temperatura de 4°C por 15 horas, e o sobrenadante foi recuperado como extrato de fago de *E. coli*. Posteriormente, o extrato de fago recuperado de *E. coli* pôde fluir através da coluna NHS (GE Healthcare Bio-Science), e proteínas derivadas dos fagos de *E. coli* foram imobilizadas nele. O soro de um cão clinicamente afetado pôde fluir através da linha imobilizada de proteínas para reagir com ela, e os anticorpos que haviam sido absorvidos pelo *E. coli* e fagos foram removidos do soro. A fração do soro que havia fluído através da coluna foi diluída 500 vezes com TBS contendo 0,5% de leite magro seco e o resultante foi usado como amostra de imuno seleção.

[075] A membrana na qual o soro tratado e a proteína de fusão acima mencionada foram manchados, foi lavada 4 vezes com TBS-T (0,05% Tween 20/TBS), O IgG anti-cão de cabra (IgG-h+I HRP anti-cão de cabra conjugado: BETHYL Laboratories), que foi diluída 5.000 vezes com TBS

contendo 0,5% de leite magro seco como anticorpo secundário, pôde reagir com isso a temperatura ambiente durante 1 hora, e a detecção foi realizada através de reação de desenvolvimento de cor enzimática usando a solução de reação NBT/BCIP (Roche), colônias que correspondem à região positiva para desenvolvimento de cor foram removidas da placa NZY de agarose ($\Phi 90 \times 15$ mm), e as colônias removidas foram dissolvidas em 500 μ l de *buffer* SM (100 mM NaCl, 10 mM MgClSO₄, 50 mM Tris-HCl, 0,01% de gelatina, pH 7,5). As seleções secundárias e terciárias foram repetidas até que as colônias com desenvolvimento positivo de cor representassem os únicos clones, da mesma forma que descrito acima, e 5 clones positivos foram isolados como resultado da seleção de 30.940 clones de fagos que reagiram com IgG no soro.

(3) Busca de homologia de gene antígeno isolado.

[076] Para sujeitar os 5 clones positivos isolados da forma descrita acima a uma sequência de análise de nucleotídeo, os vetores de fagos foram convertidos em vetores plasmídicos. Especificamente, 200 μ l de uma solução de *E. coli* hospedeiro (XL1-Blue MRF') ajustado a OD₆₀₀ de 1,0 foi misturada com 250 μ l da solução de fago purificado e 1 μ l de fago de auxílio ExAssist (STRATAGENE), o resultante foi submetido à reação a 37°C por 15 minutos, 3 ml de meio LB foi adicionado, a cultura foi realizada a 37°C por 2,5 a 3 horas, o produto da cultura foi incubado em banho de água a 70°C por 20 minutos imediatamente após e o resultante foi centrifugado a 4°C e 1.000 x g por 15 minutos, e o sobrenadante foi recuperado como uma solução fagocita. Posteriormente, 200 μ l da solução de *E. coli* hospedeiro fagocito (SOLR) ajustada a OD₆₀₀ de 1,0 foi misturada a 10 μ l solução purificada de fago, o resultante foi submetido à reação a 37°C por 15 minutos, 50 μ l disso foi disseminado em um meio ágar LB contendo ampicilina (concentração final: 50 μ g/ml), e a cultura foi realizada a 37°C durante uma noite. Uma única colônia do SOLR transformado foi pega e cultivada em meio de ágar LB contendo

ampicilina (concentração final: 50 µg/ml) a 37°C, e o DNA plasmídeo que possui uma inserção de interesse foi purificado utilizando o kit Miniprep de plasmídeo QIAGEN (QIAGEN).

[077] O plasmídeo purificado foi submetido à análise da sequência completa da inserção via *primer walking* usando o *primer* T3 de SEQ ID NO: 31 e o *primer* T7 da SEQ ID NO: 32. As sequências de gene mostradas pelas SEQ ID NOs: 5, 7, 9, 11, e 13 foram obtidas através da análise de sequência. A sequência de nucleotídeo dos genes e a sequência de aminoácidos dos mesmos (SEQ ID NOs: 6, 8, 10, 12, e 14) foram usadas para realizar a busca de homologia com os genes conhecidos com a utilização de um programa de busca de homologia, BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Como resultado, em todos 5 genes obtidos foram encontrados a codificação de CAPRIN-1. A identidade de sequência entre os 5 genes foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 100% e a sequência de identidade de aminoácidos de 99% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A identidade de sequência do gene com codificação de homólogo humano foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 94% e a sequência de identidade de aminoácidos de 98% em regiões a serem traduzidas em proteínas. As sequências de nucleotídeo dos homólogos humanos são mostradas pelas SEQ ID NOs: 1 e 3 e a sequência de aminoácidos disso é mostrada pelas SEQ ID NOs: 2 e 4. A identidade de sequência do gene canino obtido que codifica o homólogo bovino foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 94% e a sequência de identidade de aminoácidos de 97% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A sequência de nucleotídeo do homólogo bovino é mostrada pela SEQ ID NO: 15 e a sequência de aminoácidos disso é mostrada pela SEQ ID NO: 16. A identidade de sequência entre o gene que codifica o homólogo humano e o gene que codifica o homólogo bovino foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 94% e a sequência de identidade de

aminoácidos de 93% a 97% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A identidade de sequência do gene canino obtido com o gene que codifica um homólogo cavalo foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 93% e a sequência de identidade de aminoácidos de 97% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A sequência de nucleotídeo do homólogo cavalo é mostrada pela SEQ ID NO: 17 e a sequência de aminoácidos do mesmo é mostrada pela SEQ ID NO: 18. A identidade de sequência entre o gene que codifica o homólogo humano e o gene que codifica o homólogo cavalo foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 93% e a sequência de identidade de aminoácidos de 96% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A identidade de sequência do gene canino obtido com um gene que codifica um homólogo camundongo foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 87% a 89% e a sequência de identidade de aminoácidos de 95% a 97% em regiões a serem traduzidas em proteínas. As sequências de nucleotídeo do homólogo camundongo são mostradas pelas SEQ ID NOs: 19, 21, 23, 25, e 27 e a sequência de aminoácidos disso é mostradas pelas SEQ ID NOs: 20, 22, 24, 26, e 28. A identidade de sequência entre um gene que codifica um homólogo humano e um gene que codifica um homólogo camundongo foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 89% a 91% e a sequência de identidade de aminoácidos de 95% a 96% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A identidade de sequência do gene canino obtido com o gene que codifica um homólogo-galinha foi a seguinte: a sequência de identidade de nucleotídeo de 82% e a sequência de identidade de aminoácidos de 87% em regiões a serem traduzidas em proteínas. A sequência de nucleotídeo do homólogo galinha é mostrada pela SEQ ID NO: 29 e a sequência de aminoácidos disso é mostrada pela SEQ ID NO: 30. A identidade de sequência entre um gene que codifica um homólogo humano e um gene que codifica um homólogo-galinha foi a seguinte: a sequência de identidade de

nucleotídeo de 81% a 82% e a sequência de identidade de aminoácidos de 86% em regiões a serem traduzidas em proteínas.

(4) Análise de expressão de gene no tecido.

[078] A expressão dos genes obtidos da forma acima descrita em tecidos normais caninos e humanos e várias cepas de células foram examinadas através de transcrição reversa PCR (RT-PCR). A transcrição reversa foi realizada da seguinte maneira: especificamente, o RNA total foi extraído de 50 a 100 mg de amostras de tecidos e 5 a 10×10^6 de cepas de célula com o uso do reagente TRIzol (Invitrogen) de acordo com o protocolo incluído no mesmo. O cDNA foi sintetizado com o uso do RNA totalmente extraído usando o Sistema Superscript First-Strand Synthesis por RT-PCR (Invitrogen) de acordo com o protocolo incluído no mesmo. O PCR foi realizado usando *primers* específicos para os genes obtidos (mostrado pelas SEQ ID NOs: 33 e 34) da seguinte forma: especificamente, reagentes (0,25 μ l de uma amostra preparada por transcrição reversa, 2 μ M de cada dos *primers*, 0,2 mM de cada dNTPs, e 0,65 U de polimerase ExTaq (Takara Shuzo Co., Ltd.)) foram misturados a um *buffer* acompanhante a ser ajustado para ficar compatível ao volume total de 25 μ l. O resultante foi submetido à reação de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos usando o Thermal Cycler (BIO RAD). Os *primers* gene específicos acima foram usados para amplificar uma região dos nucleotídeos 206 a 632 de uma sequência de nucleotídeo mostrada pela SEQ ID NO: 5 (ou seja, o gene canino CAPRIN-1) e a região dos nucleotídeos 698 a 1124 de uma sequência de nucleotídeo mostrada pela SEQ ID NO: 1 (ou seja, o gene humano CAPRIN-1). Por comparação, *primers* GAPDH específicos (conforme mostrado por SEQ ID NOs: 35 e 36) foram simultaneamente usados. Como resultado, uma potente expressão foi observada em tecido testicular saudável de caninos, e uma expressão foi observada em tecido canino com câncer de mama e

adenocarcinoma, mostrado Na Fig. 1. Além disso, a expressão do homólogo humano do gene obtido foi também examinada e sua expressão foi observada apenas nos testículos no caso de tecido normal, conforme o caso do gene canino CAPRIN-1. No entanto, a expressão disso foi detectada em uma ampla variedade de linhas de células cancerosas, tais como o câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, câncer de pulmão e linhas celulares de câncer de esôfago e, em particular, a expressão disso foi observada em muitas linhas celulares de câncer de mama. Os resultados demonstram que a expressão CAPRIN-1 não é observada em tecidos normais a não ser no tecido de testículos, no entanto, CAPRIN-1 é expressa em muitas células cancerosas, e linhas de células de câncer de mama, em especial.

[079] Na Fig. 1, o número de referência 1 no eixo vertical mostra o padrão de expressão do gene identificado acima e o número de referência 2 mostra o padrão de expressão do gene GAPDH de controle.

(5) Coloração imuno histoquímica.

(5)-1: Expressão de CAPRIN-1 em tecido normal de camundongos e canino.

