

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **2004.09.17**

(30) Prioridade(s): **2003.09.18 US 666332**
2004.06.25 GB 0414309

(43) Data de publicação do pedido: **2006.06.07**

(45) Data e BPI da concessão: **2010.03.17**
089/2010

(73) Titular(es):

NOVARTIS AG

LICHTSTRASSE 35 4056 BASEL

CH

(72) Inventor(es):

BRUCE M. HALL

FRANK KOLBINGER

JOSÉ M. CARBALLIDO HERRERA

ANDRÁS ASZODI

JOSÉ W. SALDANHA

AU

DE

AT

AT

GB

(74) Mandatário:

ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS

RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

PT

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS HUMANIZADOS TERAPÊUTICOS CONTRA ISOFORMAS DE CD45**

(57) Resumo:

RESUMO**"ANTICORPOS HUMANIZADOS TERAPÊUTICOS CONTRA ISOFORMAS DE
CD45"**

Uma molécula compreendendo pelo menos um sítio de ligação ao antígeno, que compreende na sequência as regiões hipervariáveis CDR1, CDR2 e CDR3, possuindo a referida CDR1 a sequência de aminoácidos Asn-Tyr-Ile-Ile-His (NYIIH), possuindo a referida CDR2 a sequência de aminoácidos Tyr-Phe-Asn-Pro-Tyr-Asn-His-Gly-Thr-Lys-Tyr-Asn-Glu-Lys-Phe-Lys-Gly (YFNPYNHGTTYNEK-FKG) e possuindo a referida CDR3 a sequência de aminoácidos Ser-Gly-Pro-Tyr-Ala-Trp-Phe-Asp-Thr (SGPYAWFDT); e.g., compreendendo ainda na sequência as regiões hipervariáveis CDR1', CDR2' e CDR3', possuindo a CDR1' a sequência de aminoácidos Arg-Ala-Ser-Gln-Asn-Ile-Gly-Thr-Ser-Ile-Gln (RASQNI-GTSIQ), possuindo a CDR2' a sequência de aminoácidos Ser-Ser-Ser-Glu-Ser-Ile-Ser (SSSEIS), e a CDR3' possuindo a sequência de aminoácidos Gln-Gln-Ser-Asn-Thr-Trp-Pro-Phe-Thr (QQSNTWPFT), e.g., um anticorpo quimérico ou humanizado, útil como um agente farmacêutico.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS HUMANIZADOS TERAPÊUTICOS CONTRA ISOFORMAS DE CD45"

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a compostos orgânicos, tais como a moléculas de ligação contra isoformas do antígeno CD45, tais como por exemplo anticorpos monoclonais (mAbs), e sua utilização.

Antecedentes da Invenção

Uma abordagem no tratamento de uma variedade de doenças é conseguir a eliminação ou a inativação de leucócitos patogénicos e o potencial para indução da tolerância para inactivar as respostas imunitárias patológicas.

Pensa-se que a rejeição de órgãos, células e tecidos transplantados e as várias doenças autoimunes sejam principalmente o resultado de uma resposta imunitária mediada pelas células T, desencadeada por células T helper que são capazes de reconhecer antígenos específicos que são capturados, processados e apresentados às células T helper através de células de apresentação de antígeno (APC), tais como macrófagos e células dendríticas, na forma

de um complexo antigénio-MHC, *i.e.*, a célula T helper quando reconhece antigénios específicos é estimulada para produzir citocinas, tais como IL-2 e para expressar ou regular positivamente alguns receptores de citocina e outras moléculas de activação e para proliferar. Algumas destas células T helper activadas podem actuar directamente ou indirectamente, *i.e.*, apoiando células T citotóxicas efectoras ou células B, para destruir células ou tecidos que expressam o antigénio seleccionado. Após a terminação da resposta imunitária, algumas das células seleccionadas clonalmente maduras permanecem como células T helper de memória e células T citotóxicas de memória, que circulam pelo corpo e reconhecem rapidamente o antigénio, se este surgir novamente. Se o antigénio que desencadear esta resposta for um antigénio ambiental inócuo, o resultado é alergia, se o antigénio não é um antigénio estranho, mas um antigénio próprio, o resultado pode ser uma doença autoimune; se o antigénio for um antigénio de um órgão transplantado, o resultado pode ser a rejeição do enxerto.

O sistema imunitário desenvolveu-se de modo a reconhecer a diferença entre o próprio e o não-próprio. Esta propriedade permite que um organismo sobreviva num ambiente exposto aos confrontos diários com patogénios. Esta especificidade para não-próprio e tolerância em relação ao próprio surge durante o desenvolvimento do repertório de células T no timo através de processos de selecção positiva e negativa, que também compreendem o reconhecimento e a eliminação de células T autorreactivas.

Este tipo de tolerância é referido como uma tolerância central. Contudo, algumas destas células autorreactivas escapam a este mecanismo selectivo e colocam um perigo potencial para o desenvolvimento de doenças autoimunes. Para controlar as células T autorreactivas que escaparam para a periferia, o sistema imunitário possui mecanismos de regulação periféricos que proporcionam protecção contra a autoimunidade. Estes mecanismos são uma base para a tolerância periférica.

Os antigénios de superfície celular reconhecidos por mAbs específicos são geralmente designados por um número de CD (Agrupamento de Diferenciação) atribuído por workshops sucessivos de Tipagem de Leucócitos Internacional e o termo CD45 aqui aplicado refere-se ao antigénio CD45 comum aos leucócitos de superfície celular; e um mAb contra esse antigénio é aqui designado como "anti-CD45".

Os anticorpos contra o antigénio comum de leucócitos (LCA) ou CD45 são um componente principal da globulina anti-linfócito (ALG). CD45 pertence à família das fosfatase de tirosina de transmembrana e é tanto um regulador positivo como negativo da activação celular, dependendo da interacção do receptor. A actividade de fosfatase de CD45 parece ser necessária para a activação das cinases da família de Src associadas com o receptor de antigénio dos linfócitos B e T (Trowbridge IS *et al.*, *Annu Rev Immunol.* 1994; 12:85-116). Assim, na activação celular de T, CD45 é essencial para o sinal 1 e as células

deficientes em CD45 possuem defeitos profundos em eventos de activação mediados por TCR.

O antigénio CD45 existe em diferentes isoformas que compreendem uma família de glicoproteínas de transmembrana. Isoformas distintas de CD45 diferem na sua estrutura de domínio extracelular que surge de excisão alternativa de 3 exões variáveis que codificam para parte da região extracelular de CD45 (Streuli MF. *et al.*, *J. Exp. Med.* 1987; 166:1548-1566). As várias isoformas de CD45 possuem diferentes domínios extracelulares, mas possuem os mesmos segmentos de transmembrana e citoplásmicos possuindo dois domínios de fosfatase homólogos, altamente conservados, de aproximadamente 300 resíduos. As diferentes combinações de isoforma são expressas diferencialmente em subpopulações de linfócitos T e B (Thomas ML. *et al.*, *Immunol. Today* 1988; 9:320-325). Alguns anticorpos monoclonais reconhecem um epitopo comum a todas as isoformas diferentes, embora outros mAbs possuam uma especificidade restrita (CD45R), dependendo de qual dos exões excisados alternativamente (A, B ou C) eles reconhecem. Por exemplo, os anticorpos monoclonais que reconhecem o produto do exão A são consequentemente designados CD45RA, aqueles que reconhecem as várias isoformas contendo o exão B foram designados CD45RB (Beverley PCL *et al.*, *Immunol. Supp.* 1988; I:3-5). Anticorpos tais como UCHL1 ligam-se selectivamente à isoforma de 180 kDa CD45RO (sem qualquer um dos exões variáveis A, B ou C) que parecem estar restringidos a um subconjunto de células T activadas, células de memória e

timócitos corticais e não é detectada em células B (Terry LA *et al.*, *Immunol.* 1988; 64:331-336).

WO 2002/072832 revela anticorpos monoclonais (mAbs), que são específicos para um epitopo em ambos CD45RB e CD45RO para utilizações terapêuticas contra doenças autoimunes e rejeições de enxertos.

O domínio pesado variável de anticorpo humano pode ser N-glicosilado (Dunn-Walters D. *et al.*, *Molecular Immunology* 2000; 37:107-113). A hipermutação somática introduz predominantemente substituições de nucleótidos únicos nos genes de região variável de modo a aumentar a variabilidade da imunoglobulina.

A N-glicosilação na região variável é conhecida como afectando a ligação ao antígeno. Todavia, são conhecidos anticorpos monoclonais aglicosilados, que, embora preservem a sua função biológica, através da glicosilação perdem os seus efeitos colaterais adversos (Friends P. *et al.*, *Transplantation* 1999, 68; 1632-1687)

Descrição das Figuras

A Figura 1 demonstra que a inibição de MLR primário pelo "mAb candidato" está dependente da dose no intervalo de 0,001 e 10 µg/mL. "Concentração" é concentração do "mAb candidato".

As Figuras apresentam o mapa de plasmídeos do vector de expressão HCMV-G1 HuA6-VHQ que compreende a cadeia pesada que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID N°:12 (3921-4274)-na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID N°:15.

A Figura 3 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCMV-G1 HuA6-VHE que compreende a cadeia pesada que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID N°:11 (3921-4274) na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID N°:16.

A Figura 4 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCMV-K HuAb-VL1 humV1 que compreende a cadeia leve que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID N°:14 (3964-4284) na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID N°:17.

A Figura 5 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCMV-K HuAb-VL1 humV2 que compreende a cadeia leve que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID N°: 13 (3926-4246) na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID N°:18.

A Figura 6 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão LCVL1SP20 que compreende a cadeia leve que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID

Nº:33 na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID Nº:36.

A Figura 7 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão LCVL2SP20 que compreende a cadeia leve que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID Nº:13 na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID Nº:39.

A Figura 8 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCVHEN73D Sp20 que compreende a cadeia pesada que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID Nº:34 na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID Nº:37.

A Figura 9 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCVHQN73D Sp20 que compreende a cadeia pesada que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID Nº:35 na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID Nº:38.

A Figura 10 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCVHESp20 que compreende a cadeia pesada que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID Nº:11 na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID Nº:40.

A Figura 11 apresenta o mapa de plasmídeo do vector de expressão HCVHQSp20 que compreende a cadeia

pesada que possui a sequência de nucleótidos SEQ ID N°:12 na sequência de nucleótidos do vector de expressão completa SEQ ID N°:41.

A Figura 12 apresenta a análise de Cromatografia de Exclusão de Tamanho de VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2, e de VHE/humV1 juntamente com VHE-N73D/humV1.

A Figura 13 apresenta a Cromatografia de Permuta Catiónica de VHE/humV2, VHE/humV1, VHQ/humV2, VHQ/humV1 e de VHE/humV2 juntamente com VHE-N73D/humV1.

A Figura 14 apresenta a Cromatografia de Fase Reversa de VHE/humV2 e VHE-N73D/humV1.

Descrição da Invenção

Os autores descobriram um anticorpo humanizado possuindo especificidade de ligação para CD45R0 e para CD45RB compreendendo uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°: 31 ou 32 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°:7 ou SEQ ID N°:8.

Noutro aspecto, o anticorpo humanizado possuindo especificidade de ligação para CD45R0 e para CD45RB compreende:

- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°:31 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°:7,
- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°:31 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°:8,
- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°:32 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°:7
- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°:32 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°:8.

O anticorpo humanizado CD45RB/RO pode também suprimir o processo inflamatório que medeia a rejeição da pele de aloenxertos humanos. Adicionalmente descobriu-se que o anticorpo humanizado CD45RO/RB pode suprimir o processo inflamatório que medeia a rejeição da pele de aloenxertos humanos, em particular, pode suprimir o processo inflamatório que medeia a rejeição da pele de aloenxerto humano *in vivo* em ratinhos SCID transplantados com pele humana e enxertado com esplenócitos mononucleares. E para além disso, observou-se que o anticorpo humanizado CD45RB/RO pode conduzir à sobrevivência prolongada de aloenxertos em ilhas humanas através da prevenção da infiltração do enxerto e através da inibição da reacção de rejeição mediada por leucócitos *in vivo*.

Os anticorpos CD45RO/RB humanizados, de acordo

com a invenção, são capazes de se ligar especificamente às isoformas CD45RB e CD45RO do antígeno CD45, quer isoladamente ou associados com outras moléculas. A reacção de ligação pode ser apresentada através de métodos convencionais (ensaio qualitativo) incluindo, por exemplo, qualquer tipo de ensaio de ligação, tais como imunofluorescência directa ou indirecta juntamente com microscopia de fluorescência ou análise citofluorimétrica (FACS), ensaio de imunoabsorção ligado a enzima (ELISA) ou radioensaio nos quais a ligação da molécula a células que expressam uma isoforma particular de CD45 pode ser visualizada. Adicionalmente, a ligação desta molécula pode resultar na alteração da função das células que expressam estas isoformas. Por exemplo, a inibição da resposta de linfócitos mistos primários ou secundários (MLR) pode ser determinada, tal como um ensaio *in vitro* ou um bioensaio para determinar a inibição de MLR primária ou secundária na presença e na ausência de uma molécula de ligação a CD45RO/RB e determinar as diferenças na inibição de MLR primária.

Alternativamente, os efeitos moduladores funcionais *in vitro* podem também ser determinados através da medição da proliferação de células PBMC ou T ou células T CD4⁺, produção de citocinas, alteração na expressão das moléculas da superfície celular, e.g. após activação celular em MLR, ou após estimulação com antígeno específico, tal como toxóide do tétano ou outros antígenos, ou com estimuladores policlonais, tais como fito-hemaglutinina

(PHA) ou anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ou ésteres de forbol e ionóforos Ca^{2+} . As culturas são preparadas de um modo semelhante ao descrito para MLR excepto que em vez de células alogeneicas como estimuladores são utilizados estimuladores de antigénio solúvel ou policlonais, tais como aqueles mencionados acima. A proliferação das células T é medida, preferencialmente, como descrito acima através da incorporação de ^3H -timidina.

A produção de citocina é medida preferencialmente através de ELISA de sanduíche, em que um anticorpo de captura de citocina é utilizado para revestir a superfície de uma placa de 96 poços, os sobrenadantes das culturas são adicionados e incubados durante 1 h à temperatura ambiente e é então adicionado um anticorpo de detecção específico para a citocina particular, após um anticorpo de segundo passo conjugado com uma enzima, tal como peroxidase de rábano seguido pelo substrato correspondente e a absorvência é medida num leitor de placas. A alteração nas moléculas de superfície celular pode ser medida preferencialmente por imunofluorescência directa ou indirecta após corar as células alvo com anticorpos específicos para uma molécula de superfície celular particular. O anticorpo pode ser marcado directamente com flurocromo ou pode ser utilizado um anticorpo de segundo passo marcado fluorescentemente específico para o primeiro anticorpo, e as células são analisadas com um citofluorímetro.

O anticorpo humanizado da invenção possui uma

especificidade de ligação para ambos CD45R0 e CD45RB (molécula de ligação "CD45RB/R0").

Preferencialmente o anticorpo humanizado liga-se a isoformas de CD45R0 com uma constante de dissociação (K_d) <20 nM, preferencialmente com uma $K_d < 15$ nM ou <10 nM, mais preferencialmente com uma $K_d < 5$ nM. Preferencialmente, o anticorpo humanizado liga-se a isoformas de CD45RB com uma $K_d < 50$ nM, preferencialmente com uma $K_d < 15$ nM ou <10 nM, mais preferencialmente com uma $K_d < 5$ nM.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo humanizado da invenção liga-se a essas isoformas de CD45 que

- 1) incluem os epitopos A e B, mas não a molécula do epitopo C de CD45; e/ou
- 2) incluem o epitopo B, mas não o A e não p epitopo C da molécula de CD45; e/ou
- 3) do não incluem qualquer um dos epitopos A, B ou C da molécula de CD45.

Ainda noutra forma de realização preferida, uma molécula de ligação da invenção não se liga a isoformas de CD45 que incluem

- 1) todos os epitopos A, B e C da molécula de CD45; e/ou

- 2) ambos os epitopos B e C, mas não o epitopo A da molécula CD45.

Noutra forma de realização preferida a molécula de ligação da invenção também

- 1) reconhece as células de memória e as células T aloactivadas *in vivo*; e/ou
- 2) liga-se ao seu alvo em células T humanas, tais como por exemplo células PEER; em que a referida ligação é realizada preferencialmente com uma $K_d < 15$ nM, mais preferencialmente com uma $K_d < 10$ nM, com máxima preferência com uma $K_d < 5$ nM; e/ou
- 3) inibe a função de células T alorreactivas *in vitro*, preferencialmente com uma IC_{50} de cerca de menos do que 100 nM, preferencialmente inferior a 50 nM ou 30 nM, mais preferencialmente com uma IC_{50} de cerca de 10 ou 5 nM, com máxima preferência com uma IC_{50} de cerca de 0,5 nM ou mesmo 0,1 nM; e/ou
- 4) induz a morte celular através de apoptose em linfócitos T humanos; e/ou
- 5) induz a tolerância a células T específicas para o aloantigénio *in vitro*; e/ou
- 6) previne a doença letal de enxerto xenogeneico versus hospedeiro (GvHD) induzida em ratinhos SCID através de injeção de PBMC humanas quando administradas numa quantidade eficaz; e/ou

- 7) liga-se a linfócitos T, monócitos, células estaminais, células natural killer e/ou granulócitos, mas não a plaquetas ou linfócitos B; e/ou
- 8) suporta a diferenciação de células T com um fenótipo de células reguladora T característica (Treg); e/ou
- 9) induz células T reguladoras capazes de suprimir a activação celular de T "naive"; e/ou
- 10) suprime o processo inflamatório que medeia a rejeição de aloenxerto de pele humana, em particular, suprime o processo inflamatório que medeia a rejeição de aloenxerto de pele humana *in vivo* em ratinhos SCID transplantados com pele humana e enxertados com esplenócitos mononucleares; e/ou
- 11) prolonga a sobrevivência de aloenxerto em ilha humano num modelo animal em ratinhos hu-PBL-NOD/SCID.

Noutra forma de realização preferida, o anticorpo humanizado da invenção liga-se ao mesmo epitopo que o anticorpo monoclonal "A6" como descrito por Aversa *et al.*, *Cellular Immunology* 158, 314-328 (1994).

Devido às propriedades de ligação e actividades biológicas acima descritas, esses anticorpos humanizados da invenção são particularmente úteis em medicina, para terapia e/ou profilaxia. As doenças nas quais os anticorpos humanizados da invenção são particularmente úteis incluem

doenças autoimunes, rejeição de transplante, dermatite, doença inflamatória da bexiga e/ou alergias, como será apresentado adiante.