[080] Camundongos (Balb/c, fêmea) e cães (cães beagle, fêmeas) foram dessangrados sob anestesia e sob anestesia de quetamina/isoflurano, a cavidade abdominal foi aberta e os órgãos (estômago, fígado, globo ocular, timo, músculo, medula, útero, intestino delgado, esôfago, coração, rins, glândula salivar, intestino grosso, glândula mamária, cérebro, pulmão, glândula suprarrenal, ovário, pâncreas, baço e vesícula) foram independentemente transferidos para um PBS contendo um prato de 10-cm. Os órgãos sofreram incisão no PBS e foram imobilizados com 0,1 M de *buffer* de fosfato contendo 4% de paraformol (PFA) (pH 7,4) sob condições de refluxo durante uma noite. Uma solução de refluxo foi descartada, as superfícies do tecido dos órgãos foram enxaguadas com PBS, uma solução de PBS contendo 10% de sacarose

foi introduzida em um tubo centrífugo de 50-ml e os tecidos foram introduzidos nele e agitados a 4°C por 2 horas usando um rotor. O resultante foi transferido para uma solução PBS contendo 20% de sacarose, tendo ficado a 4°C até que os tecidos se estabilizassem, e então foi transferido para uma solução PBS contendo 30% de sacarose e tendo ficado 4°C até que os tecidos se estabilizassem. Os tecidos foram removidos e as regiões necessárias foram extirpadas usando um bisturi cirúrgico. Posteriormente, o composto OCT (Tissue Tek) foi aplicado na superfície do tecido, e os tecidos foram então colocados no Criomolde. Após o Criomolde, foram colocados em gelo seco e rapidamente congelados, os tecidos foram cortados em uma espessura de 10 µm a 20 µm usando o criostato (LEICA), e as fatias de tecido nas lâminas de vidro foram secas ao ar de um secador de cabelos por 30 minutos para o preparo de lâminas de vidro com tecidos nelas. Em seguida, as lâminas de vidro foram introduzidas em um jarro de coloração contendo PBS-T (solução salina fisiológica contendo 0,05% Tween 20), PBS-T foi substituída por PBS-T novo a cada 5 minutos, e esse procedimento foi repetido 3 vezes. A umidade a mais entre as fatias foi enxuta usando Kimwipes, as fatias foram envoltas com Dakopen (DAKO), um reagente de bloqueio dos camundongos MOM (VECTASTAIN) foi colocado nos tecidos de camundongos como solução bloqueadora, uma solução PBS-T contendo 10% de soro bovino fetal foi colocada no tecido canino como solução de bloqueio e descansaram em uma câmara úmida a temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, uma solução ajustada para possuir um anticorpo monoclonal contra a CAPRIN-1 que possui a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78 e a região de cadeia leve variável de SEQ ID NO: 79 a 10 µg/ml com uma solução bloqueadora, que reage com a superfície da célula cancerosa preparada no Exemplo de referência 1, foi aplicada e o resultante descansou em uma câmara unida a 4°C durante a noite. Após isso, as lâminas de vidro foram lavadas 3 vezes com

PBS-T por 10 minutos, o anticorpo anti_IgG marcado com biotina (VECTASTAIN) foi diluído 250-vezes com a adição de uma solução de bloqueio e então ficou descansando em uma câmara úmida por 1 hora. Após isso, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS-T por 10 minutos, um reagente ABC avidina-biotina (VECTASTAIN) foi aplicado e as lâminas descansaram em uma câmara úmida a temperatura ambiente por 5 minutos. Após isso, as lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS-T por 10 minutos, uma solução de revelação de coloração DAB (10 mg de DAB + 10 µl de 30% H₂O₂/0,05 M Tris-HCl, pH 7,6, 50 ml) foi aplicada e as lâminas descansaram em uma câmara úmida em temperatura ambiente por 30 minutos. As lâminas foram enxaguadas com água destilada, um reagente de hematoxilina (DAKO) foi aplicado, e as lâminas descansaram em temperatura ambiente por 1 minuto, seguido de enxague com água destilada. As lâminas de vidro foram sucessivamente mergulhadas em 70%, 80%, 90%, 95%, e 100% de soluções de etanol por 1 minuto cada e então descansaram em xileno durante a noite. As lâminas de vidro foram removidas, equipadas com um Meio de Montagem Glycergel (DAKO), e então observadas. Como resultado, uma fraca expressão CAPRIN-1 foi observada nas células da glândula salivar, nos rins, no cólon e tecidos gástricos, no entanto uma expressão não foi observada nas superfícies das células, e nenhuma expressão foi observada nos tecidos derivados de outros órgãos.

(5)-2: Expressão de CAPRIN-1 em tecido canino com câncer de mama.

[081] Os 108 espécimes de tecido congelado com câncer de mama em cães, que foram diagnosticados como possuidores de câncer maligno de mama através de diagnóstico patológico, foram usados para preparar lâminas com fatias congeladas dos mesmos e para realização de coloração imunohistoquímica através do uso de um anticorpo monoclonal contra a CAPRIN-1 que possui a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78 e a

região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 79 da forma descrita acima. Como resultado, a expressão CAPRIN-1 foi observada em 100 dos 108 espécimes (92,5 %), e a expressão CAPRIN-1 foi encontrada como sendo especialmente potente na superfície da célula cancerosa com um alto grau de atipia.

(5)-3: Expressão de CAPRIN-1 em tecido humano com câncer de mama.

[082] A coloração imunohistoquímica foi feita em 188 espécimes de tecido de câncer de mama em um arranjo de tecido de câncer de mama humana embebido em parafina (BIOMAX). O arranjo de tecido de câncer de mama foi tratado a 60°C por 3 horas, o arranjo foi introduzido em um jarro de coloração com xileno, o xileno foi substituído por xileno renovado a cada 5 minutos, e esse procedimento foi repetido 3 vezes. Em seguida, procedimentos similares foram repetidos com o uso de etanol e PBS-T ao invés de xileno. O arranjo de tecido de câncer de mama foi introduzido em um jarro de coloração com 10 mM de *buffer* de citrato contendo 0,05% Tween 20 (pH 6,0), o arranjo foi tratado a 125°C por 5 minutos, e o arranjo foi levado a descanso em temperatura ambiente por pelo menos 40 minutos. A umidade a mais em torno das fatias foi limpa com a utilização de Kimwipes, o tecido foi envolto com Dakopen, e uma quantidade adequada de Bloqueador de Água oxigenada (DAKO) foi adicionada a ele, gota a gota. Posteriormente, o arranjo foi colocado em descanso em temperatura ambiente por 5 minutos, o arranjo foi colocado em um jarro de coloração com PBS-T, o PBS-T foi substituído por PBS-T renovado a cada 5 minutos, e esse procedimento foi repetido 3 vezes. Uma solução PBS-T contendo 10% FBS foi aplicada como solução de bloqueio, e foi colocado em descanso em uma câmara úmida em temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, a solução ajustada para conter um anticorpo monoclonal contra a CAPRIN-1 que possui a região variável de cadeia pesada de SEQ ID

NO: 78 e a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 79 a 10 µg/ml com a solução PBS-T contendo 5% de FBS, que reage com a superfície da célula cancerosa preparada no Exemplo de Referência 1, foi aplicada e o arranjo foi colocado em descanso em uma câmara úmida a 4°C durante a noite. Após, o arranjo foi lavado 3 vezes com PBS-T por 10 minutos, uma quantidade adequada do Conjugado Etiquetado de Água Oxigenada (DAKO) foi adicionada gota a gota, e o arranjo foi então colocado em descanso na câmara úmida em temperatura ambiente por 30 minutos. Depois, o arranjo foi lavado 3 vezes com PBS-T por 10 minutos, uma solução de revelação de cor DAB (DAKO) Ihe foi aplicada, o arranjo foi colocado em descanso em temperatura ambiente por cerca 10 minutos, e a solução reveladora de cor foi descartada. O arranjo foi lavado 3 vezes com PBS-T por 10 minutos, enxaguado com água destilada, sucessivamente mergulhado em 70%, 80%, 90%, 95%, e 100% de soluções de etanol por 1 minuto cada, e então colocado em descanso em xileno por uma noite. As lâminas de vidro foram removidas, equipadas com o Meio de Montagem Glycergel (DAKO), e então observadas. Como resultado, uma potente expressão CAPRIN-1 foi observada em 138 de todos os 188 espécimes de tecido de câncer de mama (73%).

(5)-4: A expressão CAPRIN-1 em tumor cerebral maligno humano.

[083] A coloração imunohistoquímica foi realizada em 247 espécimes de tecido de tumor cerebral maligno em um arranjo de tecido de tumor cerebral maligno humano embebido em parafina (BIOMAX), com um anticorpo monoclonal contra CAPRIN-1 que possui a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78 e a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 79 da mesma forma que em (5)-3 acima. Como resultado, uma potente expressão CAPRIN-1 foi observada em 227 de todos os 247 espécimes de tecido de tumor cerebral maligno (92%).

(5)-5: A expressão CAPRIN-1 em espécimes de tecido de tumor

cerebral maligno.

[084] A coloração imunohistoquímica foi realizada em 150 espécimes de tecidos de gânglio linfático com metástase de câncer de mama em um arranjo de tecido de gânglio linfático com metástase de câncer de mama humano embebido em parafina (BIOMAX), com um anticorpo monoclonal contra CAPRIN-1 que possui a região variável de cadeia pesada de SEQ ID NO: 78 e a região variável de cadeia leve de SEQ ID NO: 79 da mesma forma que em (5)-3 acima. Como resultado, uma potente expressão CAPRIN-1 foi observada em 136 de todos os 150 espécimes de gânglio linfático com metástase de câncer de mama (90%). A expressão CAPRIN-1 foi considerada como sendo potente em tecido canceroso com metástase de câncer de mama.

EXEMPLO DE REFERÊNCIA 1: PREPARAÇÃO DO ANTICORPO MONOCLONAL CONTRA CAPRIN-1

[085] 100 µg da proteína de antígeno de SEQ ID NO: 2 preparada no Exemplo 2 (CAPRIN-1 humana) foi misturada com a quantidade equivalente de adjuvante MPL+TDM (Sigma Corporation), e a mistura foi usada como solução antígenica para camundongos. A solução antígenica foi administrada de forma intraperitoneal a camundongos Balb/c de seis meses de idade (Japan SLC, Inc.), e a solução foi administrada 3 mais vezes a cada semana. O baço foi removido 3 dias depois, a imunização final foi interposta entre duas lâminas de vidro, assentada, lavada com PBS(-) (Nissui), e centrifugada a 1.500 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi removido. Esse procedimento foi repetido 3 vezes para obtenção das células de baço. As células de baço obtidas foram misturadas com as células de mieloma de camundongos SP2/0 (comprados da ATCC) a 10:1, uma solução PEG foi preparada misturando 200 µl de meio RPMI 1640 contendo 10% FBS com 800 µl de PEG1500 (Boehringer) aquecida a 37°C e adicionada ao mesmo, e o resultante foi colocado em descanso por 5 minutos para realização da fusão de célula. O resultante foi centrifugado a 1.700

rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi removido, as células foram suspensas em 150 ml de um meio RPMI 1640 contendo 15% de FBS ao qual 2% de equivalentes de uma solução HAT (Gibco) haviam sido adicionados (meio de seleção HAT), e 100 µl de cada um foram disseminados por poço de 15 placas de poço 96 (Nunc). A cultura foi realizada por 7 dias a 37°C em 5% CO₂ para obter hibridomas resultantes da fusão das células de baço com células de mieloma.

[086] Hibridomas foram selecionados utilizando a afinidade de ligação do anticorpo produzido pelos hibridomas resultantes à proteína CAPRIN-1 como indicador. A solução proteica CAPRIN-1 (1 µg/ml) preparada no Exemplo 2 foi adicionada à placa de 96 poços em quantidades de 100 µl por poço, e a placa foi colocada em descanso a 4°C por 18 horas. Os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T, uma solução de 0,5% de soro de albumina bovina (BSA) (Sigma Corporation) foi adicionada em quantidades de 400µl por poço, e a placa foi colocada em descanso em temperatura ambiente por 3 horas. A solução foi removida, os poços foram lavados 3 vezes com 400 µl de PBS-T por poço, a cultura de sobrenadantes dos hibridomas obtidos acima foi adicionada em quantidades de 100 µl por poço, e a placa foi colocada em descanso em temperatura ambiente por 2 horas. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T, o anticorpo etiquetado HRP anti-camundongos IgG (H+L) (Invitrogen) diluído 5.000 vezes com PBS foi adicionado em quantidades de 100 µl por poço, e a placa foi colocada em descanso em temperatura ambiente por 1 hora. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T, uma solução substrato de TMB (Thermo) foi adicionada em quantidades de 100 µl por poço, e a placa foi colocada em descanso por 15 a 30 minutos para criação de uma reação de desenvolvimento de cor. Depois, a cor foi revelada, foi adicionado 1N de ácido sulfúrico em quantidades de 100 µl por poço para concluir a reação, e a absorvância a 450 nm e a 595 nm foram testadas utilizando espectrômetro de

absorção. Como resultado, uma pluralidade de hibridomas produzindo anticorpos com altos valores de absorvância foram selecionados.

[087] Os hibridomas selecionados foram adicionados a uma placa de 96 poços em quantidades de 0,5 células por poço e cultivados. Uma semana depois, alguns hibridomas foram observados formando colônias únicas em poços. As células nesses poços foram novamente cultivadas e hibridomas foram selecionados utilizando a afinidade de ligação de anticorpos produzidos dos hibridomas clonados à proteína CAPRIN-1 como indicador. A solução proteica CAPRIN-1 (1 µg/ml) preparada no Exemplo 2 foi adicionado a placas de 96 poços em quantidades de 100 µl por poço e a placa foi colocada em descanso a 4°C por 18 horas. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T, 0,5% de solução BSA foi adicionado em quantidades de 400 µl por poço e a placa foi colocada em descanso em temperatura ambiente por 3 horas. A solução foi removida, os poços foram lavados 3 vezes com 400 µl de PBS-T por poço, a cultura de sobrenadantes dos hibridomas obtidos acima foi adicionada em quantidades de 100 µl por poço, e a placa foi colocada em descanso em temperatura ambiente por 2 horas. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T, o anticorpo etiquetado HRP anti-camundongos IgG (H+L) (Invitrogen) diluído 5.000 vezes com PBS foi adicionado em quantidades de 100 µl por poço e a placa foi colocada em descanso em temperatura ambiente por 1 hora. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com PBS-T, uma solução de substrato TMB (Thermo) foi adicionada em quantidades de 100 µl por poço e a placa foi colocada em descanso por 15 a 30 minutos para criação de uma reação de desenvolvimento de cor. Depois, a cor foi revelada, ácido sulfúrico 1N foi adicionado em quantidades de 100 µl por poço para concluir a reação, e a absorvância a 450 nm e a 595 nm foi testada utilizando um espectrômetro de absorção. Como resultado, uma pluralidade de cepas de hibridoma produzindo anticorpos monoclonais apresentando reatividade à proteína CAPRIN-1 foram

obtidas, a cultura sobrenadante de hibridomas foi purificada utilizando um veículo de proteína G para obter 150 anticorpos monoclonais de ligação à proteína CAPRIN-1.

[088] Em seguida, anticorpos monoclonais que possuem reatividade com as superfícies das células de câncer de mama expressando CAPRIN-1 foram selecionados entre os anticorpos monoclonais acima. Especificamente, 10^6 de células da linha celular de câncer de mama humano, MDA-MB-231V, foram centrifugados em um tubo microcentrifugador de 1,5 ml, 100 μ l de sobrenadantes de hibridoma preparado acima foi adicionado a isso e os resultantes descansaram no gelo por 1 hora. Depois, a placa foi lavada com PBS, o anticorpo etiquetado FITC de cabra anti-camundongos IgG (Invitrogen) diluído 500 vezes com PBS contendo 0,1% de soro fetal bovino foi adicionado e a placa foi colocada em descanso no gelo por 1 hora. Depois, a placa foi lavada com PBS, a intensidade de fluorescência foi medida utilizando o FACSCalibur (Becton Dickinson). Separadamente, como controle, o mesmo procedimento foi realizado, exceto pela adição de um meio ao invés dos anticorpos. Como resultado, 11 anticorpos monoclonais exibindo intensidade de fluorescência mais elevada do que o controle; ou seja, 11 anticorpos monoclonais que reagem com as superfícies das células de câncer de mama foram selecionados. A sequência de região variável de cadeia pesada de um de tais anticorpos monoclonais é mostrada pela SEQ ID NO: 78 e a da região variável de cadeia leve é mostrada pela SEQ ID NO: 79.

EXEMPLO 2: PREPARAÇÃO DE PROTEÍNAS NOVAS ANTÍGENOS DE CÂNCER HUMANO E

CANINO

(1) Preparação de proteína recombinante.

[089] A proteína recombinante foi preparada utilizando o gene de SEQ ID NO: 5 obtido no Exemplo 1 da forma descrita abaixo. Os reagentes (o vetor (1 μ l) preparados da solução fagocita obtida no Exemplo 1 e submetido a

análise de sequência, 0,4 µM cada um de dois tipos de *primers* contendo sítios de restrição *NdeI* e *KpnI* (SEQ ID NOs: 37 e 38), 0,2 mM de dNTPs, e 1,25 U de PrimeSTAR polimerase HS (Takara Shuzo Co., Ltd.) foram misturados com o *buffer* acompanhante para ser ajustado para ser compatível ao volume total de 50 µl. O resultante foi submetido à reação de 30 ciclos a 98°C por 10 segundos e 68°C por 1,5 minutos, utilizando o Thermal Cycler (BIO RAD). Os dois tipos de *primers* acima foram usados para ampliar a região que codifica a sequência total de aminoácidos da SEQ ID NO: 6. Depois, o PCR foi realizado, o DNA amplificado sofreu eletroforese em 1% de gel de agarose, e um fragmento de DNA de cerca 1,4 kbp foi purificado utilizando o Kit de Extração de Gel QIAquick (QIAGEN).

[090] O fragmento purificado de DNA foi ligado ao vetor de clonagem pCR-Blunt (Invitrogen). O resultante foi transformado em *E. coli*, o plasmídeo foi recuperado, e o fragmento de gene amplificado foi confirmado como igual à sequência de interesse através de sequenciamento. O plasmídeo, que foi revelado como igual à sequência de interesse, foi tratado com enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI*, o resultante foi purificado com o Kit de Extração QIAquick Gel e a sequência de genes de interesse foi inserida a um vetor de expressão de *E. coli* (pET30b, Novagen) tratado com as enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI*. A utilização desse vetor possibilita a produção da proteína recombinante His-tag fusionada. O plasmídeo foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) e induzido com 1 mM IPTG para expressar a proteína de interesse no *E. coli*.

[091] Separadamente, uma proteína recombinante de gene homólogo canino foi preparada utilizando o gene de SEQ ID NO: 7 na forma descrita abaixo. Reagentes (cDNA (1 µl), cuja expressão foi confirmada via RT-PCR entre o tecido ou cDNA celular preparado no Exemplo 1, 0,4 µM de cada dois tipos de *primers* contendo sítios de restrição *NdeI* e *KpnI* [SEQ ID

NOs: 39 e 40), 0,2 mM de dNTPs, e 1,25 U de polimerase PrimeSTAR HS (Takara Shuzo Co., Ltd.) foram misturados com um *buffer* acompanhante para serem ajustados para a paridade com o volume total de 50 µl. O resultante foi submetido à reação de 30 ciclos a 98°C por 10 segundos e 68°C por 2,5 minutos, utilizando o Thermal Cycler (BIO RAD). Os dois tipos de *primers* acima foram usados para amplificar a região com codificação de toda a sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 8. Depois, o PCR foi realizado, o DNA amplificado sofreu eletroforese a 1% de gel de agarose, e um fragmento de DNA de cerca 2,2 kbp foi purificado utilizando o Kit de extração de Gel QIAquick (QIAGEN).

[092] The fragmento purificado de DNA foi ligado ao vetor de clonagem pCR-Blunt (Invitrogen). O resultante foi transformado em *E. coli*, o plasmídeo foi recuperado, e o fragmento de gene amplificado foi confirmado como combinante com a sequência de interesse através do sequenciamento. O plasmídeo, que havia sido encontrado compatível à sequência de interesse, foi tratado com enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI*, o resultante foi purificado com o Kit de Extração de Gel QIAquick e a sequência de genes de interesse foi inserida a um vetor de expressão de *E. coli* (pET30b, Novagen) tratado com enzimas de restrição *NdeI* e *KpnI*. A utilização desse vetor possibilita a produção da proteína recombinante His-tag fusionada. O plasmídeo foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) e induzido com 1 mM IPTG para expressar a proteína de interesse no *E. coli*.