Os anticorpos humanizados podem ser *e.g.*, derivados dos anticorpos produzidos por células B ou hibridomas e ou qualquer fragmento destes, *e.g.*, fragmentos $F(ab')_2$ e Fab, assim como anticorpos de cadeia simples ou domínio simples. Um anticorpo de cadeia simples consiste nas regiões variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo ligadas covalentemente através de um ligante peptídico, normalmente consistindo desde 10 até 30 aminoácidos, preferencialmente desde 15 até 25 aminoácidos. Por isso, uma tal estrutura não inclui a parte constante das cadeias pesada e leve e crê-se que o péptido pequeno espaçador deve ser menos antigénico do que uma parte constante total. Por um anticorpo humanizado entende-se um anticorpo no qual as regiões hipervariáveis (CDRs) são de origem não humana (*e.g.*, de murino) enquanto que toda, ou substancialmente toda a outra parte, *e.g.*, as regiões constantes e as partes altamente conservadas das regiões variáveis são de origens humanas. Um anticorpo humanizado pode, contudo, reter alguns aminoácidos da sequência de murino nas partes das regiões variáveis adjacentes às regiões hipervariáveis.

As regiões hipervariáveis, *i.e.*, CDR's de acordo com a presente invenção podem estar associadas com qualquer tipo de regiões quadro, *e.g.*, partes constantes das cadeias leve e pesada, de origem humana. Regiões quadro adequadas

são e.g., descritas em "Sequences of proteins of immunological interest", Kabat, E.A. et al., US department of health and human services, Public health service, National Institute of health. Preferencialmente, a parte constante de uma cadeia pesada humana pode ser do tipo IgG1, incluindo subtipos, preferencialmente a parte constante de uma cadeia leve humana pode ser do tipo κ ou λ , mais preferencialmente do tipo κ . Preferencialmente, a referida cadeia pesada compreende não mais do que um sítio de glicosilação, com máxima preferência o sítio de glicosilação é um sítio de N-glicosilação site, e com máxima preferência o sítio de glicosilação está localizado na parte constante da cadeia pesada. Com máxima preferência não está presente nenhum sítio de glicosilação na região variável, preferencialmente nenhum sítio de glicosilação na região quadro.

Noutro aspecto a presente invenção proporciona um anticorpo humanizado compreendendo

- um polipéptido da SEQ ID N°:31 e um polipéptido da SEQ ID N°:7 (tais como VHEN73D/humV2),
- um polipéptido da SEQ ID N°:31 e um polipéptido da SEQ ID N°:8 (tais como VHEN73D/humV1),
- um polipéptido da SEQ ID N°:32 e um polipéptido da SEQ ID N°:7 (tais como VHQN73D/humV2), ou
- um polipéptido da SEQ ID N°:32 e um polipéptido da SEQ ID N°:8 (tais como VHQN73D/humV1).

"Polipéptido", se não for aqui especificado de outro modo, inclui qualquer péptido ou proteína compreendendo aminoácidos uns aos outros através de ligações peptídicas, possuindo uma sequência de aminoácidos com início na extremidade N-terminal e terminando na extremidade C-terminal. O polipéptido da presente invenção é um anticorpo monoclonal. Preferencialmente é um anticorpo monoclonal (enxertado com CDR) humanizado. O anticorpo monoclonal humanizado (enxertado com CDR) pode incluir ou não outras mutações introduzidas nas sequências quadro (FR) do anticorpo aceitador. Preferencialmente, o anticorpo humanizado não compreende mais do que um sítio de glicosilação. Com máxima preferência, o referido sítio de glicosilação é um sítio de N-glicosilação. Com máxima preferência não está presente nenhum sítio de glicosilação na região variável, e ainda mais preferencialmente não está presente nenhum sítio de glicosilação na região variável da cadeia pesada, com máxima preferência nenhum sítio de glicosilação está presente nas regiões quadro (FR's).

O termo "modificação covalente" inclui modificações de um polipéptido de acordo com a presente invenção, e.g., de uma sequência especificada; ou um seu fragmento com um agente proteico orgânico ou derivado não proteico, fusões com sequências de polipéptido heterólogas, e modificações pós-tradução. Os polipéptidos modificados covalentes, e.g., de uma sequência especificada, ainda tem a capacidade para se ligar a CD45RO e CD45RB através de ligação reticulada. As modificações covalentes são

introduzidas tradicionalmente através da reacção de resíduos de aminoácidos alvo com um agente de derivação orgânico que é capaz de reagir com resíduos laterais ou terminais seleccionados, ou através de mecanismos de aproveitamento de modificações pós-tradução que funcionam em células hospedeiras recombinantes seleccionadas. Certas modificações pós-tradução são o resultado da acção de células hospedeiras recombinantes no polipéptido expresso. Os resíduos glutaminilo e asparaginilo são frequentemente desaminados pós-tradução nos resíduos glutamilo e aspartilo correspondentes. Alternativamente, estes resíduos são desaminados em condições acídicas moderadas. Outras modificações pós-tradução incluem a hidroxilação de prolina e lisina, fosforilação de grupos hidroxilo dos resíduos de serilo, tirosina ou treonilo, metilação dos grupos α -amino das cadeias laterais de lisina, arginina, e histidina, ver e.g., T. E. Creighton, *Proteins: Structure and Molecular Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983). As modificações covalentes e.g., incluem proteínas de fusão compreendendo um polipéptido de acordo com a presente invenção, e.g., de uma sequência especificada e suas variantes da sequência de aminoácidos, tais como imunoadesinas, e fusões N-terminal com sequências sinal heterólogas.

"Aminoácido(s)" refere-se a todos os L- α -aminoácidos que ocorrem naturalmente, e.g., e incluindo D-aminoácidos. Os aminoácidos são identificados através de qualquer uma das designações bem conhecidas de uma única letra ou de três letras.

O termo "variante da sequência de aminoácidos" refere-se a moléculas com algumas diferenças nas suas sequências de aminoácidos em comparação com um polipéptido de acordo com a presente invenção, *e.g.*, de uma sequência especificada. As variantes da sequência de aminoácidos de um polipéptido de acordo com a presente invenção, *e.g.*, de uma sequência especificada, ainda possuem a capacidade para se ligarem a CD45RO e CD45RB. As variantes de substituição são aquelas que possuem pelo menos um resíduo de aminoácidos removidos e um aminoácido diferente inserido no seu lugar na mesma posição num polipéptido de acordo com a presente invenção, *e.g.*, de uma sequência especificada. Estas substituições podem ser únicas, em que apenas um aminoácido na molécula foi substituído, ou podem ser múltiplas, em que dois ou mais aminoácidos foram substituídos na mesma molécula. As variantes de inserção são aquelas com um ou mais aminoácidos inseridos numa posição imediatamente adjacente a um aminoácido numa posição particular num polipéptido de acordo com a presente invenção, *e.g.*, de uma sequência especificada. Imediatamente adjacente a um aminoácido significa ligado ao grupo funcional α -carboxilo ou α -amino do aminoácido. Variantes de deleção são aquelas com um ou mais aminoácidos num polipéptido de acordo com a presente invenção, *e.g.*, de uma sequência especificada, removida. Ordinariamente, as variantes de deleção terão um ou dois aminoácidos eliminados numa região particular da molécula.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona polinucleótidos isolados que codificam o anticorpo humanizado da presente invenção.

Polinucleótidos compreendendo polinucleótidos que codificam um polipéptido da SEQ ID N°:31 ou da SEQ ID N°:32 e/ou, preferencialmente e, um polipéptido da SEQ ID N°:7 ou da SEQ ID N°:8; e.g., codificando

- um polipéptido da SEQ ID N°:31 e um polipéptido da SEQ ID N°:7,
- um polipéptido da SEQ ID N°:31 e um polipéptido da SEQ ID N°:8,
- um polipéptido da SEQ ID N°:32 e um polipéptido da SEQ ID N°:7, ou
- um polipéptido da SEQ ID N°:32 e um polipéptido da SEQ ID N°:8.

"Polinucleótido", se não for aqui especificado em contrário, inclui qualquer polirribonucleótido ou polidesoxirribonucleótido, que pode ser RNA ou DNA não modificados, ou RNA ou DNA modificado, incluindo sem limitação RNA de cadeia simples e dupla, e RNA que é uma mistura de regiões de cadeias simples e dupla.

Um anticorpo humanizado CD45R0/RB e.g., que é um anticorpo humanizado ou quimérico, pode ser produzido através de técnicas de DNA recombinante. Assim, uma ou mais moléculas de DNA que codificam o CD45R0/RB podem ser

construídas, colocadas sob sequências de controle apropriadas e transferidas num hospedeiro adequado (organismo) para expressão através de um vector apropriado.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um polinucleótido que codifica uma cadeia simples, pesada e/ou leve de um anticorpo humanizado CD45RO/RB de acordo com a presente invenção; e a utilização de um polinucleótido de acordo com a presente invenção para a produção de um anticorpo humanizado CD45RO/RB de acordo com a presente invenção através de meios recombinantes.

Pode ser obtida uma molécula de ligação a CD45RO/RB de acordo com, e.g., analogamente, um método convencional juntamente com a informação aqui proporcionada, e.g., com o conhecimento da sequência de aminoácidos das regiões hipervariáveis ou variáveis e as sequências de polinucleótido que codificam essas regiões. Um método para construir um gene de domínio variável é e.g., descrito em EP 239 400 e pode ser resumidamente sumarizado como se segue: Pode ser clonado um gene que codifica uma região variável de um mAb de qualquer especificidade. Os segmentos de DNA que codificam o quadro e as regiões hipervariáveis são determinados e os segmentos de DNA que codificam as regiões hipervariáveis são removidos. São preparadas cassetes de CDR sintéticos de cadeia dupla através da síntese de DNA de acordo com as sequências de CDR e CDR', como aqui especificados. Estas cassetes são proporcionadas com extremidades coesivas de

modo a que se possam ligar nas junções de um quadro desejado de origem humana. Os polinucleótidos que codificam o anticorpo de cadeia podem também ser preparadas de acordo com, e.g., analogamente, a um método convencional. Um polinucleótido de acordo com a presente invenção assim preparado pode ser transferido convenientemente num vector de expressão apropriado.

As linhas celulares apropriadas podem ser encontradas de acordo com, e.g., analogamente, a um método convencional. São conhecidos vectores de expressão, e.g., compreendendo promotor(es) e genes adequados que codificam partes constantes da cadeia pesada e leve e.g., e estão disponíveis comercialmente. São conhecidos hospedeiros apropriados ou podem ser encontrados de acordo com, e.g., analogamente, a um método convencional e incluem culturas de células ou animais transgénicos.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um vector de expressão compreendendo polinucleótidos de acordo com a presente invenção, em que o vector é capaz de produzir anticorpo humanizado quando o referido vector está presente numa célula hospedeira compatível.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona uma célula hospedeira isolada que compreende um vector de expressão capaz de produzir anticorpo humanizado. Os autores descobriram também que um anticorpo humanizado CD45RO/RB de acordo com a presente invenção inibe respostas

aloimunes primárias de um modo dependente da dose, como determinado através de MLR *in vitro*. Os resultados indicam que as células que tinham sido aloactivadas na presença de um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção são comprometidas em relação às suas respostas ao aloantigénio. Isto confirma a indicação de que um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção pode actuar directamente nas células T alorreactivas efectoras e modular a sua função. Adicionalmente, as propriedades funcionais das células T derivadas das MLR primárias foram ainda estudadas em experiências de reestimulação em MLR secundárias, utilizando células estimuladoras específicas ou estimuladores de terceiros para avaliar a especificidade dos efeitos funcionais observados. Descobrimos que as células derivadas das MLRs primárias nas quais um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção está presente, foram comprometidas em relação à sua capacidade de resposta a estimulação óptima subsequente com células estimuladoras específicas, embora não exista anticorpo adicionado às culturas secundárias. A especificidade da inibição foi demonstrada pela capacidade das células tratadas com um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção responderem normalmente a células estimuladoras de dadores terceiros não relacionados. As experiências de reestimulação utilizando células T derivadas de culturas de MLR primárias indicam assim que as células que tinham sido aloactivadas por um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção são hipo-responsivas, *i.e.*, tolerantes, ao aloantigénio

original. São descritas outras actividades biológicas nos exemplos 7, e 9 a 13.

Para além disso, os autores descobriram que a proliferação celular em células pré-tratadas com um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção podem ser recuperadas através de IL-2 exógeno. Isto indica que o tratamento de células T alorreactivas com um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção induz um estado de tolerância. Na verdade, as respostas proliferativas reduzidas observadas nas células tratadas com um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção, foi devida ao enfraquecimento da função das células T, e estas células foram capazes de responder a IL-2 exógeno, indicando que estas células estão num estado anérgico, verdadeiramente não responsivo. A especificidade desta resposta foi demonstrada pela capacidade das células tratadas com um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção para proliferar normalmente em células do dador não relacionadas para o nível das células de controlo tratadas.

Adicionalmente, as experiências indicam que a ligação de um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção a CD45R0 e CD45RB pode inibir as respostas de memória de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) de dadores imunizados ao antigénio de revocação específico. A ligação de um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção a CD45R0 e

CD45RB é por isso também eficaz na inibição de respostas de memória a Ag solúvel. A capacidade de um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção inibir respostas de revocação ao tétano em PBMC de dadores imunizados indica que a molécula de ligação a CD45R0/RB de acordo com a presente invenção é capaz de se dirigir e modular a activação das células de memória. *E.g.*, Estes resultados indicam que um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção adicionalmente a reconhecer células T alorreactivas e activadas é capaz de modular a sua função, resultando na indução da energia das células T. Esta propriedade pode ser importante no tratamento de respostas imunes em curso aos autoantigénios e alergénios e possivelmente aos aloantigénios como se observam nas doenças autoimunes, alergia e rejeição crónica, e doenças, tais como psoríase, doença da bexiga inflamada, em que as respostas de memória desempenham um papel na manutenção do estado da doença. Crê-se que seja uma característica importante numa situação de doença, tal como em doenças autoimunes nas quais as respostas de memória aos autoantigénios podem desempenhar um papel principal para a manutenção da doença.

Os autores também descobriram que um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção pode modular as respostas de proliferação de células T numa resposta de linfócitos mistos (MLR) *in vivo*, *i.e.*, descobriu-se que um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção possuía propriedades

inibidoras correspondentes em testes *in vivo*, tais como por exemplo, prevenção de doença letal de enxerto xenogeneico versus hospedeiro (GvHD) ou supressão do processo inflamatório que medeia a rejeição de aloenxerto de pele humana em modelos de ratinhos SCID, ou prolongando a sobrevivência de aloenxerto em ilha humano num modelo de ratinho hu-PBL-NOD/SCID.

Um anticorpo humanizado CD5R0/RB de acordo com a presente invenção pode desse modo possuir propriedades imunossupressoras e tolerogénicas e pode ser útil para a indução de tolerância *in vivo* e *ex-vivo* a aloantígenos, autoantígenos, alérgenos e antígenos da flora bacteriana, *e.g.*, um anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção pode ser útil no tratamento e profilaxia de doenças *e.g.*, incluindo doenças autoimunes, tais como, mas não limitado a, artrite reumatóide, artrite psoriática, tiroidite autoimune, doença de Graves, diabetes de tipo I e de tipo II, esclerose múltipla, doença de Crohn (CD), colite ulcerosa (UC), lúpus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren, escleroderma, gastrite autoimune, glomerulonefrite, rejeição de transplante, tais como, mas não limitados a, aloenxerto de órgãos e tecidos e rejeição de xenoenxerto, *e.g.*, para o tratamento de destinatários de *e.g.*, transplantes de coração, pulmão, coração-pulmão combinados, fígado, rim, pancreáticos, da pele ou da córnea, doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD), tais como após transplante da medula óssea, e/ou rejeição de transplante de células de ilhas pancreáticas, e/ou também

psoríase, dermatite, tal como dermatite atópica e de contacto, incluindo dermatite de contacto alérgica, doença da bexiga inflamada e/ou alergias, incluindo asma alérgica.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona a utilização do anticorpo humanizado CD45R0/RB de acordo com a presente invenção, como um produto farmacêutico.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona o anticorpo humanizado de acordo com a presente invenção para utilização no tratamento e/ou profilaxia de doenças autoimunes; rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada e/ou alergias.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um anticorpo humanizado de acordo com a presente invenção no tratamento e/ou profilaxia de doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD).

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um anticorpo humanizado de acordo com a presente invenção para a preparação de um medicamento no tratamento de rejeição de transplante de células de ilhas pancreáticas.

Noutro aspecto, a presente invenção proporciona um método de tratamento e/ou profilaxia de doenças associadas com doenças autoimunes, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada e/ou alergias compreendendo administrar a um indivíduo em

necessidade desse tratamento e/ou profilaxia, uma quantidade eficaz de um anticorpo humanizado GD45R0/RB, de acordo com a presente invenção, *e.g.*, na forma de uma composição farmacêutica de acordo com a presente invenção.

Uma forma de realização da presente invenção proporciona um método de tratamento e/ou profilaxia de uma doença associada com rejeição de transplante de células de ilhas, *e.g.*, rejeição de transplante de células de ilhas, compreendendo administrar a um indivíduo em necessidade desse tratamento e/ou profilaxia, uma quantidade eficaz de um anticorpo humanizado de acordo com a presente invenção.

Nas formas de realização preferida, o referido anticorpo humanizado CD45R0/RB para utilização como um composto farmacêutico, para a produção de um medicamento ou, num método de tratamento e/ou profilaxia de uma doença associada com doenças autoimunes, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada e/ou alergias compreende um polipéptido da SEQ ID N°:31 ou da SEQ ID NO:32 e/ou um polipéptido da SEQ ID N°:7 ou da SEQ ID N°:8. Preferencialmente, o anticorpo humanizado CD45R0/RB compreende um polipéptido da SEQ ID N°:31 e um polipéptido da SEQ ID N°:8.

Uma "quantidade eficaz" de um anticorpo humanizado CD45R0/RB é uma quantidade suficiente para conseguir resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos, tais como diminuindo um ou mais sintomas que

resultem da doença autoimune, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada e/ou alergia, aumentando a qualidade de vida dos que sofrem de, diminuindo a dose de outros medicamentos necessários para tratar essas doenças, efeito de aumento de outra medicação, retardando a progressão da doença, e/ou prolongando a sobrevivência dos doentes, seja directamente ou indirectamente.