[093] A proteína recombinante do gene homólogo humano foi preparada utilizando o gene de SEQ ID NO: 1 da forma descrita abaixo. Os reagentes (cDNA (1 µl), cuja expressão foi confirmada via RT-PCR entre o tecido ou cDNA da célula preparada no Exemplo 1, 0,4 µM de cada de dois tipos de *primers* contendo sítios de restrição *SacI* e *XhoI* [SEQ ID NOs: 41 e 42), 0,2 mM de dNTPs, e 1,25 U de polimerase PrimeSTAR HS (Takara Shuzo Co., Ltd.) foram misturados com um *buffer* acompanhante a ser ajustada para ser

compatível ao volume total de 50 µl. O resultante foi submetido à reação de 30 ciclos a 98°C por 10 segundos e 68°C por 2,5 minutos, utilizando o Thermal Cycler (BIO RAD). Os dois tipos de *primers* acima foram usados para amplificar a região que codifica a sequência total de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. Depois, o PCR foi realizado, o DNA amplificado sofreu eletroforese em 1% de gel de agarose, e um fragmento de DNA de cerca 2,1 kbp foi purificado utilizando o Kit de Extração de Gel QIAquick (QIAGEN).

[094] O fragmento de DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem pCR-Blunt (Invitrogen). O resultante foi transformado em *E. coli*, o plasmídeo foi recuperado, e o fragmento de gene amplificado foi confirmado como compatível à sequência de interesse via sequenciamento. O plasmídeo, que foi revelado como compatível com a sequência de interesse, foi tratado com as enzimas de restrição de *SacI* e *XhoI*, o resultante foi purificado com o Kit de Extração de Gel QIAquick Gel, e o gene da sequência de interesse foi inserido a um vetor de expressão de *E. coli* (pET30a, Novagen) tratado com enzimas de restrição *SacI* e *XhoI*. A utilização desse vetor possibilita a produção da proteína recombinante His-tag fusionada. O plasmídeo foi transformado em *E. coli* BL21 (DE3) e induzido com 1 mM IPTG para expressar a proteína de interesse no *E. coli*.

(2) Purificação de proteína recombinante.

[095] As células recombinantes *E coli* expressando o gene de SEQ ID NO: 1, 5, ou 7 obtido acima foram cultivadas em meio LB contendo 30 µg/ml de canamicina a 37°C até que uma absorvância a 600 nm se tornasse aproximadamente de 0,7, foi adicionado isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo a uma concentração final de 1 mM, e cultura foi realizada a 37°C por 4 horas. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 4.800 rpm por 10 minutos e colhidas. O sedimento de célula sofreu suspensão em solução salina fisiológica com *buffer* de fosfato, o resultante foi centrifugado a 4.800 rpm por 10 minutos

adicionais e as células foram então lavadas.

[096] As células sofreram suspensão em solução salina fisiológica com *buffer* de fosfato e rompidas com ultrassom no gelo. A solução de células *E. coli* rompidas por ultrassom foi centrifugada a 6.000 rpm por 20 minutos, o sobrenadante resultante foi designado como fração solúvel e o precipitado foi designado como fração insolúvel.

[097] A fração solúvel foi adicionada a uma coluna quelante de níquel preparada de acordo com a técnica convencional (veículo: Sefarose™ Quelante Fast Flow (GE Health Care); volume da coluna: 5 ml; *buffer* de equilíbrio: 50 mM *buffer* de hidrocloreto, pH 8,0). Uma fração não absorvida foi lavada com 10 volumes de coluna de 50 mM de *buffer* de hidrocloreto (pH 8,0) e 20 mM de *buffer* de fosfato contendo 20 mM de imidazol (pH 8,0), seguido de precipitação com 6 volumes *bed* de 20 mM de *buffer* de fosfato contendo 100 mM de imidazol (pH 8,0) imediatamente após. A fração precipitada com 20 mM de *buffer* de fosfato contendo 100 mM de imidazol (pH 8,0), em cuja precipitação a proteína de interesse havia sido confirmada através de coloração Coomassie, foi adicionada a uma coluna de troca forte de ânion (veículo: Q Sepharose™ Fast Flow (GE Health Care); volume de coluna: 5 ml; 20 mM *buffer* de fosfato (pH 8,0) como *buffer* de equilíbrio). Uma fração não absorvida foi lavada com 10 volumes de coluna de 20 mM de *buffer* de fosfato (pH 7,0) e 20 mM de *buffer* de fosfato contendo 200 mM de cloreto de sódio (pH 7,0), seguida de precipitação com 5 volumes leito de 20 mM de *buffer* de fosfato contendo 400 de cloreto de sódio (pH 7,0) imediatamente após. As frações purificadas de proteínas cada uma compreendendo uma sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NOs: 2, 6, e 8 foram obtidas e então designadas como materiais para teste de administração.

[098] Uma fração (200 µl) de amostras do purificado obtido pelo método descrito acima foi dispensada em 1 ml do *buffer* de reação (20 mM

Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, pH 7,4), 2 µl de enteroquinase (Novagen) foi adicionada, o resultante foi colocado em descanso em temperatura ambiente por uma noite, a reação foi continuada, uma His-tag foi separada, e a purificação foi então realizada utilizando o Kit de Separação de Enteroquinase (Novagen) de acordo com os protocolos que o acompanham. Em seguida, 1,2 ml da amostra purificada obtida pelo método descrito acima foi submetido a substituição de *buffer* com solução salina *buffer* de fosfato (Nissui) via ultrafiltração utilizando Nanosep 10K Omega (Palla filtração asséptica foi realizada com HT Tuffryn Acrodisc (tamanho de poro: 0,22 µm, Pall), e o resultante foi usado no seguinte experimento.

EXEMPLO 3: TESTE DE ADMINISTRAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE EM CÃO

PORTADOR DE CÂNCER

(1) Avaliação de Antitumor.

[099] Um cão portador de câncer (câncer de mama) que possui um tumor na epiderme foi submetido à avaliação de efeitos antitumorais da proteína recombinante purificada acima.

[0100] O polipeptídeo recombinante que possui a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 6 purificado da forma acima descrita (100 µg, 0,5 ml) foi misturado com a quantidade equivalente quantidade de Adjuvante incompleto de Freund (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para preparar um agente terapêutico contra o câncer. O agente resultante foi administrado 3 vezes no total, ao gânglio linfático da região na vizinhança do tumor, como administração inicial, e 3 dias e 7 dias a partir daí. Como resultado, um tumor de cerca 86 mm³ de tamanho quando o agente terapêutico contra câncer foi administrado diminuiu para 55 mm³, 30 mm³, e 20 mm³ em 10 dias, 20 dias, e 30 dias após a administração inicial, respectivamente.

[0101] Uma mistura de 0,5 ml de recombinante polipeptídeo que possui a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 2 e 0,5 ml e do

adjuvante incompleto de Freund foi administrada a outro cão portador de câncer de mama 3 vezes no total, da mesma forma descrita acima. Igualmente, 100 µg de interleucina canina 12 foi administrada juntamente com o agente, por via subcutânea. Como resultado, a tumor de cerca 123 mm³ de tamanho quando o agente terapêutico contra câncer foi administrado regrediu completamente 45 dias após a administração inicial do agente terapêutico contra o câncer.

[0102] Além disso, uma mistura de 0,5 ml de polipeptídeo recombinante que possui a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 8 e 0,5 ml do adjuvante incompleto de Freund foi administrada a outro cão portador de câncer de mama 3 vezes no total, da mesma forma descrita acima. Igualmente, 100 µg de interleucina canina 12 foi administrada juntamente com o agente por via subcutânea. Como resultado, a tumor de cerca 96 mm³ em tamanho quando o agente terapêutico contra o câncer foi administrado, regrediu completamente em 27 dias após a administração inicial do agente terapêutico contra o câncer.

(2) Avaliação de capacidade de indução de imunidade.

[0103] As amostras sanguíneas de cães clinicamente afetados às quais os polipeptídeos recombinantes que possuem a sequência de aminoácidos mostrada pelas SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 2, e SEQ ID NO: 8 foram administrados no teste de administração conduzido em (1) acima foram obtidas antes da administração e 10 dias e 30 dias após a administração inicial, células sanguíneas mononucleares foram separadas de acordo com técnicas convencionais e a capacidade de indução de imunidade pelas proteínas recombinantes foi avaliada através do ensaio ELISpot de IFN γ utilizando as células sanguíneas periféricas mononucleares.