Uma quantidade eficaz pode ser administrada em uma ou mais administrações e pode ser alcançada ou não em conjunção com outro fármaco, composto, ou composição farmacêutica. Assim, uma "quantidade eficaz" pode ser considerada no contexto de administrar um ou mais agentes terapêuticos, e pode ser considerado um agente único para ser administrado numa quantidade eficaz se, em conjunção com um ou mais outros agentes, possa ser ou seja alcançado um resultado desejável.

Também é referido que um anticorpo humanizado CD45RO/RB da invenção pode ser administrado como o único ingrediente activo ou juntamente com outros fármacos em regimes de imunomodulação ou outros agentes anti-inflamatórios e.g., para o tratamento ou prevenção de doenças associadas com doenças autoimunes, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada e/ou alergias. Por exemplo, um anticorpo humanizado CD45RO/RB da invenção pode ser utilizado em combinação com um inibidor de calcineurina, e.g., ciclosporina A, ciclosporina G, FK-

506, ABT-281, ASM 981; um inibidor de mTOR, e.g., rapamicina, 40-O-(2-hidroxi)etil-rapamicina, CCI779, ABT578, AP23573, AP23464, AP23675, AP23841, TAFA-93, biolimus-7 ou bioimus-9; um corticosteróide; ciclofosfamida; azatioprina; metotrexato; um agonista receptor de S1P, e.g., FTY 720 ou um seu análogo; leflunomida ou seus análogos; mizoribina; ácido micofenólico; micofenolato de mofetilo; 15-desoxispergualina ou seus análogos; anticorpos monoclonais imunossupressores, e.g., anticorpos monoclonais contra receptores de leucócitos, e.g., MHC, CD2, CDS, CD4, CD11a/CD18, CD7, CD25, CD27, B7, CD40, CD45, CD58, CD137, ICOS, CD150 (SLAM), OX40, 4-1BB ou seus ligandos, e.g., CD154; ou outros compostos imunomoduladores, e.g., uma molécula de ligação recombinante possuindo pelo menos uma porção do domínio extracelular de CTLA4 ou um seu mutante, e.g., pelo menos uma porção extracelular de CTLA4 ou um seu mutante unido a uma sequência de proteína não CTLA4, e.g., CTLA4lg (e.g., designada ATCC 68629) ou um seu mutante, e.g., LEA29Y, ou outros inibidores da molécula de adesão, e.g., mAbs ou inibidores de baixo peso molecular incluindo antagonistas de LFA-1, antagonistas de Selectina e antagonistas de VLA-4.

Uma quantidade eficaz de um anticorpo humanizado CD45RO/RB da invenção, isoladamente ou em conjunto com outro fármaco, composto, ou composição farmacêutica pode ser administrada por qualquer via convencional, incluindo injeção ou por infusão gradual ao longo do tempo. A administração pode, por exemplo, ser oral, intravenosa,

intraperitoneal, intramuscular, intracavidade, subcutânea, tópica ou transdérmica. Por "co-administração" entende-se a administração dos componentes das composições da invenção em conjunto ou substancialmente ao mesmo tempo, ou no mesmo veículo ou em veículos separados, de modo que após administração oral, por exemplo, ambos os compostos estão presentes simultaneamente no tracto gastrointestinal. Preferencialmente, os compostos são administrados como uma combinação fixa.

Em, outro aspecto a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo humanizado CD45RO/RB de acordo com a presente invenção em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

O termo "veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável" como aqui utilizado significa um ou mais enchimentos sólidos ou líquidos compatíveis, diluentes ou substâncias de encapsulação que são adequadas para administração a mamíferos incluindo humanos. O termo "veículo" denota um ingrediente orgânico ou inorgânico, natural ou sintético, com que o ingrediente activo é combinado para facilitar a aplicação.

O termo "farmacêuticamente aceitável" significa um material não tóxico que não interfere com a eficácia da actividade biológica dos ingredientes activos. Estas preparações podem, de forma rotineira, conter concentrações

de sais farmaceuticamente aceitáveis, agentes de tamponamento, conservantes, veículos compatíveis, agentes potenciadores de imunidade suplementares tais como adjuvantes e citocinas e opcionalmente outros agentes terapêuticos, tais como agentes quimioterapêuticos.

Quando utilizados em medicina, os sais devem ser farmaceuticamente aceitáveis, mas os sais não farmaceuticamente aceitáveis podem convenientemente ser utilizados para preparar os seus sais farmaceuticamente aceitáveis e não são excluídos do âmbito da invenção.

As composições farmacêuticas podem conter agentes de tamponamento adequados, incluindo: ácido acético num sal; ácido cítrico num sal; ácido bórico num sal; e ácido fosfórico num sal. As composições farmacêuticas também podem conter, opcionalmente, conservantes adequados, tais como: cloreto de benzalcónio; clorobutanol; parabenos e timerosal.

As doses de polipéptido ou ácido nucleico que codifica o referido polipéptido administradas a um indivíduo podem ser seleccionadas de acordo com diferentes parâmetros, em particular de acordo com o modo de administração utilizado e o estado do indivíduo. Outros factores incluem o período desejado de tratamento. No caso em que a resposta num indivíduo é insuficiente nas doses iniciais aplicadas, doses elevadas (ou doses efectivamente superiores através de uma via de distribuição diferente,

mais localizada) pode ser empregue na extensão em que a tolerância do doente o permita.

As composições farmacêuticas podem convenientemente ser apresentadas numa forma de unidade de dosagem e podem ser preparadas por qualquer dos métodos bem conhecidos na técnica da farmácia. Todos os métodos incluem o passo de colocar o agente activo em associação com um veículo que constitui um ou mais ingredientes acessórios. Em geral, as composições são preparadas através da colocação uniformemente e intimamente do composto activo em associação com um veículo líquido, um veículo sólido finamente dividido, ou ambos, e depois, se necessário, dar forma ao produto.

As composições adequadas para administração oral podem ser apresentadas como unidades discretas, tais como cápsulas, comprimidos, lozengos, contendo cada um uma quantidade pré-determinada do composto activo. Outras composições incluem suspensões em líquidos aquosos ou líquidos não aquosos tais como um xarope, elixir ou uma emulsão.

As composições adequadas para administração parentérica compreendem convenientemente uma preparação estéril aquosa ou não aquosa de um polipéptido ou ácido nucleico que codifica o polipéptido, que é preferencialmente isotónico com o sangue do receptor. Esta preparação pode ser formulada de acordo com métodos conhecidos

utilizando agentes de dispersão ou de humedecimento adequados e agentes de suspensão. A preparação injectável estéril também pode ser uma solução ou suspensão injectável estéril num diluente ou solvente parentericamente aceitável não tóxico, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. Entre os veículos e solventes aceitáveis que podem ser empregues são água, solução de Ringer, e solução isotónica de cloreto de sódio. Adicionalmente, são convencionalmente empregues óleos estéreis, de fixação como um solvente ou meio de suspensão. Para este efeito, pode ser empregue qualquer óleo fixado moderado, incluindo mono ou diglicéridos sintéticos. Adicionalmente, podem ser utilizados ácidos gordos, tais como ácido oleico na preparação de injectáveis. Formulação transportadora adequada para administrações orais, subcutâneas, intravenosas, intramusculares, etc. pode ser encontrada em Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Uma composição farmacêutica pode compreender ainda, e.g., ingredientes activos, e.g., outros anticorpos imunomoduladores tais como, mas não confinados a anti-ICOS, anti-CD154, anti-CD134L ou proteínas recombinantes tais como, mas não confinadas a rCTLA-4 (CD152), rOX40 (CD134), ou agentes anti-inflamatórios ou compostos imunomoduladores tais como, mas não confinados a ciclosporina A, FTY720, RAD, rapamicina, FK506, 15-desoxispergualina, esteróides; como descrito acima. Essa composição farmacêutica pode compreender um anticorpo humanizado CD45RO/RB de acordo com a invenção e fármacos imunomoduladores e/ou agentes anti-

inflamatórios em formas de dosagem unitária separadas, preferencialmente em que as formas de dosagem unitária são adequadas para administração dos compostos componentes em quantidades sinergisticamente eficazes, em conjunto com instrução para utilização, opcionalmente com outros meios para facilitar a submissão à administração dos compostos componentes, e.g., um rótulo ou esquemas. As composições da invenção podem ser administradas como uma combinação livre, ou podem ser formuladas numa combinação fixa. As dosagens absolutas dos compostos variarão dependendo de vários factores, e.g., o indivíduo, a via de administração, a duração desejada, a taxa de libertação do agente activo e a natureza e gravidade da condição a ser tratada.

Doenças, como delineado acima para serem tratadas com um anticorpo humanizado CD45RO/RB da presente invenção isoladamente ou em combinação com outros fármacos incluem, mas não estão limitadas a doenças autoimunes, incluindo artrite reumatóide, artrite psoriática, tiroidite autoimune, doença de Graves, diabetes de tipo I e tipo II, esclerose múltipla, doença de Crohn (CD), colite ulcerosa (UC), lúpus sistémico eritematoso, síndrome de Sjögren, escleroderma, gastrite autoimune e glomerulonefrite; rejeição de transplante, incluindo, mas não limitado a, rejeição de aloenxertos e xenoenxertos de órgãos e tecidos, e.g., para o tratamento de destinatários de e.g., transplantes do coração, pulmão, coração-pulmão combinado, fígado, rim, pancreático, da pele ou da córnea, doença de enxerto versus hospedeiro (GVHD), tais como após transplante da medula

óssea, e/ou rejeição de transplante de células de ilhas pancreáticas; psoríase; dermatite, tal como dermatite atópica e dermatite de contacto incluindo dermatite de contacto alérgico; doença da bexiga inflamada e/ou alergias, incluindo asma alérgica.

EXEMPLOS

A invenção será entendida em maior detalhe com a referência aos exemplos seguintes. Eles não devem, contudo, ser encarados como limitantes do âmbito da invenção. Nos exemplos seguintes, todas as temperaturas estão em graus Celsius.

O "mAb candidato" ou "anticorpo quimérico" é uma molécula de ligação a CD45RO/RB de acordo com a presente invenção compreendendo a cadeia leve da SEQ ID N°:3 e a cadeia pesada da SEQ ID N°:4.

O "anticorpo humanizado" é uma molécula de ligação a CD45RO/RB de acordo com a presente invenção compreendendo um polipéptido da SEQ ID N°:8 e polipéptido da SEQ ID N°:9 (VHE/humV1, VHE/VL1 ou VHE/VLh), um polipéptido da SEQ ID N°:8 e um polipéptido da SEQ ID N°:10 (VHQ/humV1, VHQ/VL1 ou VHQ/VLh); um polipéptido da SEQ ID N°: 7 e polipéptido da SEQ ID N°:9 (VHE/humV2, VHE/VL2 ou VHE/VLm); um polipéptido da SEQ ID N°:7 e polipéptido da SEQ ID N°:10 (VHQ/humV2, VHQ/VL2 ou VHQ/VLm); um polipéptido da SEQ ID N°:8 e polipéptido da SEQ ID N°: 31

(VHEN73D/humV1, VHEN73D/VL1 ou VHEN73D/VLh); um polipéptido da SEQ ID N°:8 e polipéptido da SEQ ID N°:32 (VHQN73D/humV1, VHQN73D/VL1 ou VHQN73D/VLh); um polipéptido da SEQ ID N°:7 e polipéptido da SEQ ID N°:31 (VHEN73D/humV2, VHEN73D/VL2 ou VHEN73D/VLm); ou um polipéptido da SEQ ID N°:7 e polipéptido da SEQ ID N°:32 (VHQN73D/humV2, VHQN73D/VL2 ou VHEN73D /VLm).

São utilizadas as seguintes abreviaturas:

APC	células de apresentação de antígeno
CEX	cromatografia de permuta catiónica
c.p.m.	contagens por minuto
dhfr	di-hidrofolato redutase
EDTA	ácido etilenodinitrilotetraacético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção ligado a enzima
ESI-Q-TOF	ionização por electroaspersão - quadrupolo - tempo de voo
FACS	separação por emissão de fluorescência de células activadas
Fc	fragmento cristalizável
F(ab') ₂	ligação ao antígeno do fragmento; bivalente
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FBS	soro de bovino fetal
GVHD	doença de enxerto-vs-hospedeiro
HCMV	promotor do citomagalovírus humano
HPLC	Cromatografia Líquida de Elevado Desempenho
IFN- γ	interferão gama

IgE	imunoglobulina isotipo E
IgG	imunoglobulina isotipo G
IL-2	interleuquina-2
IU	unidades internacionais
MALDI-TOF	ionização de dessorção de laser assistida pela matriz - tempo de voo
MLR	reação de linfócitos mistos
MLC	cultura de linfócitos mistos
MP1	proteína de matriz 1 de <i>Hemophilus influenza</i>
MTX	metotrexato
PBS	soro fisiológico tamponado com fosfato
PBL	leucócitos de sangue periférico
PBMC	células mononucleares de sangue periférico
PCR	reação em cadeia pela polimerase
RP	cromatografia de fase reversa
SEC	cromatografia por exclusão de tamanho
SCID	imunodeficiência combinada grave
Treg	células T reguladoras
xGVHD	doença xeno-enxerto-vs-hospedeiro

Exemplo 1: Resposta primária de linfócitos mistos

(MLR)

Células

As amostras de sangue são obtidas de doadores humanos saudáveis. As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são isoladas por centrifugação em Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB) de leucócitos de sangue periférico

total, leucoferese ou camada leuco-plaquetárias com tipo de sangue conhecido, mas tipo de HLA desconhecido. Em algumas experiências de MLR, as PBMC são directamente utilizadas como as células estimuladoras após a irradiação a 40 Gy. Nas outras experiências, as células T foram empobrecidas em PBMC através da utilização de CD2 ou CD3 Dynabeads (Dyna, Oslo, Noruega). As esferas e as células contaminantes são removidas através de campo magnético. As PBMC empobrecidas em células T são utilizadas como simulador de células após a irradiação.

PBMC, células T $CD3^+$ ou células T $CD4^+$ são utilizadas como as células de resposta em MLR. As células são preparadas a partir de doadores diferentes para células estimuladoras. As células T $CD3^+$ são purificadas através de selecção negativa utilizando mAb anti-CD16 (Zymed, CA), Dynabeads IgG anti-ratinho de cabra, Dynabeads anti-CD14, Dynabeads CD19. Adicionalmente, são utilizadas Dynabeads anti-CD8 para purificar células T $CD4^+$. As células obtidas são analisadas por FACScan ou FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) e a pureza das células obtidas foi de >75%. As células são suspensas em meio RPMI1640, suplementado com 10% de FBS inactivado pelo calor, penicilina, estreptomina e L-glutamina.

Reagentes

É também criado o mAb quimérico anti-CD45R0/RB "mAb candidato" e um anticorpo quimérico de controlo correspondente ao isotipo. O anticorpo IgG1 de controlo de

ratinho (Humano) específico para KLH (hemocianina de lapa) ou IL-10 recombinante humano é adquirido a BD Pharmingen (San Diego, CA). O mAb 5c8 Anti-CD154 humano está de acordo com Lederman *et al* 1992.

Resposta primária de linfócitos Mistos (MLR)

Fracções de 1×10^5 PBMC ou 5×10^4 de células $CD3^+$ ou $CD4^+$ são misturadas com 1×10^5 PBMC irradiadas ou 5×10^4 PBMC empobrecidas em células T por irradiação (50 Gy) em cada poço de placas de cultura de 96 poços (Costar, Cambridge, MA) na presença do mAb indicado ou na ausência de Ab. Em algumas experiências, o fragmento $F(ab')_2$ de Ig anti-ratinho de cabra ou Ig anti-humano de cabra específico para a porção Fc (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) é adicionado a 10 $\mu\text{g/mL}$ adicionalmente ao mAb candidato para assegurar ligação reticulada óptima *in vitro* das moléculas alvo de CD45. As células mistas são cultivadas durante 4 ou 5 dias a 37 °C em 5% de CO_2 e a proliferação é determinada pulsando as células com ^3H -timidina durante as últimas 16-20 horas de cultura. Outras experiências são semelhantes às descritas acima, mas com as seguintes excepções: 1) O meio utilizado é EX-VIVO (Bio-Whittaker) contendo 10% de FBS e 1% de plasma humano; 2) É utilizado IgG total anti-ratinho (5 $\mu\text{g/mL}$) como o passo de ligação reticulada secundária; 3) A irradiação de células estimuladoras é 60 de Gy.

A MLR primária é realizada na presença do "mAb candidato" ou IgG1 quimérico de controlo (10 $\mu\text{g/mL}$) ambos com um reagente de segundo passo, fragmento $F(ab')_2$ de Ig

anti-humano de cabra específico para a porção Fc (10 µg/mL). A percentagem de inibição pelo "mAb candidato" é calculada em comparação com a proliferação celular na presença de IgG1 de controlo. Os resultados são apresentados na TABELA 1 abaixo:

TABELA 1

Inibição de MLR primária por 10 µg/mL de um mAb candidato de acordo com a presente invenção		
Responsivo	Estimulador (PBMC Irr.)	% de Inibição
#211 CD4	#219 CD3	63,51
#220 CD4	#219 CD3 depl.	63,07
#227 CD4	#220 CD3 depl.	65,96
#229 CD4	#219 CD3 depl.	50,76
Média do DP		60,83±6,83*
*Significativamente diferentes do valor de controlo (P<0,001)		

Um mAb candidato de acordo com a presente invenção inibe a MLR primária como pode ser observado a partir da TABELA 1. O efeito inibidor médio é 60,83 ± 6,83% em células T CD4⁺ derivadas de quatro dadores diferentes e estatisticamente significativo.

A inibição da MLR primária pelo "mAb candidato" é demonstrada como sendo dependente da dose no intervalo de 0,001 e 10 µg/mL do "mAb candidato" como apresentado na Figura 1.

A IC_{50} para a inibição de MLR primária por um "mAb candidato" é determinada a partir dos resultados de três experiências de MLR separadas utilizando PBMC de um dador como células de resposta. Assim, as células T $CD4^+$ de resposta do Dador #229 e #219 e PBMC irradiadas empobrecidas em células T como estimuladores são misturadas na presença de um "mAb candidato" ou Ab quimérico de controlo com 10 $\mu\text{g/mL}$ de fragmento $F(ab')_2$ de Ig anti-humano de cabra. As experiências são repetidas 3 vezes e a percentagem de proliferação na presença de um "mAb candidato" é calculada em comparação com a proliferação de células T na presença de Ab de controlo. O valor de IC_{50} é determinado utilizando Origin (V. 6.00®). O valor de IC_{50} da actividade celular é calculado como sendo $0,87 \pm 0,35 \text{ nM}$ ($0,13 \pm 0,052 \mu\text{g/mL}$).