[0104] 70% de etanol foi adicionado a placas de 96 poços (MultiScreen-IP, MAIPS4510, Millipore) em quantidades de 100 µl/poço, a placa foi colocada em descanso por 5 minutos, o etanol foi aspirado, a placa foi lavada

com água esterilizada, 200 mM de bicarbonato de sódio (pH 8,2) foi adicionado em quantidades de 300 µl/poço, a placa foi colocada em descanso por 5 minutos, o bicarbonato de sódio foi aspirado e a placa foi lavada. Em seguida, o anticorpo monoclonal interferon γ anti-canino (clone142529, MAB781, R&D) adicionado a 200 mM de bicarbonato de sódio foi adicionado à placa em quantidades de 0,5 µg/poço, a incubação foi realizada a 37°C durante a noite, e o anticorpo primário foi solidificado. Depois do anticorpo primário na solução ser aspirado, uma solução de bloqueio (1% BSA-5% sacarose-200 mM bicarbonato de sódio, pH 8,2) foi adicionada em quantidades de 300 µl/poço, e a incubação foi realizada a 4°C durante a noite para bloquear a placa. Depois da solução bloqueadora a ser aspirada, um meio RPMI contendo 10% (Invitrogen) foi adicionado em quantidades de 300 µl/poço, a placa foi colocada em descanso por 5 minutos, e o meio foi aspirado. Posteriormente, células mononucleares de sangue periférico canino suspensas em um meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino foram adicionadas à placa em quantidades de 5×10^5 células/poço, o polipeptídeo derivado de cão ou o polipeptídeo derivado humano usado para administração foi adicionado a isso em quantidades de 10 µl/poço, e a cultura foi realizada a 37°C in 5% CO₂ por 24 horas para produzir interferon γ dos imunócitos entre as células mononucleares do sangue periférico. Depois, a cultura foi realizada, o meio foi removido, e os poços foram lavados 6 vezes com um lavado (0,1% Tween 20-200 mM de bicarbonato de sódio, pH 8,2). Os anticorpos policlonais de coelho anti-canino diluídos 1.000 vezes com a solução bloqueadora foram adicionados à placa em quantidades de 100 µl/poço e então incubados a 4°C durante a noite. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com o lavado, os anticorpos etiquetados HRP anti-coelhos diluídos 1.000 vezes com a solução bloqueadora foram adicionados à placa em quantidades de 100 µl/poço, e a reação prosseguiu a 37°C por 2 horas. Depois, os poços foram lavados 3 vezes com o lavado, uma cor foi criada com a ajuda de imunostatina Konica

(Konica), e os poços foram lavados com água para concluir a reação. Depois da conclusão da reação, a membrana foi secada, e o número de manchas desenvolvidas foi contado utilizando o KS Elispot (Carl Zeiss). Como resultado, não foram detectadas manchas nas células mononucleares de sangue periférico de cães clinicamente afetados antes da administração do polipeptídeo. No evento após os polipeptídeos terem sido administrados, no entanto, 13 e 82 manchas foram detectadas nas células mononucleares de sangue periférico obtidas dos cães clinicamente afetados aos quais havia sido administrado o recombinante que possui a sequência de aminoácidos mostrada pelas SEQ ID NO: 6, 10 e 30 dias após a administração. No caso de cães clinicamente afetados aos quais havia sido administrado o polipeptídeo recombinante que possui a sequência de aminoácidos mostrada pelas SEQ ID NO: 2, 53 e 189 manchas foram detectadas nas células mononucleares do sangue periférico, 10 e 30 dias após a administração. No caso de cães clinicamente afetados aos quais polipeptídeo recombinante que possui a sequência de aminoácidos mostrada pela SEQ ID NO: 8 havia sido administrado, 32 e 117 manchas foram detectadas nas células mononucleares de sangue periférico, 10 e 30 dias após a administração.

[0105] Os resultados acima demonstram que imunócitos que produzem interferon γ especificamente em reação às proteínas recombinantes que foram administradas são induzidos em cães clinicamente afetados aos quais o polipeptídeo recombinante havia sido administrado. Os resultados igualmente demonstram que as reações imunes nas quais esses imunócitos desempenham um papel central, produzem os efeitos antitumorais descritos em (1) acima.

EXEMPLO 4: EFEITOS ANTITUMOR DE VACINAS DNA

[0106] Um plasmídeo recombinante foi preparado utilizando o gene de SEQ ID NO: 19 da seguinte maneira: reagentes (cDNA (1 μ l) extraídos

da mesma maneira que no Exemplo 1(4) de linha de células de câncer cólon-retal de camundongos (CT26, comprado da ATCC) nos quais a expressão CAPRIN-1 fora observada, 0,4 μ M cada de dois tipos de *primers* (mostrada pelas SEQ ID NOs: 80 e 81), 0,2 mM de dNTPs, e 1,25 U de polimerase de PrimeSTAR HS) foram misturados com um *buffer* acompanhante para ser ajustada a estar compatível com o volume total de 50 μ l. O resultante foi submetido a PCR de 30 ciclos a 98°C por 10 segundos, 55°C por 15 segundos, e 72°C por 4 minutos, utilizando um Thermal Cycler. Os dois tipos de *primers* acima foram usados para amplificar a região que codifica a sequência total de aminoácidos de SEQ ID NO: 20. Depois do PCR foi realizado, o DNA amplificado sofreu eletroforese em gel de agarose a 1% e um fragmento de DNA de cerca 2.100 bp foi purificado utilizando o Kit de Extração de Gel QIAquick.

[0107] O fragmento de DNA purificado foi ligado ao vetor de clonagem pCR-Blunt (Invitrogen). O resultante foi transformado em *E. coli*, o plasmídeo foi recuperado, a sequência do fragmento foi analisada, e um plasmídeo que possui um fragmento de gene amplificado compatível com a sequência de interesse foi obtido. O plasmídeo foi tratado com a enzima de restrição *EcoRI*, o resultante foi purificado com o Kit de Extração de Gel QIAquick, e o gene sequência de interesse foi inserido a um vetor de expressão de mamífero (pcDNA3.1, Invitrogen) tratado com a enzima de restrição *EcoRI* de acordo com técnicas convencionais.

[0108] 50 μ g de partículas de ouro (Bio Rad), 100 μ l de espermidina (SIGMA), e 100 μ l de 1M CaCl_2 foram adicionados a 100 μ g do DNA plasmídeo preparado acima, a mistura foi agitada por turbilhão e o resultante foi colocado em descanso em temperatura ambiente por 10 minutos (doravante referido como "partículas DNA de ouro"). Depois, a mistura foi centrifugada a 3.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado, e as

partículas foram lavadas 3 vezes com 100% de etanol. 100% de etanol (6 ml) foi adicionado às partículas de ouro DNA, o resultante foi cuidadosamente agitado por turbilhão, e as partículas ouro de DNA introduzidas no Tefzel Tubing (Bio Rad) e precipitadas em sua parede. O etanol no Tefzel Tubing ao qual as partículas de ouro DNA haviam aderido foi seco por ar, o tubo seco foi cortado em uma extensão adequada para aplicações '*gene gun*'.

[0109] As células CT26 foram transplantadas de forma subcutânea em regiões dorsais de 20 camundongos Balb/c (Japan SLC, Inc.) em quantidades de 10^6 células/camundongo e crescidas a um diâmetro de tumor de aproximadamente 7 mm. Em seguida, o tubo preparado acima foi fixado a um *gene gun*, as células foram administradas de forma percutânea nas cavidades abdominais de camundongos raspados com pressão de 400 psi utilizando gás hélio puro (a quantidade DNA de plasmídeo inoculada é de 2 μ g/camundongos), e os efeitos antitumorais foram avaliados.

[0110] Como resultado, os tumores se tornaram maiores em 10 camundongos de controle, aos quais plasmídeos vazios sem genes CAPRIN-1 haviam sido administrados, e todos os 10 camundongos morreram 63 dias após o transplante de tumor. No caso dos 10 camundongos aos quais plasmídeos com genes de CAPRIN-1 inseridos nos mesmos haviam sido administrados, no entanto, os tumores regrediram completamente por volta de 25 dias após o transplante de tumor e todos os camundongos permaneceram vivos por 63 dias após o transplante de tumor quando todos os camundongos-controle morreram.

EXEMPLO 5: INDUÇÃO DE CÉLULAS T CD8 PEPTÍDEO EPÍTOPO REATIVAS

(1) Previsão de motif de peptídeo HLA-A0201-ligante e *motif* de peptídeo HLA-A24-ligante

[0111] A sequência de informações de aminoácidos do polipeptídeo CAPRIN-1 humano foram obtidas do GenBank. Para prever um *motif* de peptídeo HLA-A0201-ligante e um *motif* de peptídeo HLA-A24-ligante, uma sequência de

aminoácidos do polipeptídeo CAPRIN-1 humano foi analisada através de um programa de previsão computadorizado utilizando software BIMAS conhecido (disponível em http://bimas.dcrn.nih.gov/molbio/hla_bind/), 29 tipos de peptídeos mostrados pela SEQ ID NO: 43a SEQ ID NO: 71 foram selecionados e foram previstos como capazes de se ligar a moléculas HLA-A0201 e 5 tipos de peptídeos mostrados pela SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 foram selecionados e previstos como capazes de se ligar a moléculas de HLA-A24.

(2) Indução de células T CD8+ peptídeo epítipo reativas.

[0112] O sangue periférico foi separado de um indivíduo saudável com HLA-A0201-positivo, coberto em um meio de separação de linfócitos (OrganonpTeknika, Durham, NC) e centrifugado a 1.500 rpm em temperatura ambiente por 20 minutos. Uma fração contendo PBMC foi recuperada e lavado 3 (ou mais) vezes em *buffer* de fosfato frio para obter células mononucleares de sangue periférico (PBMCs). Os PBMCs obtidos foram suspensos em 20 ml de um meio AIM-V (Life Technologies) e aderidos a um frasco de cultura (Falcon) a 37°C a 5% CO₂ por 2 horas. As células que não aderiram foram usadas para a preparação de células T e as células que aderiram foram usadas para a preparação de células dendríticas.

[0113] As células que aderiram foram cultivadas em um meio AIM-V na presença de IL-4 (1.000 U/ml) e GM-CSF (1.000 U/ml). O meio foi trocado por outro meio AIM-V ao qual IL-4 (1.000 U/ml), GM-CSF (1.000 U/ml), IL-6 (1.000 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA), IL-1β (10 ng/ml, Genzyme, Cambridge, MA), e TNF-α (10 ng/ml, Genzyme, Cambridge, MA) havia sido adicionado 6 dias após, a cultura foi realizada por 2 dias adicionais, e a população de células não-aderida foi usada como células dendríticas.

[0114] As células dendríticas preparadas foram suspensas em um meio AIM-V com densidade celular de 1 x 10⁶ células/ml, os peptídeos mostrados pela SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 71 previstos com a capacidade de ligação às

moléculas de HLA-A0201 selecionadas em (1) acima foram adicionados a isso a 10 µg/ml, e a cultura foi realizada utilizando uma placa de 96 poços a 37°C a 5% CO₂ por 4 horas. Depois que a cultura foi realizada, as células foram irradiadas com raios-X (3.000 rad), lavadas com um meio AIM-V, suspensas no meio AIM-V contendo 10% de soro AB humano (Nabi, Miami, FL), IL-6 (1.000 U/ml), e IL-12 (10 ng/ml, Genzyme, Cambridge, MA), e adicionadas a uma placa de 24 poços em quantidades de 1 x 10⁵ células/poço. Então, a população de célula T preparada foi adicionada em quantidades de 1 x 10⁶ células/poço e cultivada a 37°C a 5% CO₂. A cultura de sobrenadantes foi descartada 7 dias após, as células dendríticas, tratadas com peptídeos obtidos da forma descrita acima e então irradiadas com raios-X, foram suspensas em um meio AIM-V contendo 10% de soro AB humano (Nabi, Miami, FL), IL-7 (10 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA), e IL-2 (10 U/ml, Genzyme, Cambridge, MA) (densidade de célula: 1 x 10⁵ células/ml), as células foram à placa de 24 poços em quantidades de 1 x 10⁵ células/poço, e cultura foi continuada. Então, tais procedimentos foram repetidos 4 a 6 vezes a cada 7 dias, as células T estimuladas foram recuperadas, e a indução de célula T CD8+ foi confirmada através de citometria de fluxo.

[0115] Relativamente aos peptídeos da SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 previstos como sendo capazes de se ligar às moléculas de HLA-A24, a indução de células T CD8+ peptídeo epítipo reativas foi também tentada da mesma maneira descrita acima com o uso de células dendríticas e população de células T induzidas do sangue periférico de um indivíduo saudável HLA-A24-positivo.

[0116] Como controle negativo, foi usado um peptídeo que possui a sequência fora do escopo da presente invenção (SEQ ID NO: 77).

EXEMPLO 6: DETERMINAÇÃO DE EPÍTOPO ANTÍGENO DE CÉLULA T CITOTÓXICA

(1) Capacidade por produção de IFN-γ.

[0117] Para determinar a especificidade das células T que foram

observadas com crescimento para epítomos de peptídeo, entre as células T induzidas no Exemplo 5(2), 5×10^3 células T foram adicionadas a células T2 expressando moléculas 5×10^4 HLA-A0201 (Salter RD et al., Immunogenetics, 21: 235-246, 1985, as células T2 foram compradas da ATCC) pulsadas com os peptídeos previstos como sendo capazes de se ligar a moléculas HLA-A0201 (os peptídeos foram adicionados ao Meio AIM-V a $10 \mu\text{g/ml}$ e cultivados a 37°C in 5% CO_2 por 4 horas), e o resultante foi cultivado em uma placa de 96 poços com meio AIM-V contendo 10% de soro AB humano por 24 horas. Os sobrenadantes foram coletados após a cultura e a quantidade de IFN- γ produzido foi medida através de ELISA. Como resultado, a produção de IFN- γ foi mais observada nos sobrenadantes da cultura obtidos dos poços nos quais as células T2 pulsadas com os peptídeos da SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 71 foram usadas, do que nos sobrenadantes da cultura obtidos dos poços nos quais as células T2 não pulsadas com peptídeos (Fig. 2). Os resultados demonstram que os peptídeos acima são peptídeos epítomo de célula T capazes de especificamente estimular a proliferação de células T CD8+ HLA-A0201+ para induzir a produção de IFN- γ .

[0118] Da mesma maneira conforme descrito acima, a especificidade das células T CD8+ peptídeo epítomo reativas induzidas com o uso de peptídeos de SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 no Exemplo 5(2) aos epítomos de peptídeo foi determinada da seguinte maneira: especificamente, o nível de produção de IFN- γ pelas células T contra as células peptídeo-pulsadas JTK-LCL expressando as moléculas HLA-A24 (as células JTK-LCL foram compradas d RIKEN, Japão) foi medido via ELISA. Como resultado, a produção de IFN- γ foi mais observada nos sobrenadantes da cultura obtidos dos poços nos quais as células JTK-LCL pulsadas com os peptídeos da SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 foram usados, do que nos sobrenadantes da cultura obtidos dos poços nos quais as células JTK-LCL não pulsadas com peptídeos foram usados (Fig. 3). Os

resultados demonstram que os peptídeos da SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 são peptídeos epítomos de célula T capazes de especificamente estimular a proliferação de células T CD8+ HLA-A24+ a induzir a produção de IFN- γ .

(2) Avaliação de citotoxicidade.

[0119] Em seguida, se os peptídeos de SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 71 usados na presente invenção foram ou não apresentados nas moléculas HLA-A0201, nas células de tumor HLA-A0201+ expressando o polipeptídeo CAPRIN-1 humano e se ou não as células T CD8+ estimuladas com os peptídeos foram capazes de destruir as células de tumor HLA-A0201+ expressando o polipeptídeo CAPRIN-1 humano foi examinado. 10^6 células de células de glioma humana U-87MG (compradas da ATCC), que foram verificadas como expressando o polipeptídeo CAPRIN-1 humano, foram coletadas em um tubo de centrifugação de 50-ml, 100 μ Ci de cromo-51 foi adicionado, e a incubação foi realizada a 37°C por 2 horas. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com o meio RPMI (Gibco) contendo 10% de soro fetal bovino (doravante referido como "FBS," Gibco) e adicionadas a uma placa de 96 poços com fundo em V em quantidades de 10^3 células/poço. Além disso, 5×10^4 células T CD8+HLA-A0201+ peptídeo epítomo reativas estimuladas com os peptídeos suspensos em um meio RPMI contendo 10% de FBS foram adicionados, e a cultura foi realizada a 37°C em 5% CO₂ por 4 horas. Depois da cultura, a quantidade de cromo-51 na cultura sobrenadante liberada das células de tumor rompidas foi medida para determinar a atividade citotóxica das células T CD8+ peptídeo-estimuladas. Como resultado, das células T CD8+ HLA-A0201+ peptídeo-estimuladas se revelaram como que possui atividade citotóxica contra as células U-87MG (Fig. 4). Em oposição, as células T CD8+ induzidas com o uso de um peptídeo-controle negativo (SEQ ID NO: 77) não apresentaram atividade citotóxica. Assim sendo, os peptídeos usados na presente invenção (ou seja, peptídeos de SEQ ID NO: 43 a SEQ ID NO: 71)

foram considerados como apresentando moléculas HLA-A0201 em células de tumor HLA-A0201+ expressando o polipeptídeo CAPRIN-1 humano. Além disso, os peptídeos foram também considerados como sendo capazes de induzir células citotóxicas T CD8+ que puderam romper essas células de tumor.

[0120] Em seguida, se ou não os peptídeos de SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 se apresentaram nas moléculas HLA-A24 nas células de tumor HLA-A24+ expressando o polipeptídeo CAPRIN-1 humano e se ou não as células T CD8+ estimuladas com os peptídeos foram capazes de romper as células de tumor HLA-A24+ expressando o polipeptídeo CAPRIN-1 humano foram examinados da mesma maneira conforme descrito. Cromo-51 foi incorporado em células HLA-A24+ JTK-LCL expressando o polipeptídeo humano CAPRIN-1, e células T CD8+ HLA-A24+ peptídeo epítipo reativas foram adicionados, a cultura foi realizada e a quantidade de cromo-51 na cultura sobrenadante liberada das células rompidas foi medida. Como resultado, as células T CD8+ HLA-A24+ estimuladas com os peptídeos de SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 apresentaram atividade citotóxica contra as células JTK-LCL (Fig. 5). Assim sendo, os peptídeos de SEQ ID NO: 72 a SEQ ID NO: 76 foram achadas apresentadas nas moléculas HLA-A24 nas células HLA-A24+ expressando o polipeptídeo humano CAPRIN-1, e os peptídeos foram considerados capazes de induzir células citotóxicas T CD8+ capazes de romper tais células. As células T CD8+ induzidas com o uso de um peptídeo controle negativo (SEQ ID NO: 77) não exibiram toxicidade.

[0121] Para determinar a atividade citotóxica, 5×10^4 células T CD8+ estimuladas e induzidas pelos peptídeos usados na presente invenção foram misturadas com 10^3 células U-87MG ou JTK-LCL nas quais o cromo-51 havia sido incorporado, cultivado por 4 horas, e a quantidade de cromo-51 liberada no meio após a cultura foi medida. A atividade citotóxica usada aqui significa a atividade citotóxica das células T CD8+ contra as células U-87MG ou as células JTK-LCL

(ou seja, células-alvo) determinadas de acordo com a seguinte equação*:

Equação*: Atividade citotóxica (%) = quantidade de cromo-51 liberado de célula U-87MG ou célula JTK-LCL mediante a adição de célula T CD8+ / quantidade de cromo-51 liberado da célula-alvo mediante a adição de 1N de ácido de hidrocloreto X 100.

APLICABILIDADE INDUSTRIAL

[0122] A presente invenção é industrialmente útil para o propósito de tratamento e prevenção do câncer.

[0123] Essa descrição inclui todo ou parte do conteúdo revelado na descrição e/ou desenhos do Requerimento de Patente Japonesa No. 2008-202065, ao qual o presente requerimento reivindica prioridade. Igualmente todas as publicações, patentes e requerimentos de patentes citados aqui são incorporados a este por referência em sua integralidade.

TEXTO LIVRE DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

SEQ ID NO: 31: *primer T3*;

SEQ ID NO: 32: *primer T7*;

SEQ ID NOS: 33 a 34: *primers*;

SEQ ID NOS: 35 a 36: *primers GAPDH*;

SEQ ID NOS: 37a 42 e 80 a 81: *primers*.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE UM AGENTE INDUTOR DE IMUNIDADE, caracterizado por ser para preparar um medicamento para tratar ou prevenir câncer animal, em que o agente compreende, como ingrediente ativo, pelo menos um polipeptídeo que possui atividade indutora de imunidade ou um vetor recombinante que compreende um polinucleotídeo que codifica o referido polipeptídeo e é capaz de expressar o referido polipeptídeo *in vivo*:

(a) um polipeptídeo de sequência de aminoácidos ilustrada por qualquer sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30;

e

(b) um polipeptídeo que compreende o polipeptídeo (a)

em que dito vetor recombinante compreende um polinucleotídeo de sequência de nucleotídeos ilustrada por qualquer sequência de numeração ímpar dentre as SEQ ID NOs: 1 a 29, ou as respectivas sequências degeneradas das mesmas que codificam as sequências de aminoácidos ilustradas por qualquer sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30.

2. USO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo polipeptídeo ser um agente para tratamento de uma célula apresentadora de antígeno.

3. USO, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por ser para: tratar uma célula apresentadora de antígeno com o agente *in vitro*; ou tratar uma célula apresentadora de antígeno com o agente *in vitro*, colocando em contato a célula apresentadora de antígeno com células T *in vitro* que se ligam seletivamente à célula apresentadora de antígeno.

4. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo câncer ser selecionado a partir de câncer de mama, tumor cerebral, leucemia, linfoma, câncer de pulmão, câncer esofágico ou câncer

cólon-retal.

5. USO, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo referido animal ser humano, cão ou gato.

6. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por compreender adicionalmente um agente imunopotencializador.

7. USO, de acordo com a reivindicação 6, caracterizado pelo agente imunopotencializador ser pelo menos um adjuvante ou uma citocina selecionados a partir do grupo que consiste em um adjuvante incompleto de Freund, Montanide, poli IC e um derivado do mesmo, oligonucleotídeo CpG, interleucina 12, interleucina 18, interferon α , interferon β , interferon ω , interferon γ e ligante Flt3.

8. USO DE UM POLIPEPTÍDEO, caracterizado por ser na fabricação de um medicamento para a indução de imunidade, em que referido polipeptídeo possui atividade indutora de imunidade e a sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30.

9. USO DE UM VETOR RECOMBINANTE que compreende um polinucleotídeo que codifica o referido polipeptídeo e é capaz de expressar o referido polipeptídeo *in vivo*, caracterizado por ser na fabricação de um medicamento para a indução de imunidade, em que referido polipeptídeo possui atividade indutora de imunidade e a sequência de aminoácidos mostrada em uma das sequências de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a 30,

em que dito vetor recombinante compreende um polinucleotídeo de sequência de nucleotídeos ilustrada por qualquer sequência de numeração ímpar dentre as SEQ ID NOs: 1 a 29, ou as respectivas sequências degeneradas das mesmas que codificam as sequências de aminoácidos ilustradas por qualquer sequência de numeração par dentre as SEQ ID NOs: 2 a

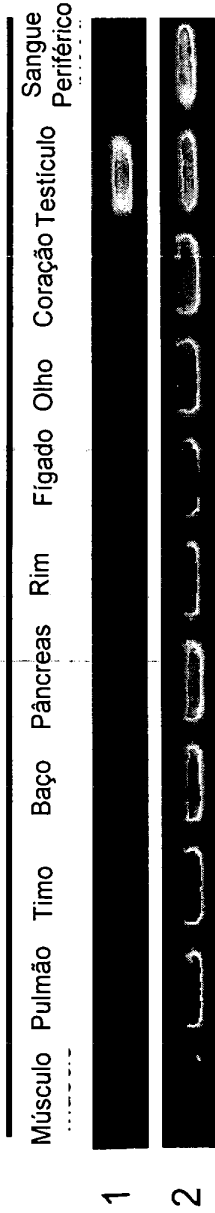
30.

10. USO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 8 a 9, caracterizado por compreender adicionalmente um agente imunopotencializador.

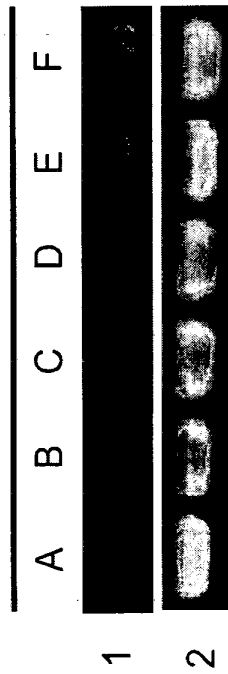
11. USO, de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo agente imunopotencializador ser pelo menos um adjuvante ou uma citocina selecionados a partir do grupo que consiste em um adjuvante incompleto de Freund, Montanide, poli IC e um derivado do mesmo, oligonucleotídeo CpG, interleucina 12, interleucina 18, interferon α , interferon β , interferon ω , interferon γ e ligante Flt3.

Fig. 1

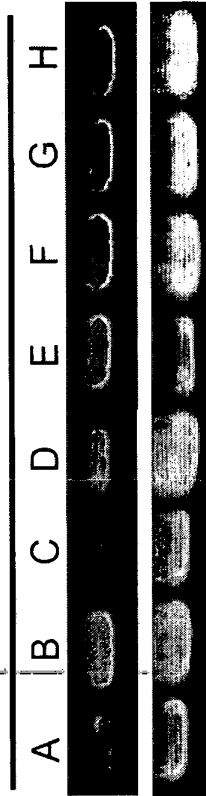
Tecido canino normal



Tecido de câncer de mama canina



Linhagem de células humanas de câncer de mama



Linhagem de células humanas de câncer

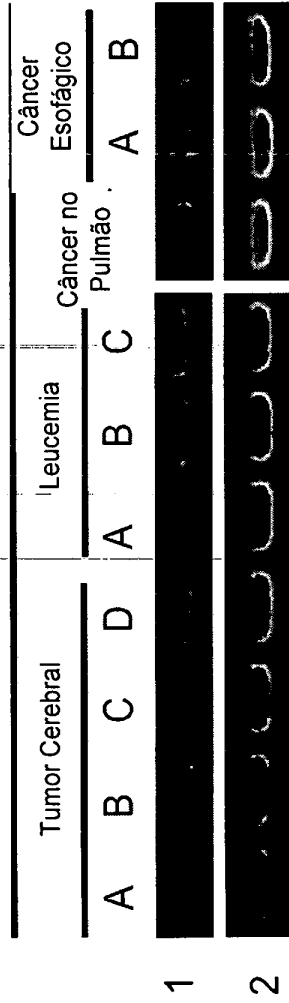
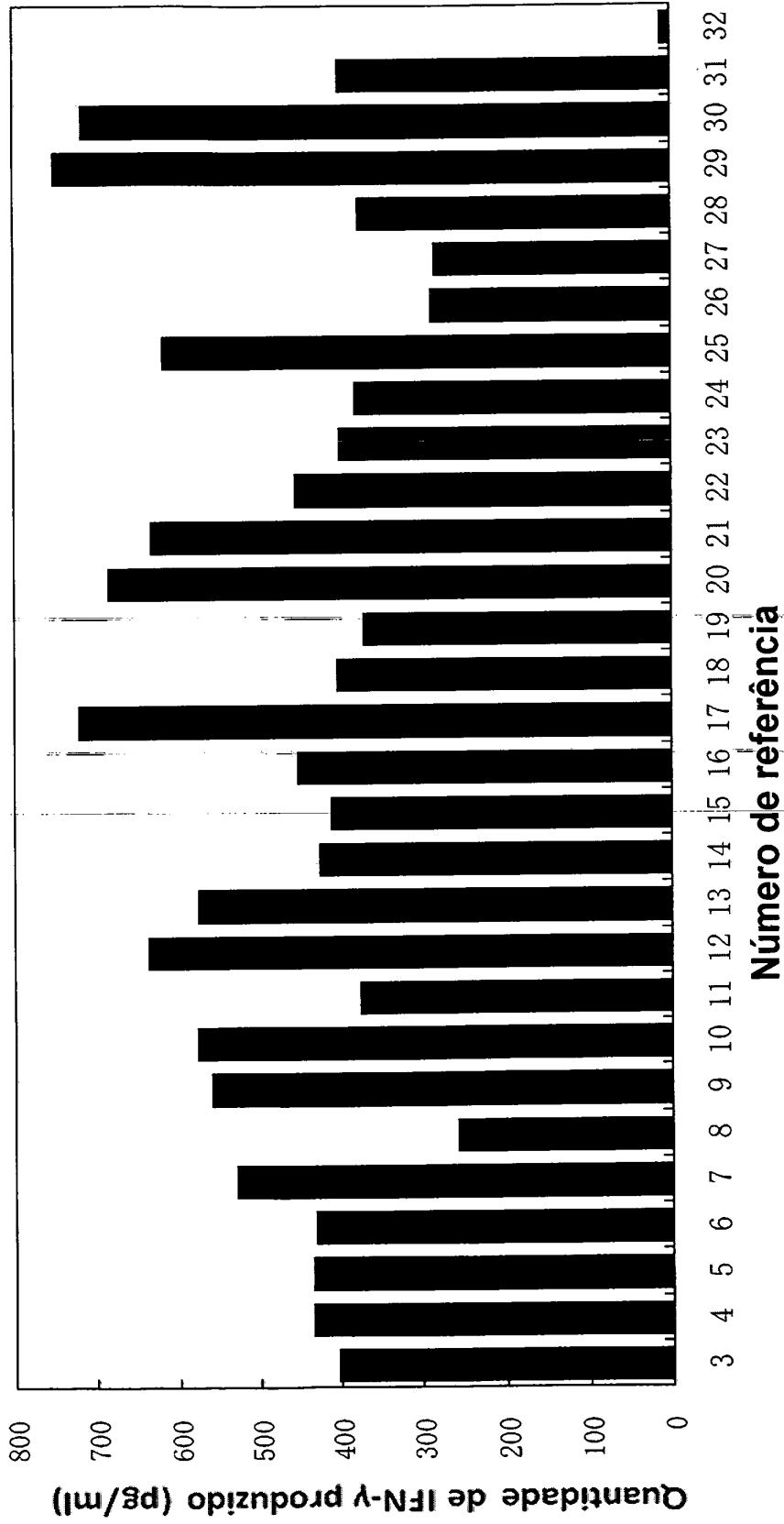