Exemplo 2: MLR Secundária

De modo a avaliar se um "mAb candidato" induz a não capacidade de resposta de células T $CD4^+$ contra aloantígeno específicos, a MLR secundária é realizada na ausência de quaisquer anticorpos após a MLC primária. As células T $CD4^+$ são cultivadas com células estimuladoras alogeneicas irradiadas (PBMC empobrecidas em células T) na presença do anticorpo indicado em placas de cultura de 96 poços durante 10 dias (MLC primária). Depois, as células são recolhidas, depositadas em camada num gradiente de Ficoll-Hypaque para remover células mortas, lavadas duas vezes com RPMI, e reestimuladas com o mesmo estimulador, células estimuladoras de terceiros ou IL-2 (50 U/mL). As

células são cultivadas durante 3 dias e a resposta proliferativa é determinada pulsando as células com ^3H -timidina durante pelo menos 16-20 horas de cultura.

Especificamente, as células T CD4^+ são cultivadas com células estimuladoras alogeneicas irradiadas (PBMC empobrecidas em células T retiradas de outros dadores) na presença de 10 $\mu\text{g/mL}$ do "mAb candidato", Ab quimérica de IgG1 de controlo e fragmento de F(ab')_2 de Ig anti-humano de cabra. A proliferação de MLR primária é determinada no dia 5. Para a MLR secundária, as células de resposta e estimuladoras são cultivadas durante 10 dias na presença do "mAb candidato", depois as células são recolhidas, lavadas duas vezes em RPMI1640 e reestimuladas com estimulador específico, estimuladores de terceiros ou IL-2 (50 U/ml) na ausência de qualquer Ab. A proliferação celular é determinada no dia 3. Os resultados são apresentados na TABELA 2:

TABELA 2

Células T CD4^+ de Resposta Dador #	% de Inibição de MLR 2 ^{ária}
#211	49,90*
#220	59,33*
#227	58,68*
* Significativamente diferentes do valor de controlo (p=<0,001 determinado pelo teste t, SigmaStat V.2.03). # p=<0,046	

De modo a testar se a proliferação dificultada é devida à incapacidade de resposta como uma consequência do tratamento com um "mAb candidato", as células derivadas de MLR primária são cultivadas na presença de IL-2 (50 U/mL). A adição de IL-2 resulta na recuperação de respostas proliferativas das células T que tinham sido tratadas com um "mAb candidato" em MLR primária, para os níveis semelhantes aos observados na presença de Ab de controlo IgG1. Estes resultados indicam que a resposta secundária dificultada em células T tratadas com um "mAb candidato" é devida à alteração funcional das células T de resposta que se tornam incapazes de resposta às células estimuladoras específicas.

A percentagem de inibição é calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{c.p.m. com Ab de controlo} - \text{c.p.m. com "mAb candidato"}}{\text{c.p.m. com Ab de controlo}} \times 100$$

A análise estatística é realizada utilizando SigmaStat (Vers. 2.03).

Os resultados são analisados por ANOVA de duas vias seguido pelo método de Dunnett. Em todos os procedimentos de teste as probabilidades <0,05 são consideradas como significativas. Em algumas experiências é utilizado o teste t (SigmaStat V.2.03).

Exemplo 3: Estudos de sobrevivência in vivo em ratinhos SCID

Enxertia de hu-PBL em ratinhos SCID

Células mononucleares de sangue periférico humanas (PBMC) são injectadas intraperitonealmente em ratinhos SCID C.B 17/GbmsTac-Prkdc^{scid} Lyst^{bg} (Taconic, Germantown, NY) numa quantidade suficiente para induzir uma doença letal de enxerto xenogeneico versus hospedeiro (xGvHD) em >90% dos ratinhos num espaço de 4 semanas após a transferência celular. Esses ratinhos SCID tratados são de aqui em diante designados como ratinhos hu-PBL-SCID.

Tratamento com Mab de ratinhos hu-PBL-SCID

Os ratinhos Hu-PBL-SCID são tratados com um "mAb candidato" ou mAbs de controlo similares ao isotipo de ratinho ou quimérico no dia 0, imediatamente após injeção de PBMC, no dia 3, dia 7 e a intervalos de uma semana daí em diante. Os Mabs são distribuídos subcutaneamente em 100 µL de PBS a uma concentração final de 5 mg/kg de peso corporal. O tratamento foi parado quando todos os ratinhos de controlo estavam mortos.

Avaliação dos resultados do tratamento

O critério principal para avaliar a eficácia de

um "mAb candidato" neste estudo foi a sobrevivência dos ratinhos hu-PBLSCID. A significância dos resultados é avaliada pelo modelo estatístico da análise de sobrevivência utilizando o teste de Log-rank (método Mantel) com o auxílio do software Systat v9.01. O método de análise de sobrevivência é um teste não paramétrico, que não apenas considera se um ratinho particular está ainda vivo, mas também se foi sacrificado por razões irrelevantes para o tratamento/doença, tais como o requisito de desempenhar a análise *in vitro* com os seus órgãos/células. As biopsias de fígado, pulmão, rim e baço são obtidas a partir de ratinhos mortos para posterior avaliação. Adicionalmente, os ratinhos hu-PBL-SCID são pesados no início (antes da transferência celular) e ao longo (a cada dois dias) da experiência como uma estimativa indirecta do seu estado de saúde. As linhas de regressão linear foram criadas utilizando os valores do peso corporal versus dias pós-transferência de PBMC obtidos de cada ratinho e subsequentemente, os seus declives (ratinhos de controlo versus tratados com anti-CD45) foram comparados utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney.

Resultados

Todos os ratinhos hu-PBL-SCID tratados com controlos de mAb de ratinho tinham leucócitos humanos infiltrados no pulmão, fígado e baço e morreram (4/4) num período de cerca de 2 a 3 semanas após a transferência de

células. A morte é uma consequência provável de xGvHD. Os ratinhos tratados com mAb de controlo para além disso perderam peso de um modo linear, cerca de 10% e mais num período de 3 semanas.

Todos os ratinhos hu-PBL-SCID tratados com um "mAb candidato" sobreviveram (4/4) sem qualquer sinal aparente da doença mais do que 4 semanas, mesmo se o tratamento com o "mAb candidato" tenha sido parado após 3 semanas. Os ratinhos tratados com "MAb candidato" aumentaram o peso de um modo linear, até cerca de 5% num período de 4 semanas.

Exemplo 4: Expressão dos anticorpos da invenção

Expressão de anticorpo humanizado compreendendo uma SEQ ID N°:7, SEQ ID N°:8, SEQ ID N°:9 SEQ ID N°:10 SEQ ID N°:31 ou SEQ ID N°:32

Os vectores de expressão de acordo com os mapas plasmídicos apresentados nas Figuras 2 a 11 são construídos, compreendendo os nucleótidos correspondentes que codificam a sequência de aminoácidos da região variável humanizada da cadeia leve humV1 (SEQ ID N°:8; Figuras 4 e 6), região variável humanizada da cadeia leve humV2 (SEQ ID N°:7; Figuras 5 e 7), região variável humanizada da cadeia pesada VHE (SEQ ID N°:9; Figura 3 e 10), ou região variável humanizada da cadeia pesada VHQ (SEQ ID N°:10; Figuras 2 e

11), região variável humanizada da cadeia pesada VHE-N73D (SEQ ID N°:31; Figura 8) ou região variável humanizada da cadeia pesada VHQ-N73D (SEQ ID N°:32; Figura 9), respectivamente. Estes vectores de expressão possuem as sequências de DNA (nucleótidos) SEQ ID N°: 15 e SEQ ID N°: 41 (VHQ), SEQ ID N°: 16 e SEQ ID N°: 40 (VHE), SEQ ID N°: 17 e SEQ ID N° 36 (humV1), SEQ ID N°: 18 e SEQ ID N°: 39 (humV2), ou SEQ ID N° 37 (VHEN73D) e SEQ ID N° 38 (VHQ-N73D).

Construção de vectores de expressão da cadeia pesada e leve do anticorpo humanizado para expressão em células COS

Vectores de expressão de cadeia leve kappa humana para as versões VLh e VLm

De modo a construir o vector de expressão final que codifica a cadeia leve humanizada completa do isotipo kappa humano, os fragmentos de DNA que codificam as regiões variáveis da cadeia leve completa (VLh e VLm) foram excisados a partir de VLh e VLm contendo vectores de clonagem PCR-Script (Stratagene) (região VLm) utilizando *HindIII* e *BglIII*. Os fragmentos purificados a partir do gel foram então subclonados nos sítios *HindIII* e *BamHI* do vector de expressão C21-HCMV Kappa que foi criado durante a construção do anticorpo anti-IgE humanizado TESC-21 (Kolbinger et al 1993) e que foram originalmente recebidos

de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, Londres, UK) (Maeda *et al.* 1991). Os produtos de ligação foram purificados através de extracção com fenol/clorofórmio, e sujeitos a electroporação para o interior da estirpe competente para electroporação Epicurian Coli® XL1-Blue (Cat. N° #200228, Stratagene). Após plaquear em placas de agar LB/amp durante a noite a 37 °C, cada 12 colónias foram seleccionadas para preparar DNA plasmídico a partir de uma cultura de 3 mL utilizando o BioRobot 9600 (Qiagen). Isto produziu os vectores de expressão da cadeia leve para as versões do anticorpo humanizado VLh e VLM, respectivamente, como ainda descrito nas Figuras.

Vectores de expressão da cadeia pesada de gama-1 humana para VHQ

Para a construção do vector de expressão VHQ, foi realizada uma abordagem passo-a-passo. Primeiro, a região variável completa de VHQ foi montada através de PCR de acordo com a metodologia como descrita em Kolbinger *et al* 1993 (*Protein Eng.* 1993 Nov; 6(8):971-80) e subclonada no C21-HCMV-gamma-1 de expressão do qual a inserção C21 tinha sido removida utilizando as mesmas enzimas. Um fragmento *HindIII/BamHI* de PCRScript clone VHQ contendo a região variável completa foi então subclonado no vector de expressão C21-HCMV-gamma-1 clivado com as mesmas enzimas. Isto produziu o vector de expressão final para o anticorpo humanizado versão VHQ.

Vectores de expressão da cadeia pesada gama-1 humana para VHE

A construção do vector de expressão VHE final que codifica para a cadeia pesada humanizada completa do isotipo de gama-1 humana foi alcançado através de ligação directamente a um fragmento de PCR restringido com *HindIII* e *BamHI* que codifica a região variável nos sítios *HindIII* e *BamHI* do vector de expressão gama-1 de C21-HCMV que foi criado durante a construção do anticorpo anti-IgE humanizado TESC-21 (Kolbinger et al. 1993) e que foi também originalmente recebido de M. Bendig (MRC Collaborative Centre, London, UK) (Maeda et al. 1991).

Expressão transiente em células COS

O seguinte protocolo de transfecção é adaptado para células COS aderentes em placas de cultura de células de 150 mm, utilizando SuperFect™ Transfection Reagent (Cat. N°301305, Qiagen). Os quatro diferentes vectores de expressão descritos acima são utilizados para transfecção transiente de células. Para a expressão do anticorpo humanizado, cada um de dois clones contendo inserções de cadeia pesada (VHE ou VHQ, respectivamente) são co-transfectados para células com cada um de dois clones que codificam as cadeias leves (humV1 ou humV2, respectivamente), num total de 4 combinações diferentes de vectores de expressão de cadeia pesada e leve (VHE/humV1, VHE/humV2,

VHQ/humV1 e VHQ/humV2). Antes da transfecção, os plasmídeos são linearizados com a endonuclease de restrição *PvuI* que cliva na região que codifica o gene de resistência para ampicilina. No dia antes da transfecção, 4×10^6 células COS em 30 mL de meio de cultura fresco são semeados em 150 mm de placas de cultura de células. A sementeira a esta densidade celular produziu geralmente 80% de confluência após 24 horas. No dia de transfecção, são diluídas quatro diferentes combinações de vectores de expressão DNA de cadeia pesada e leve linearizados (15 µg cada) num volume total de 900 µL de meio fresco sem soro e antibióticos. É então misturado completamente 180 µL de SuperFect Transfection Reagent com a solução de DNA. A mistura de DNA é incubada durante 10 min à temperatura ambiente para permitir a formação do complexo. Embora a formação do complexo ocorra, o meio de crescimento é removido das culturas de células COS, e as células são lavadas uma vez com PBS. São então adicionados 9 mL de meio de cultura fresco (contendo 10% de FBS e antibióticos) são então adicionados a cada tubo de reacção contendo os complexos de transfecção e bem misturados. A preparação final é imediatamente transferida para cada uma de 4 culturas a serem transfectadas e cuidadosamente misturadas. As culturas celulares são então incubadas com os complexos de DNA durante 3 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Após incubação, o meio contendo complexos de transfecção é removido e substituído com 30 mL de meio de cultura fresco. A 48 h após transfecção, os sobrenadantes da cultura são recolhidos.

Concentração dos sobrenadantes da cultura

Para análise de ELISA e FACS, os sobrenadantes da cultura recolhidos das células COS transfectadas com plasmídeos de cadeia pesada e leve são concentrados como se segue. São adicionados 10 mL de cada sobrenadante a Centriprep YM-50 Centrifugal Filter Devices (Cat. N° 4310, Millipore) como descrito pelo fabricante. Os filtros Centriprep são centrifugados durante 10 min a 3000 rpm à temperatura ambiente. O passo de centrifugação é então repetido novamente com os restantes 20 mL de sobrenadante utilizando apenas 5 min de centrifugação e supervisionando a evolução da concentração. Os 500 µL intermediários de sobrenadante concentrado são recuperados, transferidos para novos Microcon Centrifugal Filter Devices (Cat. N° 42412, Microcon) e ainda concentrados seguindo o protocolo do fabricante. Os sobrenadantes concentrados são centrifugados quatro vezes durante 24 min a 3000 rpm à temperatura ambiente, uma vez durante 10 min a 6000 rpm e depois, três vezes durante 5 min, sempre supervisionando a evolução da concentração. O volume final do meio condicionado concentrado atingido é de 100-120 µL correspondendo a uma concentração de 250 até 300 vezes o meio de cultura original e é armazenado a 4 °C até utilização. Para comparação e controlo, o meio de cultura das células não transfectadas é concentrado de forma semelhante, utilizando o mesmo protocolo de centrifugação descrito acima.

Criação de transfectantes de mieloma Sp2/0 estável excretando anticorpos anti-CD45RO/RB humanizados

A linha celular de mieloma de ratinho Sp2/0 (ATCC, CRL-1581) é sujeita a electroporação com os vectores de expressão CHO acima descritos codificando a cadeia pesada (VHE ou VHQ) e leve (humV1 ou humV2) dos anticorpos de ligação a CD45RO/RB humanizados. São utilizadas quatro combinações diferentes de vectores de expressão de cadeia pesada e leve (VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2) para transfecção de acordo com o seguinte protocolo: 20 µg de DNA superenrolado de cada plasmídeo é misturado numa cuvette de electroporação (intervalo de 0,4 cm) com 8×10^6 células Sp2/0 vivas, suspensas em meio de cultura DMEM/10%FCS. As condições da electroporação são 1500 V, 25 µF utilizando um instrumento BioRad GenePulser. Após a electroporação, as células são cultivadas durante 20 h em meio de cultura (DMEM suplementado com 10% FCS penicilina, estreptomicina e L-glutamina). No dia dois o fármaco de selecção G418 (Cat. N° 10131-019, Gibco) é adicionado para uma concentração final de 1 mg de fármaco activo/mL e as células são distribuídas para uma placa de 96 poços, 200 µL de cada poço com aprox. 10^5 células por poço. Dez a 15 dias mais tarde, os clones que sobreviveram a G418 são expandidos em meio contendo G418. A secreção de mAbs humanizados a partir destes transfectantes é avaliada por ELISA, utilizando um anticorpo Ig anti-humano de cabra G/Fcγ de revestimento (Cat. N° 109-005-098, Jackson Labs) e um anticorpo acoplado à peroxidase contra a cadeia leve

kappa humana (Cat. N° A- 7164, Sigma). Os transfectantes, que têm uma classificação positiva neste ensaio são seleccionados para uma comparação de produtividade numa base de uma célula por dia, novamente utilizando ELISA (ver abaixo). O melhor clone de cada transfectante é seleccionado para subclonagem imediata através da diluição limitante, utilizando uma densidade de sementeira de 1 célula por poço. A produtividade de subclones que sobrevivem a G418 é novamente determinada como descrito acima. Os subclones são expandidos em meio de selecção contendo G418, até que o volume da cultura alcance os 150 mL, em cujo estágio a cultura é prosseguida sem G418 em frascos destinados a alimentar frascos rolantes.

Após a primeira transfecção e selecção, os transfectantes estáveis cresceram nas placas de 96 poços a uma frequência de 20,8% para VHE/humV1, 11,5% para VHQ/humV1, 18,8% para VHE/humV2 e 7,3% para VHQ/humV2. Após duas rondas de subclonagem os melhores dois produtores são o clone 1.33.25 (3,87 pg/célula/dia) e o clone 1.33.26 (3,43 pg/célula/dia) para VHE/humV1 e o clone 12.1.4 (1,19 pg/célula/dia) e o clone 12.1.20 (1,05 pg/célula/dia) para VHQ/humV1. Os transfectantes Sp2/0 estáveis para VHE/humV1 e VHQ/humV1 são subsequentemente expandidos para a produção e purificação do anticorpo.

Os anticorpos são purificados a partir de sobrenadantes de linhas celulares de mieloma SP2/0 transfectadas de forma estável contendo 10% de FCS por uma

combinação de cromatografia de afinidade utilizando uma matriz de IgGFc anti-humana imobilizada e cromatografia por exclusão de tamanho. Se necessário, a endotoxina é removida utilizando uma coluna Acticlean Etox (Sterogene Bioseparations).

Construção dos vectores da cadeia pesada e leve do anticorpo humanizado para expressão em células Sp2/0

Vectores de expressão da cadeia leve kappa humana para as versões VLh e VLm:

O cDNA de humV1 (= VL1) ou humV2 (= VL2) é amplificado por PCR a partir do plasmídeo de expressão de CHO SEQ ID N°: 17 ou SEQ ID N°: 18 respectivamente, utilizando os iniciadores HuCD45LC-Mlu (5'-AAAACGCGTTGTGACATTCTGCTGACCCAGTCT-3'; SEQ ID N°: 42) e HuCD45LC-Hind (5'-AAAAAAGCTTGGTCCCCTGGCCGAACGTGAA-3'; SEQ ID N°: 43). Cada fragmento de PCR de 321 pb é digerido com *MluI* e *HindIII* e ligado directamente ao vector de expressão de cadeia leve chA6HCk.dhfr que é digerido com as mesmas enzimas. Os plasmídeos resultantes são denominados LCVL1Sp20 (SEQ ID N°: 36; Figura 6) e LCVL2Sp20 (SEQ ID N°: 39; Figura 7) respectivamente. LCVL1Sp20 é então utilizado para a expressão em células Sp2/0 do anticorpo humanizado VHE/humV1, VHQ/humV1 ou VHE-N73D/humV1; LCVL2Sp20 pode ser então utilizado para a expressão em células Sp2/0 do anticorpo humanizado VHE/humV2 VHQ/humV2 ou VHE-N73D/humV2.

Vectores de expressão de cadeia pesada gama-1 humana para VHQ e para VHE

As duas regiões de cDNA de VH humanizada são amplificadas por PCR a partir dos plasmídeos recombinantes HCMV-G1 HuA6-VHE (SEQ ID N°: 16; Figura 3) e HCMV-G1 HuA6-VHQ (SEQ ID N°: 15 Figura 2) respectivamente, utilizando os iniciadores de PCR HuCD45HCEup (5'-CAGGCAGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCA-3'; SEQ ID N°: 44) ou HuCD45HCQup (5'-CAGGCACAGGTGCAGCTGGTGGAGTCA-3'; SEQ ID N°: 45) e HuCD45HClo (5' -AAATCCTTCTAGAACTCACCTGAGGAGAC-3'; SEQ ID N°: 46). As extremidades 3' dos fragmentos de PCR foram digeridas com *BstEII*. Cada fragmento de PCR é então clonado no vector da cassette da cadeia pesada HCcassREAL cortada com *BstEII* e o cortador de extremidades rombas *HincII*. Os plasmídeos resultantes são intermediários para as construções de expressão final e são denominados HCcassHVESP20 e HCcassHVQSP20, respectivamente. Esta subclonagem também conduz a uma alteração da sequência líder que está associada a ambas as regiões de VH nos vectores originais. Embora a sequência de aminoácidos da sequência líder antiga seja MDWTWRVFCLLAVVAPGAHS (SEQ ID N°: 47), esta foi substituída durante a subclonagem por MAWVWTLPLFLMAAAQSVQA (SEQ ID N°: 48).

Os intermediários HCcassVHESP20 ou HCcassVHQSP20 são digeridos com *ScaI* e subsequentemente, os plasmídeos são digeridos com *BamHI* e *EcoRI*. Os fragmentos de 2,9 kb contendo o promotor da cadeia pesada de Ig e a região VH

são purificados e ligados com o fragmento de 8,7 kb da construção de expressão de uma cadeia pesada digerida com *Bam*HI e *Eco*RI. Os plasmídeos resultantes são denominados HCVHESp20 (SEQ ID N°: 40; Figura 10) e HCVHQSp20 (SEQ ID N°: 41; 11), respectivamente; e são utilizados para a expressão em células Sp2/0 do anticorpo humanizado VHE/humV1.VHQ/humV1.

Vector de expressão da cadeia pesada de gama-1 humana para VHEN73D

Os vectores de expressão HCVHESp20 (SEQ ID N°: 40; Figura 10) e HCVHQSp20 (SEQ ID N°: 41; Figura 11), são utilizados como moldes para mutagénese dirigida a um sítio para alcançar uma mutação N73D, (permuta de uma asparagina para aspartato na posição de aminoácidos 73 da cadeia pesada do anticorpo humanizado). Esta mutação elimina um sítio de N-glicosilação putativo. A mutagénese é realizada com o QuikChange® Multi-Site Directed Mutagenesis kit (Stratagene) e o iniciador aCD45H-N73D (5'-fosfo GCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACAGC-3'; SEQ ID N°: 49) de acordo com o manual do kit. A sequência das construções resultantes HCVHEN73DSp20 e HCVHQN73DSp20 é confirmada e é revelada como SEQ NO: 37 e SEQ NO: 38, e as Figuras 8 e 9, respectivamente. HCVHEN73DSp20 (SEQ NO: 37) em conjunto com a construção de expressão da cadeia leve LCVL1 SP20 (SEQ NO: 36) são utilizados para a expressão em células Sp2/0 do anticorpo humanizado VHE-N73D/humV1.

Criação de transfectantes de mieloma Sp2/0
estáveis excretando anticorpo anti-CD45RO/RB humanizado
VHE-N73D/humV1

A linha celular de células de mieloma de ratinho Sp2/0 Ag14.10 é electroporada com vectores que codificam a cadeia pesada (HCVHEN73Dsp20; SEQ ID N°: 37) e leve (LCVL1SP20; SEQ ID N°: 36) do anticorpo humanizado VHEN73D/humV1. Para a transfecção, são utilizadas as células na fase de crescimento exponencial com uma viabilidade superior a 95%. As células são lavadas duas vezes com tampão TF frio (sacarose a 272 mM, MgCl₂ a 1 mM, tampão fosfato a 7 mM pH 7,4) e a concentração celular é ajustada para 2×10^7 células/mL em tampão TF. 0,8 mL da suspensão celular é misturado com 15 µg de cada uma das construções da cadeia pesada e leve e colocado em gelo durante 10 minutos. São realizadas cinco transfecções por electroporação utilizando o Biorad Gene Pulser (280V e 25 PF). Após as células de electroporação serem colocadas em gelo durante 15 minutos seguido por transferência para 50 mL de meio de cultura frio (meio à base de RPMI sem FCS) e incubadas durante 2 dias a 37 °C e 5% de CO₂.

Para a selecção de transfectantes, as células foram cultivadas na presença de 1,1 mg/mL de G418 (Geneticin, Gibco lot 3069464) durante aproximadamente 2 a 3 semanas. O marcador de amplificação dhfr (di-hidrofolato redutase) localizado na construção da cadeia leve permite a amplificação do gene dhfr assim como o transgene pelo

análogo de ácido fólico metotrexato (MTX). Para a amplificação do gene, são cultivadas células resistentes a G418 na presença de 200 nM MTX durante um período de 2-3 semanas seguido por um outro aumento na concentração de MTX a 1 μ M resultando numa mistura de células heterogêneas amplificadas. A concentração do anticorpo é determinada através de HPLC de Proteína A analítica. As melhores misturas de produção são seleccionadas para clonagem através da diluição limitante, utilizando uma densidade de sementeira de 0,3 células por poço para isolar os clones de produção elevada.

Exemplo 5: Determinação de expressão de IgG recombinante humana por ELISA

Caracterização de VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2

Para determinar as concentrações de IgG de anticorpo recombinante humano expresso nos sobrenadantes da cultura, foi desenvolvido um protocolo de ELISA de sanduíche e foi otimizado utilizando IgG humano como padrão. Placas de microtitulação de 96 poços de fundo liso (Cat. N° 4-39454, Nunc Immunoplate Maxisorp) são revestidas durante a noite a 4 °C com 100 μ L de IgG anti-humano de cabra (molécula total, Cat. N° I1011, SIGMA) à concentração final de 0,5 μ g/mL em PBS. Os poços são então lavados 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20) e bloqueado durante 1,5 horas a 37 °C com tampão

bloqueador (0,5% de BSA em PBS). Após 3 ciclos de lavagem, as amostras de anticorpo e o IgG humano padrão (Cat. N°. 14506, SIGMA) são preparadas através de diluição em série de 1,5 vezes em tampão bloqueador. São transferidos 100 µL de amostras diluídas ou padrão em duplicado para a placa revestida e incubadas durante 1 hora à temperatura ambiente. Após incubação, as placas são lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e subsequentemente incubadas durante 1 hora com 100 µL de cadeia leve kappa de IgG anti-humana de cabra conjugada com peroxidase de rábano (Cat. N° A-7164, SIGMA) diluído a 1/4000 em tampão bloqueador. Os poços de controlo receberam 100 µL de tampão bloqueador ou concentrado em meio de cultura normal. Após lavagem, é realizada a quantificação colorimétrica de peroxidase ligada numa amostra e os poços padrão, utilizando um TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Cat. N° 172-1067, Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de peroxidase é adicionada a 100 µL por poço e incubada durante 30 min à temperatura ambiente na escuridão. A reacção colorimétrica é parada através da adição de 100 µL de ácido sulfúrico a 1 M e a absorvência em cada poço é lida a 450 nm, utilizando um leitor de placas de ELISA (Modelo 3350-UV, BioRad).

Com um coeficiente de correlação de 0,998 para a curva padrão de IgG, são determinadas as concentrações seguintes para os quatro diferentes concentrados de cultura (concentradas cerca de 250-300 vezes) obtidas a partir das células COS transfectadas:

Sobrenadante VHE/humV1 e = 8,26 µg/mL

Sobrenadante VHE/humV2 = 6,27 µg/mL

Sobrenadante VHQ/humV1 = 5,3 µg/mL

Sobrenadante VHQ/humV2 = 5,56 µg/mL

Análise de Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC)

Os anticorpos purificados por afinidade VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2 são analisados por Cromatografia de Exclusão de Tamanho (SEC) num TSKgel Super SW3000SWXL de modo a determinar o teor de proteína, a percentagem de pequenos agregados (anticorpos oligoméricos) assim como possível por produtos secundários e de degradação. Os cromatogramas demonstram para VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2 que o pico principal é separado e que a separação é mais pronunciada para misturas com a cadeia pesada E (Figura 12). Os resultados sugerem que existem pelo menos duas moléculas com um tempo de retenção típico para um anticorpo IgG presente em cada amostra.

SDS-PAGE em condições de redução

A análise das moléculas de ligação a CD45RO/RB humanizadas VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2 por SDS-PAGE em condições de redução (gel em gradiente, 4 a 20% de gel de Tris-Glicina, Novex) apresenta a presença de uma banda inesperada adicional, migrando ligeiramente acima da

banda que corresponde à banda da cadeia pesada em cada amostra. A diferença na massa é estimada como estando no intervalo de 2 até 4 kDa. A transferência de Western revela que a banda superior é reconhecida por anticorpos anti-humanos (H + L) sugerindo que a banda adicional é uma variante da cadeia pesada.

Cromatografia de Permuta Catiônica (CEX)

A carga de heterogeneidade é avaliada através de cromatografia de permuta catiônica (CEX) utilizando uma coluna de PolyCatA (PolyLC Inc). Embora o mAb quimérico seja essencialmente isento de carga de heterogeneidade, outras variantes para além da lisina C-terminal, todas moléculas de ligação a CD45RO/RB humanizadas, *i.e.*, VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2, foram determinadas como sendo muito heterogêneas na carga. Uma razão comum para a heterogeneidade da carga nos anticorpos é a presença/ausência de Lys na extremidade C-terminal da cadeia pesada do anticorpo resultando em três picos em CEX. O número elevado de picos visíveis em cada cromatograma (>10; Figura 13) indica que pelo menos uma modificação adicional está presente nas quatro moléculas de ligação a CD45RO/RB.

SDS-PAGE

De modo a avaliar as diferenças moleculares entre as duas espécies de anticorpo encontradas nas misturas de

proteína de VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2, VHE/humV2 é seleccionado para ser analisado em maior detalhe. Os dois picos de SEC de VHE/humV2 são recolhidos de um modo semi-preparativo e reanalisados por SEC para confirmar a sua pureza. As fracções recolhidas por SEC (Fracção 1 e Fracção 2) são então analisadas por SDS-PAGE em condições de redução. A proporção da banda inesperada adicional a cerca de 49 kDa é diferente entre as duas fracções. A Fracção 2 é quase isenta desta banda mais elevada adicional.

Espectrometria de Massa ESI-Q-TOF

As fracções de SEC F1, F2 e a mistura de proteína de VHE/humV2 são então adicionalmente analisadas por espectrometria de massa de ESI-Q-TOF. Nos espectrogramas da mistura de proteína e Fracção 2, os mesmos grupos de sinais são observadas. O primeiro grupo de sinais a cerca de 148 000 Da, é encontrado na mistura de proteína e a Fracção 2, não é detectado na Fracção 1. Na Fracção 1, um segundo grupo de sinais (a cerca de 150 300 Da) é detectado adicionalmente a outro grupo de sinais a cerca de 152 500 Da. O segundo grupo de sinais a cerca de 150 320 Da não pode ser correlacionado com quaisquer formas de anticorpo normalmente observadas. Estas descobertas sugerem que os dois picos em SEC e as duas bandas mais elevadas em SDS-PAGE em condições de redução correspondem cada uma a variantes de uma proteína esperada.

Cromatografia em Fase Reversa

Para obter um padrão menos complexo na espectroscopia de massa, as cadeias de anticorpo são ainda analisadas separadamente. As fracções são reduzidas e alquiladas. De modo a confirmar a totalidade das reacções, as amostras reduzidas e alquiladas são analisadas através de cromatografia de fase reversa (RP) (SORBAX, Poroshell 300SB-C8). Após redução e alquilação, a forma do pico é quase a mesma que após apenas a redução. É observado um desvio no tempo de retenção. São obtidos padrões semelhantes para amostras reduzidas e alquiladas da SEC Fracção 1 e da SEC Fracção 2. A amostra da mistura de proteína VHE/humV2, SEC Fracção 1 e SEC Fracção 2 (reduzidas & alquiladas) são analisadas com espectrometria de massa de ESI-Q-TOF. Vários picos de massa podem ser atribuídos às formas de anticorpo esperadas. Alguns dos picos principais encontram-se em todas as três amostras (mistura de proteínas, F1 e F2) mas as suas intensidades na Fracção 2 são muito baixas (Figura 14).

Análise de hidratos de carbono de variantes da cadeia pesada

O anticorpo reduzido e alquilado é injectado na coluna de cromatografia de fase reversa (RP) e os dois picos correspondentes das variantes de cadeia pesada são recolhidos. Os perfis de oligossacárido destes anticorpos de RP-fraccionado são então determinados. Entre os resíduos

de oligossacáridos antecipados G0 e G1 encontrados em todas as amostras, são detectados vários outros picos no cromatograma da Fracção 1 (vestígios destes picos são também detectáveis nos cromatogramas da Fracção 2 e mistura de proteína).

Tomados em conjunto, os resultados sugerem que a espécie de anticorpo maior contém glicosilação adicional, não encontrado tipicamente em anticorpos monoclonais expressos em SP2/0, que são responsáveis pela diferença de massa. Uma vez que a glicosilação do complexo grande encontrada através da análise de hidratos de carbono e espectrometria de massa seria muito improvável para o sítio de glicosilação conservado na região constante do anticorpo, uma pesquisa para outros sítios possíveis é realizada na sequência de aminoácidos dos anticorpos humanizados. Um sítio potencial (N73) para a N-glicosilação (N-X-S) é identificado no domínio variável das duas variantes da cadeia pesada.

Fraccionamento Preparativo por CEX

É realizada outra análise utilizando material purificado a partir da mistura VHE/humV1. Para reduzir a heterogeneidade do material, a lisina C-terminal é removida pelo tratamento com carboxipeptidase-B. O anticorpo VHE/humV1 é fraccionado pela cromatografia de permutação catiónica preparativa utilizando SP Sepharose (Pharmacia). A coluna é equilibrada com tampão fosfato de sódio a 25 mM,

pH 6,0 (= tampão A) e a proteína ligada é eluída com 250 mM de NaCl no tampão A (= tampão B; gradiente de 0-65% B). A pureza das fracções é analisada utilizando CEX. As fracções recolhidas são re-injectadas na coluna SEC para tentar encontrar uma correlação entre os resultados obtidos com as duas técnicas. O cromatograma indica que o primeiro grupo de picos em CEX está correlacionado com o pré-pico na análise de SEC do anticorpo, que o segundo grupo de picos em CEX conduz em conjunto ao primeiro pico na análise de SEC da mistura de proteína (ou Fracção 1), e que o último pico nos eluatos de CEX como o último pico em SEC (ou Fracção 2).

Em conclusão, os resultados descritos acima (perfil de oligossacárido para as Fracções SEC 1 e 2, o padrão de CEX obtidos após descarboxilação, o padrão de SEC obtido para as fracções recolhidas em CEX, espectrometria de massa) sugere fortemente a presença da espécie de anticorpo com oligossacáridos complexos provocando a) heterogeneidade de massa, conduzindo a um pico duplo em SEC e b) a cadeia pesada dupla observada na heterogeneidade de carga de SDS-PAGE reduzida, conduzindo ao padrão CEX.

Caracterização analítica de fracções CEX

Uma vez que a espécie de anticorpo maior elui mais cedo em CEX, demonstrando que eles são menos carregado positivamente, a presença de ácido siálico (um componente de glicosilação complexa e carregado negativamente) é

medido nas diferentes fracções obtidas por CEX preparativo. O ácido siálico está presente em todas as 4 amostras em graus variáveis. O ácido siálico é mais provavelmente a forma de ácido N-glicolil-neuramínico (baseada no tempo de retenção mais curto em comparação com o padrão do ácido N-acetilneuramínico). A presença muito baixa de ácido siálico numa fracção CEX em contraste com a sua abundância muito elevada noutra fracção CEX sugere fortemente que o componente de açúcar carregado negativamente contribui para a heterogeneidade massa/carga. As fracções de CEX são analisadas por espectrometria de massa ESI-Q-TOF.

SDS-PAGE

As mesmas fracções são também analisadas por SDS-PAGE em condições de redução. Pode ser concluído que a banda da cadeia pesada superior corresponde à porção de anticorpo com um perfil de oligossacáridos complexo contendo ácido siálico. A banda da cadeia pesada inferior corresponde ao anticorpo esperado apresentando um perfil de oligossacáridos convencional.

Separação em coluna Mono-S de fracções CEX digeridas com papaína

De modo a confirmar a utilização do sítio de glicosilação potencial no domínio variável da cadeia pesada, cerca de 1 mg de cada fracção CEX é tratada com papaína para separar a parte Fab e a parte Fc do anticorpo.

A cromatografia preparativa é realizada numa coluna Mono-S. Cada uma das sub-fracções recolhidas é re-injectada na coluna RP para identificar o seu conteúdo em termos de domínios Fab e/ou Fc. Cada uma das sub-fracções recolhidas é então analisada com espectrometria de massa ESIQ-TOF. Os resultados obtidos demonstram que a) o sítio de glicosilação conservado na parte Fc da cadeia pesada é ocupado por formas de oligossacárido bi-antenário com nenhuma (G0), uma (G1) ou duas unidades de galactose terminal (G2); b) que por contraste, o sítio de glicosilação irregular (N73) comporta oligossacáridos complexos contendo ácido N-glicolil neuramínico.