Fig. 2



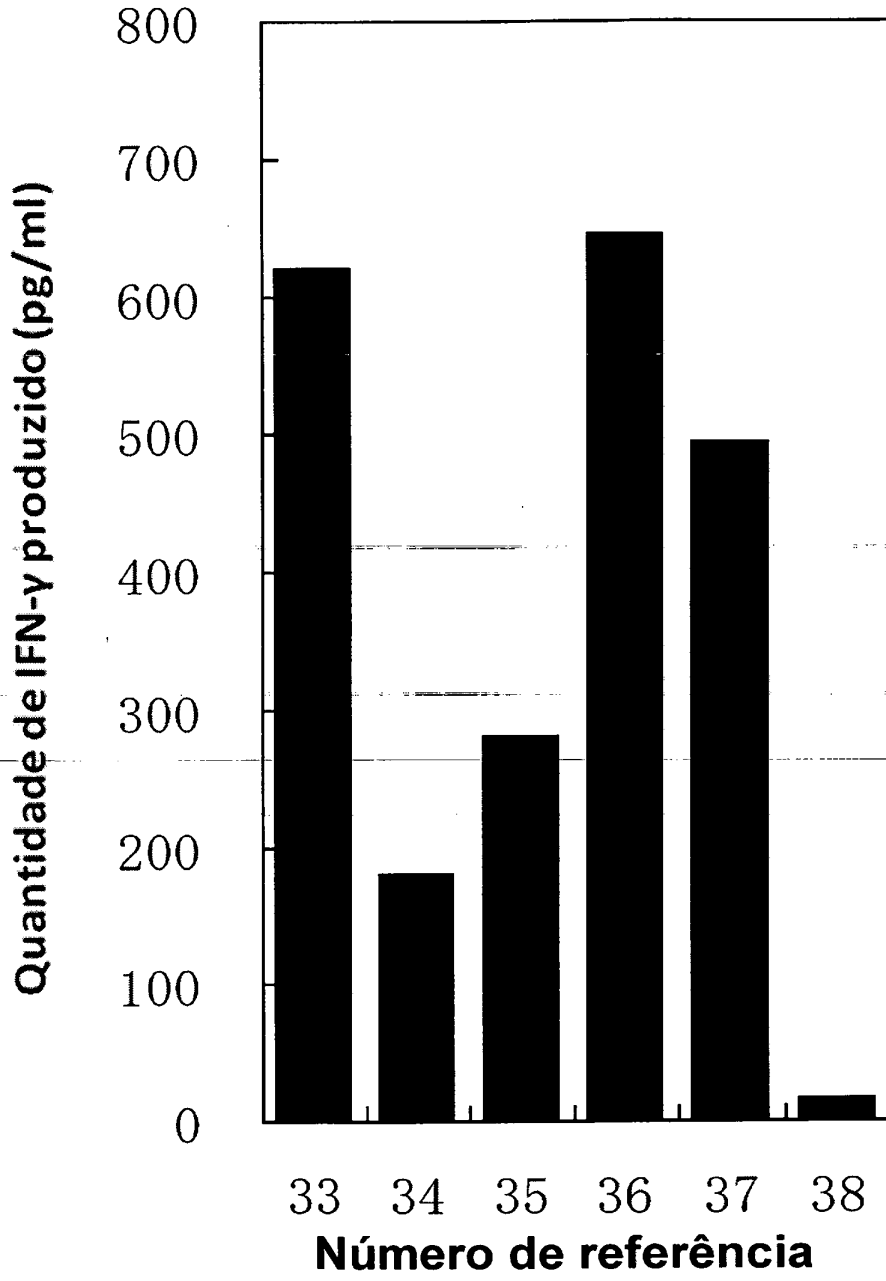
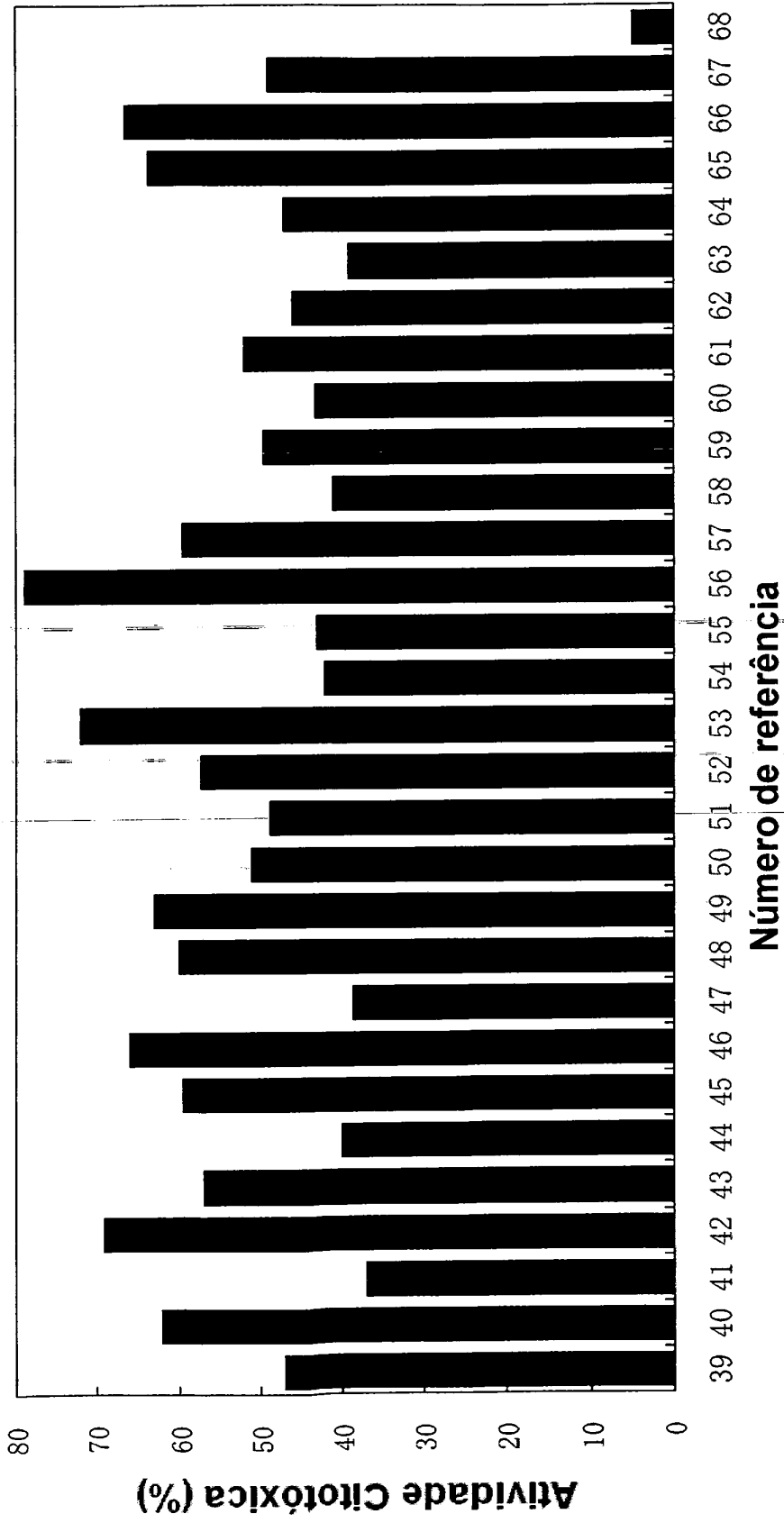


Fig. 3

Fig. 4



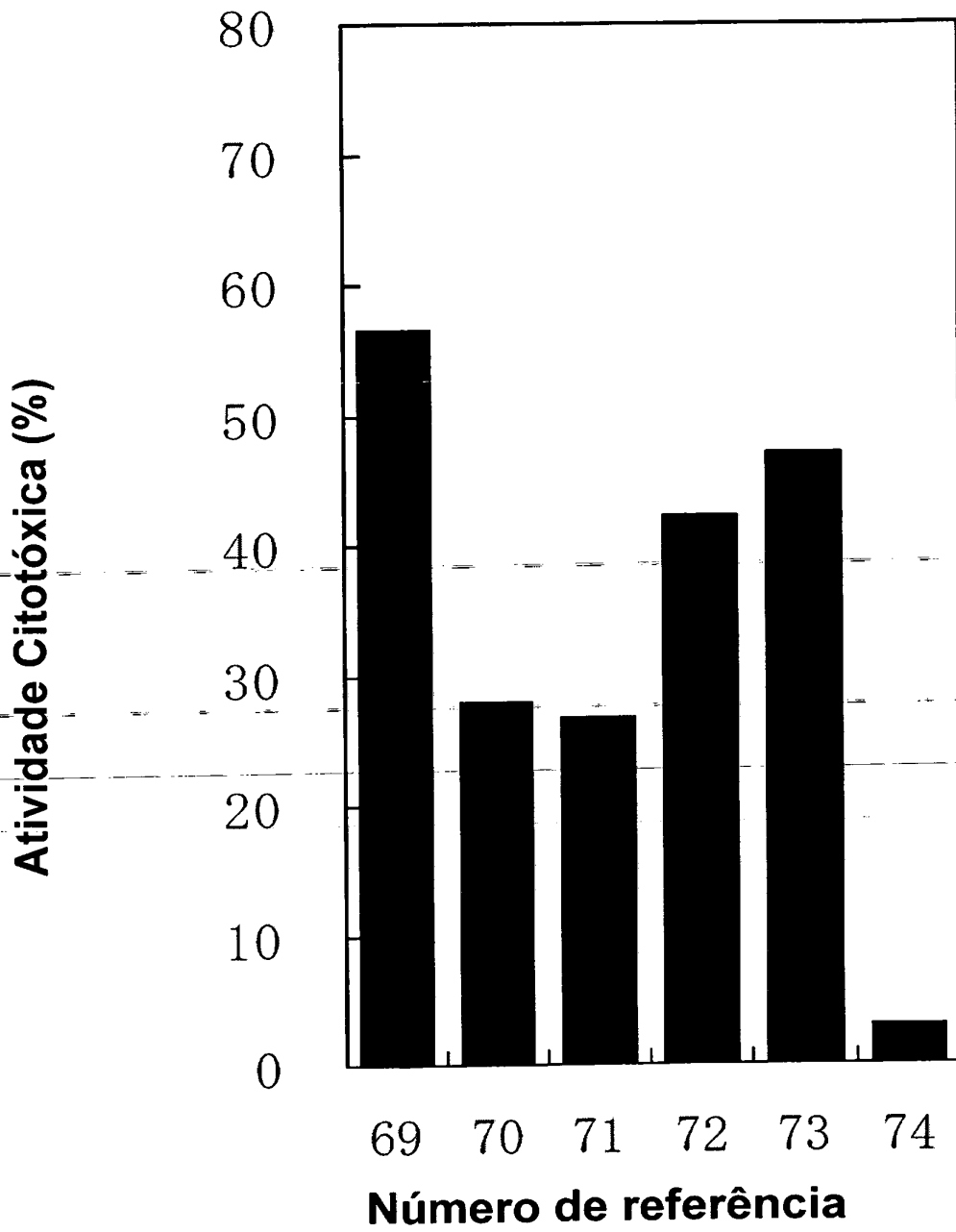


Fig. 5