Em conclusão, o resíduo de asparagina N73 no domínio variável da cadeia pesada é encontrado para ser parcialmente N-glicosilado. Estas espécies de açúcar provocam heterogeneidade da massa, assim como heterogeneidade da carga que são detectados por SDS-PAGE, cromatografia de exclusão por tamanho e cromatografia por permuta catiónica.

Caracterização de VHE-N73D/humV1

De modo a eliminar a heterogenicidade dos anticorpos humanizados VHE/humV1, VHE/humV2, VHQ/humV1 e VHQ/humV2, o resíduo de asparagina na posição N73 no domínio variável da cadeia pesada é substituído por um resíduo de ácido aspártico (ver exemplo 4). O VHE-N73D/humV1 é então mais analisado:

Análise por Cromatografia de Permuta de tamanho (SEC)

SEC é realizado como descrito acima. É observada uma diferença clara entre VHE/humV1 e VHE-N73D /humV1 em SEC. Em contraste com o pico duplo obtido para VHE/humV1, é obtido apenas um pico para VHE-N73D /humV1 (Figura 12). Aproximadamente 0,2% dos agregados são quantificados por SEC.

SDS-PAGE em condições de redução

VHE/humV2 e VHE-N73D/humV1 são ainda analisados por SDS-PAGE em condições de redução como delineado acima. É visível apenas uma banda para VHE-N73D/humV1 na posição esperada da cadeia pesada (HC) (cerca de 50 kDa). A banda HC observada para VHE-N73D/humV1 corresponde à banda inferior do duplete observado para VHE/humV2. A posição da banda da cadeia leve é a mesma para as proteínas analisadas.

Cromatografia de Permuta Catiônica (CEX)

A Cromatografia de Permuta Catiônica (CEX) é realizada como delineado acima. Os resultados obtidos para análise de CEX demonstram que a heterogeneidade da carga de VHE-N73D/humV1 é reduzida nas variantes de Lisina C-terminal (três picos) em comparação com a heterogeneidade de carga elevada de VHE/humV2 (>10; Figura 13)

Análise de MALDI TOF (espectrometria de massa)

A massa detectada para a cadeia pesada e a cadeia leve obtida por análise de MALDI TOF (espectrometria de massa) estão em estreita concordância com a massa esperada, deduzida a partir da sequência de aminoácidos de VHE-N73D/humV1.

Cromatografia de Fase Reversa (RP)

Após redução com DDT os dois anticorpos humanizados VHE/humV2 e VHE-N73D/humV1 são analisados por Cromatografia de Fase Reversa (RP). Devido à glicosilação parcial na asparagina N73, são observadas duas "cadeias pesadas" para VHE/humV2 (pico duplo a cerca de 18,5 min) entre o pico correspondente à cadeia leve (a cerca de 17,3 min). Para VHE-N73D/humV1, apenas um pico é observado para a cadeia pesada (Figura 14).

Exemplo 6: Análise de competição de FACS (afinidade de ligação)

A linha de células T humanas PEER é seleccionada como a célula alvo para análise de FACS porque é expresso o antigénio CD45 na sua superfície celular. Para analisar a afinidade de ligação dos sobrenadantes de anticorpo humanizado, as experiências de competição utilizando anticorpo quimérico marcado com FITC como uma referência

são realizados e comparados com a inibição de anticorpo de ratinho purificado e de anticorpo quimérico. As culturas de células PEER são centrifugadas durante 10 segundos a 3000 rpm e o meio é removido. As células são ressuspensas em tampão FACS (PBS contendo 1% de FBS e 0,1% de azida de sódio) e semeadas em placa de microtitulação de fundo redondo de 96 poços a uma densidade celular de 1×10^5 células por poço. A placa é centrifugada e o sobrenadante é eliminado. Para estudos de bloqueamento, é primeiro adicionado a cada poço 25 μ L de meio não transfectado concentrado ou anticorpo de controlo semelhante ao isotipo (controlos negativos), anticorpo de ratinho não marcado ou anticorpo quimérico (controlos positivos) assim como sobrenadantes concentrados contendo as várias combinações de anticorpo humanizado (amostras), nas concentrações indicadas no texto. Após 1 hora de incubação a 4 °C, as células PEER são lavadas com 200 μ L de tampão FACS por centrifugação. As células são subsequentemente incubadas durante 1 hora a 4 °C com anticorpo quimérico conjugado com FITC em 25 μ L de tampão FACS à concentração final de 20 μ g/mL. As células são lavadas e ressuspensas em 300 μ L de tampão FACS contendo 2 μ g/mL de iodeto de propídio que permite a separação das células viáveis. As preparações celulares são analisadas num citómetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson).

A análise de FACS indica um bloqueamento dependente da dose de anticorpo quimérico marcado com fluorocromo pelos sobrenadantes de culturas de anticorpo

humanizado concentrado. Não se observa bloqueamento dependente da dose da ligação do anticorpo quimérico com o anticorpo de controlo que emparelha com o isotipo, indicando que o efeito de bloqueamento pelas diferentes combinações de anticorpo humanizado é específico para o epitopo e que a especificidade do epitopo parece ser retida após o processo de humanização.

O sobrenadante não diluído dos transfectantes de SP2/0 acima mencionados ou anticorpo quimérico (controles positivos) ou anticorpo de controlo que emparelha com o isotipo (controles negativos) a 2 µg/mL em meio de cultura são incubados com $1,5 \times 10^5$ células PEER em 100 µL durante 30 min a 4 °C. depois, 100 µL de PBS contendo anticorpo quimérico marcado com FITC é adicionado a cada amostra e incubação a 4 °C continua durante mais 30 minutos. Após lavagem, as células são ressuspensas em FACS-PBS contendo 1 µg/mL de 7-amino-actinomicina D e analisadas através de citometria de fluxo utilizando um instrumento Becton Dickinson FACSCalibur e o software CellQuest Pro. A selecção foi realizada em células vivas, *i.e.*, 7-Amino-Actinomicina D - eventos negativos.

A análise de FACS demonstra que as moléculas de ligação a CD45RB/RO humanizado não marcado, *e.g.*, VHE/humV1 e VHQ/humV1 mas não o anticorpo de controlo que emparelha com o isotipo compete com o anticorpo quimérico marcado com FITC para ligação à linha celular de células T positivas para CD45 humano, PEER.

Especificidade de VHE-N 73D/h umV1

Para avaliar se a modificação da molécula de ligação a CD45R0/RB humanizada VHE/humV1, *i.e.*, a permuta da asparagina com aspartato na posição de aminoácidos 73 da cadeia pesada da molécula de ligação a CD45R0/RB, modificou a reactividade com o epitopo cognato, a reactividade de VHE-N73D/humV1 com uma linha celular de células T humanas que expressam CD45, PEER é analisada numa experiência de ligação de competição.

As células PEER são incubadas com VHE-N73D/humV1, com o seu predecessor quimérico ou com um anticorpo IgG1 de controlo de isotipo de não ligação. O anticorpo não ligado é removido por lavagem e as células são sujeitas a uma incubação com mAb anti-CD45R0/RB quimérico marcado com fluorocromo de isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou anticorpo de controlo isotipo IgG1 marcado com FITC. Após lavagem, as células são sujeitas a análise de citometria de fluxo para quantificar a quantidade de anticorpo marcado com FITC ligado à célula PEER pré-incubada: as culturas de células PEER são centrifugadas durante 10 min a 400 vezes a força da gravidade padrão (g) e o meio é removido. As células são ressuspensas em tampão FACS (PBS contendo 1% v/v de FBS, 0,1 p/v de EDTA e 0,1% p/v de azida de sódio) e semeadas em placas de microtitulação de 96 poços de fundo em V a uma densidade celular de 1×10^5 células por poço. A placa é centrifugada e o sobrenadante é eliminado. Cada

amostra de células é incubada durante 30 minutos a 4 °C em 50 µL de tampão FACS contendo 20 µg/mL de mAb anti-CD45R0/RB quimérico, VHE-N73D/humV1 ou Ab IgG1 de controlo. Seguidamente, as células PEER são lavadas duas vezes com 150 µL de tampão FACS por centrifugação. As células são subsequentemente incubadas durante 30 minutos a 4 °C em 50 µL de tampão FACS contendo 20 µg/mL de mAb quimérico conjugado com FITC ou Ab de controlo 3G5 conjugado com FITC. Finalmente, as células são lavadas e ressuspensas em 200 µL de tampão FACS contendo 7-amino actinomicina D (7-AAD) a 1 µg/mL, que permite a identificação de células viáveis durante a análise. As preparações das células são analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson).

Observa-se que o VHE-N73D/humV1 não marcado e o mAb anti-CD45R0/RB quimérico não marcado, mas não o anticorpo IgG1 de controlo previnem o mAb anti-CD45R0/RB quimérico marcado com de se ligar a células PEER que expressam CD45, como determinado por um sinal de fluorescência diminuído. Em conclusão, descobriu-se que a modificação do anticorpo VHE/humV1 em VHE-N73D/humV1 não altera a especificidade de epitopo da molécula de ligação a anti-CD45R0/RB humanizada.

Afinidade de VHE-N73D/humV1 para CD45 humano ou cinomólogo

Para determinar a afinidade do anticorpo VHE-

N73D/humV1 para o seu epitopo, a reactividade de VHE-N73D/humV1 com uma linha de células T que expressam CD45 humano PEER ou a linha de células T que expressam CD45 de macaco cinomólogo HSC-F pode ser quantificada numa experiência de ligação de competição, semelhante ao processo descrito em Daley *et al.*, 1995; *J. Mol. Biol.* 253:243.

Em resumo, a intensidade da coloração de células PEER ou HSC-F com anticorpo marcado com FITC na presença de várias concentrações de anticorpo de competição não marcado é utilizado para calcular as afinidades dos anticorpos não marcados. Mais precisamente, num primeiro passo, a concentração e estequiometria da marcação do fluorocromo do anticorpo CD45RB/RO anti-humano derivado de ratinho marcado com FITC A6 (mA6), é medida. De seguida, a concentração da molécula alvo, CD45, na superfície da linha celular PEER ou HSC-F é determinada com o auxílio do anticorpo mA6 yes conjugado com FITC acima mencionado yes (anti-huCD45 derivado de ratinho) e utilizando esferas de fluorescência com grau de marcação molecular conhecida. Com a concentração de receptores CD45 celulares e o seu ligando conjugado a FITC conhecido, a afinidade de mA6 conjugado a FITC para receptores CD45 celulares é determinada por um processo de titulação no equilíbrio baseado em FACS. Finalmente, a afinidade do anticorpo não marcado VHE-N73D/humV1 é determinada a partir das reacções de coloração de competição com mA6 conjugado com FITC em células PEER ou HSC-F medindo o aumento em fluorescência de FITC como uma

função da concentração total de VHE-N73D/humV1. Se a equação cúbica que representa a descrição algebricamente explícita de equilíbrio de ligação numa mistura de dois ligandos de competição que se ligam a um receptor é implementada no programa Origin 7.5, o programa informático é utilizado para calcular o valor da constante de dissociação (K_d) para VHE-N73D/humV1 em análise de ajuste de curva reiterativos.

Numa experiência, a constante de dissociação de VHE-N73D/humV1 para o alvo celular de PEER humanas é calculado como $2,44 \pm 0,07$ nM - para o alvo celular cinomólogo HSC-F é calculado como $1,67 \pm 0,00$ nM, assumindo a ligação do anticorpo divalente às moléculas CD45RO/RB alvo.

Exemplo 7: Actividades biológicas de moléculas de ligação a CD45RB/RO

Neste estudo, foi avaliado se o anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO, quando presente em culturas de células T de humano primárias activadas policlonalmente (i) suporta a diferenciação de células T com um fenótipo Treg característico, (ii) previne ou aumenta a apoptose após a activação de células T, e (iii) afecta a expressão de subconjuntos de antigénios específicos e receptores após reestimulação.

**Anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO
aumenta a morte celular em células T activadas poli-
clonalmente**

As células T primárias (mistura de subconjuntos T CD4⁺ e CD8⁺) foram sujeitos a activação por mAb anti-CD3 mais anti-CD28 (200 ng/mL cada) na presença ou ausência (=controlo) de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO. Os anticorpos em excesso foram removidos através de lavagem no dia 2. Foi utilizado 7-amino-actinomicina D (7-AAD) como um corante de coloração de DNA incorporado por células apoptóticas e necróticas para medir a morte celular após activação. Os resultados demonstram que a activação de células T na presença de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO aumentaram a fracção de células 7-AAD positivas mais de duas vezes no dia 2 após activação. No dia 7, a porção de células positivas para 7-AAD foi novamente semelhante em culturas tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO e de controlo.

**Células T tratadas com anticorpo quimérico de
ligação a CD45RB/RO, mas não com mAb de controlo,
apresentam um fenótipo de células T reguladoras (Treg)**

A expressão aumentada de CD25 e a proteína de regulação negativa CTLA-4 (CD152) é um marcador de células Treg. A supressão funcional de respostas de células T primárias e secundárias pelo anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO pode ser devida à indução de células Treg. Para

abordar esta questão, as células T foram activadas por mAbs anti-CD3 + CD28 e cultivadas na presença de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO ou mAb anti-LPS de controlo. O decurso de tempo da expressão de CTLA-4 e CD25 revela diferenças marcadas entre células T de controlo e tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO nos dias 1 e 3 após estimulação secundária, indicando um fenótipo Treg.

A expressão de CTLA-4 intracelular é sustentada na presença de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO

Foi relatado que quantidades substanciais de CTLA-4 podem também ser encontradas intracelularmente. Por isso, em paralelo com a coloração de CTLA-4 de superfície, a expressão de CTLA-4 intracelular foi analisada. Foram observadas diferenças moderadas entre culturas de células T no dia 4 após estimulação. Após cultura prolongada, todavia, foram sustentados níveis elevados de CTLA-4 intracelular apenas em células T tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO mas não em células T de controlo.

Células T tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO tornam-se duplos positivos para CD4 e CD8

Após estimulação, as células T induzem e regulam positivamente a expressão de vários receptores de

superfície, tais como CD25, CD152 (CTLA-4), CD154 (CD40-Ligando) e outros. Em contraste, pensa-se o nível de expressão de CD4 ou CD8 se mantenha relativamente constante. Observou-se reprodutivamente um forte aumento de ambos os antígenos CD4 e CD8 em células T tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO, mas não em células T tratadas com Ab de controlo, após activação. A emergência de uma população de células T duplas positivas para CD4/CD8 parece ser devida à regulação positiva de CD4 no subconjunto CD8⁺ e reciprocamente, CD8 no subconjunto CD4⁺. Isto contrasta com uma percentagem moderadamente baixa de células T duplas positivas em culturas de controlo.

Expressão elevada da cadeia alfa do receptor IL-2, mas expressão da cadeia beta muito baixa por células T tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO

As células Treg são conhecidas por serem constitutivamente positivas para CD25, a cadeia alfa do receptor IL-2. A regulação de outras subunidades do receptor trimérico IL-2 em células Treg não é conhecida. Recentemente os autores compararam a expressão da cadeia beta do receptor IL-2, e.g., CD122, em células T activadas e propagadas na presença ou ausência de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO. Os resultados demonstram que as células T tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO possuem uma expressão cerca de dez vezes mais baixa de CD122 em comparação com células T em culturas de

controle. Esta diferença pode indicar que as células Treg necessitam de outros factores para além de IL-2 para proliferarem.

Exemplo 8: Sequências da invenção (as sequências de CDR da invenção estão sublinhadas)

SEQ ID Nº:1

Parte da sequência de aminoácidos da cadeia leve quimérica

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASONIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPPFIFGSGTKLEIK

SEQ ID Nº:2 Parte da sequência de aminoácidos da cadeia pesada quimérica

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHVVVKQEPGQGLEWIGYFNPNYHGTKY
NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDIWGQGTITVTVSS

SEQ ID Nº:3 Sequência de aminoácidos da cadeia leve quimérica

DILLTQSPAILSVSPGERVSFSCRASONIGTSIQWYQQRTNGSPRLLIRSSSESISGIPSRFSG
SGSGTDFTLSINSVESEDIADYYCQQSNTWPPFIFGSGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYE
KHIVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID Nº:4 Sequência de aminoácidos cadeia pesada quimérica

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQEPGQGLEWIGYFNPYNHGTKY
 NEKFKGRATLTADKSSNTAYMDLSSLTSEDSAIYYCARSGPYAWFDTWGOQTIVTVSSAS
 TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
 SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
 FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV
 SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS
 LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS
 CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID N°:5 Sequência de nucleótidos que codifica
 um polipeptido de SEQ ID N°:1

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGAGTCCAGGAGAAAGAGTCA
 GTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAGA
 ACAAATGGTTCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCCT
 TCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTAGCATCAACAGTGTGGA
 GTCTGAAGATATTGCAGATTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTCACGTTCCG
 CTCGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

SEQ ID N°:6 Sequência de nucleótidos que codifica
 um polipeptido de SEQ ID N°:2

GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 ATGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACCTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCTCCAACACA
 GCCTACATGGACCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGATCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

SEQ ID N°:7 Parte da sequência de aminoácidos da
 cadeia leve humanizada designada humV2 (humV2 = VLm)

DILLTQSPAT LSLSPGERAT FSCRASONIG TSIQWYQQKT NGAPRLLIRS SSESISGIPS
 RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTEGQ GTKLEIK

SEQ ID Nº:8 Parte da sequência de aminoácidos da cadeia leve humanizada designada humV1 (humV1 = VLh)

DILLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASONIG TSIQWYQOKP GQAPRLLIRS SSESISGIPS
RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ SNTWPFTFGQ GTKLEIK

SEQ ID Nº:9 Parte da sequência de aminoácidos da cadeia pesada humanizada designada VHE

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGTY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID Nº:10 Parte da sequência de aminoácidos da cadeia pesada humanizada designada VHQ

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPYNHGTY NEKFKGRATL TANKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDTWGQ GTTVTVSS

SEQ ID Nº:11 Sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos SEQ ID Nº:9

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACATAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

SEQ ID Nº:12 Sequência de nucleótidos codificando
a sequência de aminoácidos SEQ ID Nº:10

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAAACAAATCCATCAGCACA
GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
CTCA

SEQ ID Nº:13 Sequência de nucleótidos que
codifica a sequência de aminoácidos SEQ ID Nº:7

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTTTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA
ACAAATGGTGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACCGTTC
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEQ ID Nº:14 Sequência de nucleótidos que
codifica a sequência de aminoácidos SEQ ID Nº:8

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
CTCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAAA
CCAGGTCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC

TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACCGTTC
GGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA

SEQ ID N°:15 Sequência de nucleótidos do vector de expressão HCMV-G1 HuA6-VHQ (Sequência de DNA completa de um vector de expressão da cadeia pesada humanizada compreendendo a SEQ ID N°:12 (VHQ) de 3921-4274)

```

1  AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51  GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CCGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAAAA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGCG
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CCGGACTATG GTTCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGAATAATTG
251 AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCGGTGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAATCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCTGCTC ACTGACTCGC TCGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CCGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGGCG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA
801 TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGGAA CCGGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACATCG
1101 TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CCGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG

```

```

1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAACTCACGT TAAGGGATT
1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTAA
1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA
1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
1651 CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCACTCTATT
1801 AATTGTTGCC GGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
1851 CAACCTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTGTGTTG
1901 GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCTAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
2001 TGTGAGAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG
2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTCGGGGCG AAAACTCTCA
2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCC ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
2351 AAACAGGAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGCG GACACGGAAA
2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
2501 AACAAATAGG GGTTCCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551 TAAGAAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCGTATCAC
2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
2651 TGTGTGTTG TCCGAAATAC GCGTTTTGAG ATTTCTGTCT CCGACTAAAT
2701 TCATGTCGCG CGATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTCT CCGATGTGAG
2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
2851 CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCT
2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
3051 CCATTAGCCA TATTATTCAT TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT

```

3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC
3401 CCACTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCTTATTG
3451 ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCCGCCGTGG ATTATGCCCA GTACATGACC
3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
3601 TTGACTCACG GGGATTTCCT AGTCTCCACC CCATTGACCT CAATGGGAGT
3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAATC
3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA
3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
3901 TGGCCCCCGG CGCCACAGC CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
3951 GTGAAAAGC CTGGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GGCCACACTA ACTGCAACA AATCCATCAG
4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCCTATGCCT GGTTTGACAC CTGGGGCCAA
4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
4301 AGCTTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGGGG CAGGGAGGGG
4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGGGGCC
4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCACA CCGCGGTAC ATGGCACCAC
4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT
4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAACTCAG GCGCCCTGAC
4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTA GGAATCTACT
4701 CCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCCGCC
4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTTCCTCA GGCTCTGGGC
5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG

5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT COGGGAGGAC CCTGCCCCCTG
 5101 ACCTAAGCCC ACCCCAAAGG CCAAACCTCTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
 5151 CTTCCTCTCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
 5201 CAAATCTTGT GACAAAACCT ACACATGCCC ACCGTGCCCC GGTAAGCCAG
 5251 CCCAGGCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
 5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
 5351 CTTCCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
 5401 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTACATG
 5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
 5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
 5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCTCACC GCTCTGCACCA
 5601 GGACTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
 5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
 5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCCTCTGCCC
 5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGSGCA GCCCCGAGAA
 5801 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
 5851 GGTGAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
 5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
 5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
 6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCGTGATGC
 6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 6101 GGTAAATGAG TGCGACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
 6151 TCGCACCAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCGGGGCGCC
 6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCCT GCGAGACTGT
 6251 GATGGTTCTT TCCACGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
 6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCCGGGGA TCGATCCAGA
 6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACCT AGAATGCAGT
 6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
 6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCATTT
 6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTPTAA AGCAAGTAAA
 6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
 6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
 6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GAACTCTAT GCCTGTGTGG
 6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
 6751 AGGTTACAGA ATATTTTTCC ATAATTTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
 6801 TCCTTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
 6851 AGCATGACTC AAAAAACTTA GCAATTCGTA AGGAAAGTCC TTGGGGTCTT

6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTT GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCTCT
7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT
7101 AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151 CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTCACAAAG ATCCGGGACC
7201 AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCCGGGG CATGGATGCG
7251 CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
7301 AGAACTCCGC GAGSTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351 AGGGGATCGA GCGCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401 CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451 TTTCATAGAA GCGGCGGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGGTTGGGC
7501 GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCGA GTCCCGCTCA GAAGAACTCG
7551 TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601 GTAAAGCAG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651 TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701 CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751 CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCCTCGGGCA
7801 TGCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851 TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901 TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
7951 GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001 TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCGG GCACTTCGCC
8051 CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101 CGCAAGGAAC GCCCGTCGTG GCCAGCCAGC ATAGCCGCGC TGCTTCGTTC
8151 TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCAG
8201 GCGCCCCTGC GCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251 TCTGTGTGTC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301 GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351 TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGGC CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401 AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451 GCCCCAGCTG GCAATCCGGT TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
8501 TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551 TTGCGTTTTT CCTGTGCCAG ATAGCCCACT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601 CAGCACCGTT TCTGCGSACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
8651 GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

SEQ ID Nº:16 Sequência de nucleótidos do vector de expressão HCMV-G1 HuA6-VHE (Sequência Completa de DNA de um vector de expressão da cadeia pesada humanizada compreendendo SEQ ID Nº: 11 (VHE) de 3921-4274)

```

1  AGCTTTTTCG AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG
51  GAATAGCTCA GAGGCCGAGG CGGCCTCGGC CTCTGCATAA ATAAAAAATA
101 TTAGTCAGCC ATGGGGCGGA GAATGGGCGG AACTGGGCGG AGTTAGGGGC
151 GGGATGGGCG GAGTTAGGGG CGGGACTATG GTTGCTGACT AATTGAGATG
201 CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA GCCTGGTTGC TGACTAATTG
251 AGATGCATGC TTTCGATACT TCTGCCTGCT GGGGAGCCTG GGGACTTTCC
301 ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGCTG CCTCGCGCGT TTCEGTFGATG
351 ACGGTGAAAA CCTCTGACAC ATGCAGCTCC CGGAGACGGT CACAGCTTGT
401 CTGTAAGCGG ATGCCGGGAG CAGACAAGCC CGTCAGGGCG CGTCAGCGGG
451 TGTTGGCGGG TGTCGGGGCG CAGCCATGAC CCAATCACGT AGCGATAGCG
501 GAGTGTATAC TGGCTTAACT ATGCGGCATC AGAGCAGATT GTACTGAGAG
551 TGCACCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA GATGCGTAAG GAGAAAATAC
601 CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC ACTGACTCGC TGCGCTCGGT
651 CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA CTCAAAGCGG GTAATACGGT
701 TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA AGAACATGTG AGCAAAAGGC
751 CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC GCGTTGCTGG CGTTTTCCTA
801 TAGGCTCCGC CCCCTGACG AGCATCACA AAATCGACGC TCAAGTCAGA
851 GGTGGCGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAT ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA
901 AGCTCCCTCG TGCGCTCTCC TGTTCCGACC CTGCCGCTTA CCGGATACCT
951 GTCCGCCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC GCTTTCTCAT AGCTCACGCT
1001 GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCGTTT GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG
1051 CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC GCCTTATCCG GTAACCTATG
1101 TCTTGAGTCC AACC CGGTAA GACACGACTT ATCGCCACTG GCAGCAGCCA
1151 CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATG TAGGCGGTGC TACAGAGTTC
1201 TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT AGAAGGACAG TATTTGGTAT
1251 CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT
1301 GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG GTGGTTTTTT TGTTTGCAAG
1351 CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT
1401 TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACGA AAATCACGT TAAGGGATTT
1451 TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTAAATTA
1501 AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA

```

```

1551 CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT
1601 TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA
1651 CCGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCACTGCT GCAATGATAC CGCGAGACCC
1701 ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG
1751 CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT
1801 AATTGTTGCC GGGGAAGCTAG AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTGCG
1851 CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG
1901 GTATGGCTTC ATTCTAGCTCC GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA
1951 TCCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT
2001 TGTGAGAAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC
2051 TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT
2101 GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GCGACCGAG
2151 TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA
2201 CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT CTTGGGGGCG AAAACTCTCA
2251 AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTCG ATGTAACCCA CTCGTGCACC
2301 CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTTAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA
2351 AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA
2401 TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA
2451 GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA
2501 AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC
2551 TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACC TATAAAAATA GGCCTATCAC
2601 GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTT GGCTGCAGTG AATAATAAAA
2651 TGTGTGTTTG TCCGAAATAC GCGTTTGTAG ATTTCTGTG CCGACTAAAT
2701 TCATGTGCGG CSATAGTGGT GTTTATCGCC GATAGAGATG GCGATATTGG
2751 AAAAATCGAT ATTTGAAAAT ATGGCATATT GAAAATGTG CCGATGTGAG
2801 TTTCTGTGTA ACTGATATCG CCATTTTTCC AAAAGTGATT TTTGGGCATA
2851 CGCGATATCT GGCGATAGCG CTTATATCGT TTACGGGGGA TGGCGATAGA
2901 CGACTTTGGT GACTTGGGCG ATTCTGTGTG TCGCAAATAT CGCAGTTTCG
2951 ATATAGGTGA CAGACGATAT GAGGCTATAT CGCCGATAGA GGCGACATCA
3001 AGCTGGCACA TGGCCAATGC ATATCGATCT ATACATTGAA TCAATATTGG
3051 CCATTAGCCA TATTATTATC TGGTTATATA GCATAAATCA ATATTGGCTA
3101 TTGGCCATTG CATACGTTGT ATCCATATCA TAATATGTAC ATTTATATTG
3151 GCTCATGTCC AACATTACCG CCATGTTGAC ATTGATTATT GACTAGTTAT
3201 TAATAGTAAT CAATTACGGG GTCATTAGTT CATAGCCCAT ATATGGAGTT
3251 CCGCGTTACA TAACTTACGG TAAATGGCCC GCCTGGCTGA CCGCCCAACG
3301 ACCCCCGCCC ATTGACGTCA ATAATGACGT ATGTTCCCAT AGTAACGCCA
3351 ATAGGGACTT TCCATTGACG TCAATGGGTG GAGTATTTAC GGTAAACTGC

```


3401 CCACCTTGGCA GTACATCAAG TGTATCATAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG
3451 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC
3501 TTATGGGACT TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT
3551 TACCATGGTG ATGCGGTTTT GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT
3601 TTGACTCAGG GGGATTTCCT AGTCTCCACC CCATTGACGT CAATGGGAGT
3651 TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC GTAACAACTC
3701 CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGCTGG GAGGTCTATA
3751 TAAGCAGAGC TCGTTTAGTG AACCGTCAGA TCGCCTGGAG ACGCCATCCA
3801 CGCTGTTTTG ACCTCCATAG AAGACACCGG GACCGATCCA GCCTCCGCAA
3851 GCTTGCCGCC ACCATGGACT GGACCTGGAG GGTGTTCTGC CTGCTGGCCG
3901 TGGCCCCCGG CGCCACAGC GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC AGGAGCCGAA
3951 GTGAAAAAGC CTGGGCTTC AGTGAAGGTG TCCTGCAAGG CCTCTGGATA
4001 CACATTCACT AATTATATTA TCCACTGGGT GAAGCAGGAG CCTGGTCAGG
4051 GCCTTGAATG GATTGGATAT TTTAATCCTT ACAATCATGG TACTAAGTAC
4101 AATGAGAAGT TCAAAGGCAG GCCCACACTA ACTGCAAACA AATCCATCAG
4151 CACAGCCTAC ATGGAGCTCA GCAGCCTGCG CTCTGAGGAC ACTGCGGTCT
4201 ACTACTGTGC AAGATCAGGA CCTATGCCT GGTTTGACAC CTGGGGCCAA
4251 GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCAGGTGAG TTCTAGAAGG ATCCCAAGCT
4301 AGCTTTCTGG GGCAGGCCAG GCCTGACCTT GGCTTTGSSG CAGGGAGGGG
4351 GCTAAGGTGA GGCAGGTGGC GCCAGCCAGG TGCACACCCA ATGCCCATGA
4401 GCCCAGACAC TGGACGCTGA ACCTCGCGGA CAGTTAAGAA CCCAGSGGCC
4451 TCTGCGCCCT GGGCCCAGCT CTGTCCCACA CCGCGGTCAC ATGGCACCAC
4501 CTCTCTTGCA GCCTCCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT
4551 CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG
4601 GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTGG TGGAACTCAG GGGCCCTGAC
4651 CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTTCA GGACTCTACT
4701 CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC
4751 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA
4801 AGTTGGTGAG AGGCCAGCAC AGGGAGGGAG GGTGTCTGCT GGAAGCCAGG
4851 CTCAGCGCTC CTGCCTGGAC GCATCCCGGC TATGCAGCCC CAGTCCAGGG
4901 CAGCAAGGCA GGCCCCGTCT GCCTCTTCAC CCGGAGGCCT CTGCCCCCCC
4951 CACTCATGCT CAGGGAGAGG GTCTTCTGGC TTTTCCCCA GGCTCTGGGC
5001 AGGCACAGGC TAGGTGCCCC TAACCCAGGC CCTGCACACA AAGGGGCAGG
5051 TGCTGGGCTC AGACCTGCCA AGAGCCATAT CCGGGAGGAC CCTGCCCCTG
5101 ACCTAAGCCC ACCCAAAGG CCAAACCTTC CACTCCCTCA GCTCGGACAC
5151 CTTCTCTCCT CCCAGATTCC AGTAACTCCC AATCTTCTCT CTGCAGAGCC
5201 CAAATCTTGT GACAAAACTC ACACATGCCC ACOGTGCCCA GGTAAGCCAG

```

5251 CCCAGGCCCTC GCCCTCCAGC TCAAGGCGGG ACAGGTGCCC TAGAGTAGCC
5301 TGCATCCAGG GACAGGCCCC AGCCGGGTGC TGACACGTCC ACCTCCATCT
5351 CTTCTCAGC ACCTGAACTC CTGGGGGGAC CGTCAGTCTT CCTCTTCCCC
5401 CCAAAACCCA AGGACACCCT CATGATCTCC CGGACCCCTG AGGTCACATG
5451 CGTGGTGGTG GACGTGAGCC ACGAAGACCC TGAGGTCAAG TTCAACTGGT
5501 ACGTGGACGG CGTGGAGGTG CATAATGCCA AGACAAAGCC GCGGGAGGAG
5551 CAGTACAACA GCACGTACCG TGTGGTCAGC GTCCTCACCG TCCTGCACCA
5601 GGA CTGGCTG AATGGCAAGG AGTACAAGTG CAAGGTCTCC AACAAAGCCC
5651 TCCCAGCCCC CATCGAGAAA ACCATCTCCA AAGCCAAAGG TGGGACCCGT
5701 GGGGTGCGAG GGCCACATGG ACAGAGGCCG GCTCGGCCCA CCTCTGCCC
5751 TGAGAGTGAC CGCTGTACCA ACCTCTGTCC CTACAGGGCA GCCCCGAGAA
5801 CCACAGGTGT ACACCTGCC CCCATCCCCG GATGAGCTGA CCAAGAACCA
5851 GGTCAGCCTG ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
5901 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT
5951 CCCGTGCTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC CTCTACAGCA AGCTCACCGT
6001 GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC TCCGTGATGC
6051 ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
6101 GGTAAATGAG TGGACGGCC GGCAAGCCCC CGCTCCCCGG GCTCTCGCGG
6151 TCGCAGGAGG ATGCTTGGCA CGTACCCCTT GTACATACTT CCCGGGCGCC
6201 CAGCATGGAA ATAAAGCACC CAGCGCTGCC CTGGGCCCTT GCGAGACTGT
6251 GATGGTTCTT TOCAGGGTC AGGCCGAGTC TGAGGCCTGA GTGGCATGAG
6301 ATCTGATATC ATCGATGAAT TCGAGCTCGG TACCGGGGA TCGATCCAGA
6351 CATGATAAGA TACATTGATG AGTTTGGACA AACCACAACT AGAATGCAGT
6401 GAAAAAATG CTTTATTTGT GAAATTTGTG ATGCTATTGC TTTATTTGTA
6451 ACCATTATAA GCTGCAATAA ACAAGTTAAC AACACAATT GCATTCAATT
6501 TATGTTTCAG GTTCAGGGGG AGGTGTGGGA GGTTTTTTAA AGCAAGTAAA
6551 ACCTCTACAA ATGTGGTATG GCTGATTATG ATCTCTAGTC AAGGCACTAT
6601 ACATCAAATA TTCCTTATTA ACCCCTTTAC AAATTAAAAA GCTAAAGGTA
6651 CACAATTTTT GAGCATAGTT ATTAATAGCA GACACTCTAT GCCTGTGTGG
6701 AGTAAGAAAA AACAGTATGT TATGATTATA ACTGTTATGC CTACTTATAA
6751 AGGTTACAGA ATATTTTCC ATAATTTCT TGTATAGCAG TGCAGCTTTT
6801 TCCTTTGTGG TGTAATAGC AAAGCAAGCA AGAGTTCTAT TACTAAACAC
6851 AGCATGACTC AAAAACTTA GCAATTCTGA AGGAAAGTCC TTGGGTCTT
6901 CTACCTTTCT CTTCTTTTTF GGAGGAGTAG AATGTTGAGA GTCAGCAGTA
6951 GCCTCATCAT CACTAGATGG CATTTCTTCT GAGCAAAACA GGTTTTCCTC
7001 ATTAAAGGCA TTCCACCACT GCTCCCATTC ATCAGTTCCA TAGGTTGGAA
7051 TCTAAAATAC ACAAACAATT AGAATCAGTA GTTTAACACA TTATACACTT

```

```

7101  AAAAATTTTA TATTTACCTT AGAGCTTTAA ATCTCTGTAG GTAGTTTGTC
7151  CAATTATGTC ACACCACAGA AGTAAGGTTT CTTCACAAAG ATCCGGGACC
7201  AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC AGTTCGGGGG CATGGATGCG
7251  CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC GACGGATTTG CACTGCCGGT
7301  AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC AGCAGCTGAA CCAACTCGCG
7351  AGGGGATCGA GCCCGGGGTG GGCGAAGAAC TCCAGCATGA GATCCCCGCG
7401  CTGGAGGATC ATCCAGCCGG CGTCCCGGAA AACGATTCCG AAGCCCAACC
7451  TTTCATAGAA GCGGGCGGTG GAATCGAAAT CTCGTGATGG CAGCTTGGGC
7501  GTCGCTTGGT CGGTCATTTT GAACCCCAAG GTCCCCCTCA GAAGAAGTCG
7551  TCAAGAAGGC GATAGAAGGC GATGCGCTGC GAATCGGGAG CGGCGATACC
7601  GTAAAGCACG AGGAAGCGGT CAGCCCATTC GCCGCCAAGC TCTTCAGCAA
7651  TATCACGGGT AGCCAACGCT ATGTCTTGAT AGCGGTCCGC CACACCCAGC
7701  CGGCCACAGT CGATGAATCC AGAAAAGCGG CCATTTTCCA CCATGATATT
7751  CGGCAAGCAG GCATCGCCAT GGGTCACGAC GAGATCCTCG CCGTCGGGCA
7801  TCGCGCCTT GAGCCTGGCG AACAGTTCGG CTGGCGCGAG CCCCTGATGC
7851  TCTTCGTCCA GATCATCCTG ATCGACAAGA CCGGCTTCCA TCCGAGTACG
7901  TGCTCGCTCG ATGCGATGTT TCGCTTGGTG GTCGAATGGG CAGGTAGCCG
7951  GATCAAGCGT ATGCAGCCGC CGCATTGCAT CAGCCATGAT GGATACTTTC
8001  TCGGCAGGAG CAAGGTGAGA TGACAGGAGA TCCTGCCCCG GCACTTCGCC
8051  CAATAGCAGC CAGTCCCTTC CCGCTTCAGT GACAACGTCG AGCACAGCTG
8101  CGCAAGGAAC GCCCCTCGTG GCCAGCCACG ATAGCCGCGC TGCCCTCGTCC
8151  TGCAGTTCAT TCAGGGCACC GGACAGGTCG GTCTTGACAA AAAGAACCGG
8201  GCGCCCCCTG CCTGACAGCC GGAACACGGC GGCATCAGAG CAGCCGATTG
8251  TCTGTTGTGC CCAGTCATAG CCGAATAGCC TCTCCACCCA AGCGGCCGGA
8301  GAACCTGCGT GCAATCCATC TTGTTCAATC ATGCGAAACG ATCCTCATCC
8351  TGTCTCTTGA TCAGATCTTG ATCCCCTGCG CCATCAGATC CTTGGCGGCA
8401  AGAAAGCCAT CCAGTTTACT TTGCAGGGCT TCCCAACCTT ACCAGAGGGC
8451  GCCCCAGCTG GCAATTCGGT TTCGCTTGCT GTCCATAAAA CCGCCCAGTC
8501  TAGCTATCGC CATGTAAGCC CACTGCAAGC TACCTGCTTT CTCTTTGCGC
8551  TTGCGTTTTT CCTTGTCCAG ATAGCCCAGT AGCTGACATT CATCCGGGGT
8601  CAGCACCGTT TCTGCGGACT GGCTTTCTAC GTGTTCCGCT TCCTTTAGCA
8651  GCCCTTGCGC CCTGAGTGCT TGCGGCAGCG TGAAGCT

```

SEQ ID Nº:17 Sequência de nucleótidos do vector
de expressão HCMV-K HuAb-VL1 hum V1 (Sequência Completa de

DNA de um vector de expressão de cadeia leve humanizada
compreendendo SEQ ID Nº: 14 (humV1=VLh) de 3964-4284)

```
1   CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51  TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GCGGGCCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GCGGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCCTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCGGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCGATAG
501 CGGAGTGTAAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCCGC TCGGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GCGGTTTTTC
801 CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTCCGCTCT CTTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCAGC
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG
1051 TGCACGAACC CCGGTTTCAG CCGGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT
1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
1301 TTGATCCGSC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTGTTTGCA
1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
```

```

1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
1601 ATTTGTTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA
1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
1751 GGCCGAGCSC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
1901 TGGTATGGCT TCATTGAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
1951 GATCCCCCAT GTTGTCGAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCBG TCCTCCGATC
2001 GTTGTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA
2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCCGCGACCG
2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGGCG CACATAGCAG
2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACTCT
2251 CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
2301 CCCAACTGAT CTTGAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
2351 AAAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTAT
2451 CAGGGTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
2551 TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTGAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
2701 ATTCATGTGG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGGCA
2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA
2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTCGCAAT ATCCGAGTTT
2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
3001 CAAGCTGGCA CATGCCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
3201 ATTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAATGGC CGGCTGGCT GACCGCCCAA
3301 CGACCCCGGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT

```

3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
 3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
 3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
 3551 ATTACCATGG TGATGCCGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
 3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
 3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
 3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
 3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCGGC
 3851 AAGCTTGATA TCGAATTCTT GCAGCCCGGG GGATCCGCCC GCTTGC CGCC
 3901 ACCATGGAGA CCCCCGCCCA GCTGCTGTTT CTGCTGCTGC TGTGGCTGCC
 3951 CGACACCACC GGCGACATTC TGCTGACCCA GTCTCCAGCC ACCCTGTCTC
 4001 TGAGTCCAGG AGAAAGAGCC ACTCTCTCTT GCAGGGCCAG TCAGAACATT
 4051 GGCACAAGCA TACAGTGGTA TCAACAAAAA CCAGGTCAGG CTCCAAGGCT
 4101 TCTCATAAGG TCTTCTTCTG AGTCTATCTC TGGGATCCCT TCCAGGTTTA
 4151 GTGGCAGTGG ATCAGGGACA GATTTTACTC TTACCATCAG CAGTCTGGAG
 4201 CCTGAAGATT TTGCAGTGTA TTACTGTCAA CAAAGTAATA CCTGGCCATT
 4251 CACGTTCCGC CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAACCGTGAG TATTCTAGAA
 4301 AGATCCTAGA ATTCTAAACT CTGAGGGGGT CGGATGACGT GGCCATTCTT
 4351 TGCCTAAAGC ATTGAGTTTA CTGCAAGGTC AGAAAAGCAT GCAAAGCCCT
 4401 CAGAATGGCT GCAAAGAGCT CCAACAAAAC AATTTAGAAC TTTATTAAGG
 4451 AATAGGGGGA AGCTAGGAAG AAAC TCAAAA CATCAAGATT TTAAATACGC
 4501 TTCTTGGTCT CCTTGCTATA ATTATCTGGG ATAAGCATGC TGTTTTCTGT
 4551 CTGTCCCTAA CATGCCCTGT GATTATCCGC AAACAACACA CCAAGGGCA
 4601 GAACTTTGTT ACTTAAACAC CATCCTGTTT GCTTCTTTCC TCAGGAACTG
 4651 TGGCTGCACC ATCTGTCTTC ATCTTCCCGC CATCTGATGA GCAGTTGAAA
 4701 TCTGGAAGTG CCTCTGTTGT GTGCCTGCTG AATAACTTCT ATCCCAGAGA
 4751 GGCCAAAGTA CAGTGGAAGG TGGATAACGC CCFCCAATCG GGTAACTCCC
 4801 AGGAGAGTGT CACAGAGCAG GACAGCAAGG ACAGCACCTA CAGCCTCAGC
 4851 AGCACCTTGA CGCTGAGCAA AGCAGACTAC GAGAAACACA AAGTCTACGC
 4901 CTGCGAAGTC ACCCATCAGG GCCTGAGCTC GCCCGTCACA AAGAGCTTCA
 4951 ACAGGGGAGA GTGTTAGAGG GAGAAGTGCC CCCACCTGCT CCTCAGTTCC
 5001 AGCCTGACCC CCTCCCATCC TTTGGCCTCT GACCCTTTTT CCACAGGGGA
 5051 CCTACCCCTA TTGCGGTCTT CCAGCTCATC TTTCACCTCA CCCCCCTCCT
 5101 CCTCCTTGGC TTAAATTATG CTAATGTTGG AGGAGAATGA ATAAATAAAG
 5151 TGAATCTTTG CACCTGTGGT TTCTCTCTTT CCTCATTTAA TAATFATTAT
 5201 CTGTTGTTTA CCAACTACTC AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG

5251 TCATCCTAAG GCGCATAACC ATTTATAAAA ATCATCCTTC ATTCTATTTT
5301 ACCCTATCAT CCTCTGCAAG ACAGTCCTCC CTCAAACCCA CAAGCCCTCT
5351 GTCCTCACAG TCCCCTGGGC CATGGTAGGA GAGACTTGCT TCCTTGTTTT
5401 CCCCTCCTCA GCAAGCCCTC ATAGTCCTTT TTAAGGGTGA CAGGTCTTAC
5451 AGTCATATAT CCTTTGATTG AATTCCCTGA GAATCAACCA AAGCAAATTT
5501 TTCAAAAGAA GAAACCTGCT ATAAAGAGAA TCATTCATTG CAACATGATA
5551 TAAAATAACA ACACAATAAA AGCAATTAAA TAAACAAACA ATAGGGGAAT
5601 GTTTAAGTTC ATCATGGTAC TTAGACTTAA TGGAAATGTCA TGCCCTTATT
5651 ACATTTTTTAA ACAGGFACTG AGGGACTCCT GTCTGCCAAG GGCCGTATTG
5701 AGTACTTTCC ACAACCTAAT TTAATCCACA CTATACTGTG AGATTAAAAA
5751 CATTCAATTAA AATGTTGCAA AGGTCTATA AAGCTGAGAG ACAAATATAT
5801 TCTATAACTC AGCAATCCCA CTTCTAGATG ACTGAGTGTC CCCACCCACC
5851 AAAAAACTAT GCAAGAATGT TCAAAGCAGC TTTATTTACA AAAGCCAAAA
5901 ATTGGAAATA GCCCGATTGT CCAACAATAG AATGAGTTAT TAACTGTGG
5951 TATGTTTATA CATTAGAATA CCCAATGAGG AGAATTAAACA AGCTACAAC
6001 ATACCTACTC ACACAGATGA ATCTCATAAA AATAATGTTA CATAAGAGAA
6051 ACTCAATGCA AAAGATATGT TCTGTATGTT TTCATCCATA TAAAGTTCAA
6101 AACCAGGTAA AAATAAAGTT AGAAATTTGG ATGGAAATTA CTCTTAGCTG
6151 GGGGTGGGCG AGTTAGTGCC TGGGAGAAGA CAAGAAGGGG CTTCTGGGGT
6201 CTTGGTAATG TTCTGTTCCT CGTGTGGGGT TGTGCAGTTA TGATCTGTGC
6251 ACTGTTCTGT ATACACATTA TGCTTCAAAA TAACTTCACA TAAAGAACAT
6301 CTTATACCCA GTTAATAGAT AGAAGAGGAA TAAGTAATAG GTCAAGACCA
6351 CGCAGCTGGT AAGTGGGGGG GCCTGGGATC AAATAGCTAC CTGCCTAATC
6401 CTGCCCTCTT GAGCCCTGAA TGAGTCTGCC TTCCAGGGCT CAAGGTGCTC
6451 AACAAAACAA CAGGCCTGCT ATTTTCCTGG CATCTGTGCC CTGTTTGGCT
6501 AGCTAGGAGC ACACATACAT AGAAATTAAA TGAAACAGAC CTTCAGCAAG
6551 GGGACAGAGG ACAGAATTAA CCTTGCCAG ACACTGGAAA CCCATGTATG
6601 AACACTCACA TGTTTGGGAA GGGGGAAGGG CACATGTAAA TGAGGACTCT
6651 TCCTCATTTCT ATGGGGCACT CTGGCCCTGC CCCTCTCAGC TACTCATCCA
6701 TCCAACACAC CTTTCTAAGT ACCTCTCTCT GCCTACACTC TGAAGGGGTT
6751 CAGGAGTAAC TAACACAGCA TCCCTTCCCT CAAATGACTG ACAATCCCTT
6801 TGTCTTGCTT TGTTTTTCTT TCCAGTCAGT ACTGGGAAAG TGGGGAAGGA
6851 CAGTCATGGA GAAACTACAT AAGGAAGCAC CTTGCCCTTC TGCCCTCTGA
6901 GAATGTTGAT GAGTATCAAA TCTTTCAAAC TTTGGAGGTT TGAGTAGGGG
6951 TGAGACTCAG TAATGTCCCT TCCAATGACA TGAACCTGCT CACTCATCCC
7001 TGGGGGCCAA ATTGAACAAT CAAAGGCAGG CATAATCCAG CTATGAATTC
7051 TAGGATCGAT CCAGACATGA TAAGATACAT TGATGAGTTT GGACAAACCA

```

7101  CAACTAGAAT GCAGTGAAAA AAATGCTTTA TTTGTGAAAT TTGTGATGCT
7151  AATGCTTTAT TTGTAACCAT TATAAGCTGC AATAACAAG TTAACAACAA
7201  CAATTGCATT CATTTTATGT TTCAGGTTCA GGGGGAGGTG TGGGAGGTTT
7251  TTAAAGCAA GTAAACCTC TACAAATGTG GTATGGCTGA TTATGATCTC
7301  TAGTCAAGGC ACTATACATC AAATATTCCT TATTAACCCC TTTACAAATT
7351  AAAAAGCTAA AGGTACACAA TTTTGGAGCA TAGTTATTAA TAGCAGACAC
7401  TCTATGCCTG TGTGGAGTAA GAAAAAACAG TATGTTATGA TTATAACTGT
7451  TATGCCTACT TATAAAGGTT ACAGAATATT TTTCCATAAT TTTCTTGAT
7501  AGCAGTGCAG CTTTTTCCTT TGTGGTGTAA ATAGCAAAGC AAGCAAGACT
7551  TCTATTACTA AACACAGCAT GACTCAAAAA ACTTAGCAAT TCTGAAGGAA
7601  AGTCCTTGGG GTCTTCTACC TTTCTCTCTT TTTTGGAGG AGTAGAATGT
7651  TGAGAGTCAG CAGTAGCCTC ATCATCACTA GATGGCATT TTTCTGAGCA
7701  AAACAGGTTT TCCTCATTAAGGCATTCCA CCACTGCTCC CATTCAATCAG
7751  TTCCATAGGT TGGAAATCTAA AATACACAAA CAATTAGAAT CAGTAGTTTA
7801  ACACATTATA CACTTAAAAA TTTTATATTT ACCTTAGAGC TTTAAATCTC
7851  TGTAGGTAGT TTGTCCAATT ATGTCACACC ACAGAASTAA GGTTCCTTCA
7901  CAAAGATCCG GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC
7951  GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG ATGCCGACGG
8001  ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG
8051  CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCSA AGAACTCCAG
8101  CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC CGGAAAACGA
8151  TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC GAAATCTCGT
8201  GATGGCAGGT TGGGCGTCGC TTGGTCGCTC ATTTCGAACC CCAGAGTCCC
8251  GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC
8301  GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTGCGCCG
8351  CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC CTGATAGCGG
8401  TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA AGCGGCCATT
8451  TTCCACCATG ATATTGCGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC ACGACGAGAT
8501  CCTCGCGCTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTCGGCTGGC
8551  GCGAGCCCCCT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC
8601  TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCTGA
8651  ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGAT TGCATCAGCC
8701  ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA GGAGATCCTG
8751  CCCC GGCACT TCGCCCAATA GCAGCCASTC CTTTCCCGCT TCAGTGACAA
8801  CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCC TCGTGGCCAG CCAAGATAGC
8851  CGCGCTGCGT CGTCCTGCAG TTCATTCAGG GCACCGGACA GGTGGGTCTT
8901  GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGGCGGCAT

```



```

8951 CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAST CATAGCCGAA TAGCCTCTCC
9001 ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TGCCTGCAAT CCATCTTGTT CAATCATGCG
9051 AAACGATCCT CATCCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATCCC CTGCGCCATC
9101 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTAAGTTGCA GGGCTTCCCA
9151 ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCCG TTGCTGTCCA
9201 TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT
9251 GCTTCTCTTT TCGGCTTGCG TTTCCCTTG TCCAGATAGC CCAGTAGCTG
9301 ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGAAGTGGCT TCTACGTGTT
9351 CCGCTTCCTT TACGAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGCGG CAGCGTGAAG

```

SEQ ID N°:18 Sequência de nucleótidos do vector de expressão HCMV-K HuAb-VL1 hum V2 (Sequência Completa de DNA de um vector de expressão de cadeia leve humanizada compreendendo SEQ ID N°: 13 (humV2=VLm) de 3926-4246)

```

1 CTAGCTTTTT GCAAAAGCCT AGGCCTCCAA AAAAGCCTCC TCACTACTTC
51 TGGAATAGCT CAGAGGCCGA GGCGGCCTCG GCCTCTGCAT AAATAAAAAA
101 AATTAGTCAG CCATGGGGCG GAGAATGGGC GGAAGTGGGC GGAGTTAGGG
151 GCGGGATGGG CGGAGTTAGG GGCGGGACTA TGGTTGCTGA CTAATTGAGA
201 TGCATGCTTT GCATACTTCT GCCTGCTGGG GAGCCTGGTT GCTGACTAAT
251 TGAGATGCAT GCTTTGCATA CTTCTGCCTG CTGGGGAGCC TGGGGACTTT
301 CCACACCCTA ACTGACACAC ATTCCACAGC TGCTTCGCGC GTTTCGGTGA
351 TGACGGTGAA AACCTCTGAC ACATGCAGCT CCCGGAGACG GTCACAGCTT
401 GTCTGTAAGC GGATGCCGGG AGCAGACAAG CCCGTCAGGG CGCGTCAGCG
451 GGTGTTGGCG GGTGTCGGGG CGCAGCCATG ACCCAGTCAC GTAGCAGATG
501 CGGAGTGEAT ACTGGCTTAA CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTACTGAG
551 AGTGCACCAT ATGCGGTGTG AAATACCGCA CAGATGCGTA AGGAGAAAAT
601 ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG
651 GTCGTTCCGC TCGGGCGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CCGTAATACG
701 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG
751 GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCCTTTTTT
801 CATAGGCTCC GCGCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA
851 GAGGTGGCGA AAGCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG
901 GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT CTTGTTCCGA CCGTCCGCT TACCGGATAC
951 CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGGAAGCGTG GCGCTTTCTC ATAGCTCAGC
1001 CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTGTT TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG

```

1051 TGCACGAACC CCCCGTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACTAT
 1101 CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC
 1151 CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT
 1201 TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT
 1251 ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC
 1301 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA
 1351 AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC
 1401 TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT
 1451 TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT
 1501 AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT
 1551 GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 1601 ATTTGCTTCA TCCATAGTTG CTTGACTCCC CGTCGTGTAG ATAACCTACGA
 1651 TACGGGAGGG CTTACCATCT GGGCCCAAGT CTGCAATGAT ACCGCGAGAC
 1701 CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG
 1751 GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA
 1801 TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG
 1851 CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
 1901 TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG CGAGTTACAT
 1951 GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC
 2001 GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC
 2051 ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTCTGTGA
 2101 CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG
 2151 AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGCGC CACATAGCAG
 2201 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTC
 2251 CAAGGATCTT ACGCTGTGTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA
 2301 CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC
 2351 AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA
 2401 AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTAT
 2451 CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2501 TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG
 2551 TCTAAGAAAC CATTAATTATC ATGACATTA CCTATAAAAA TAGGCGTATC
 2601 ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATTCAGC TTGGCTGCAG TGAATAATAA
 2651 AATGTGTGTT TGTCCGAAAT ACGCGTTTTG AGATTTCTGT CGCCGACTAA
 2701 ATTCATGTCG CGCGATAGTG GTGTTTATCG CCGATAGAGA TGGCGATATT
 2751 GGAAAAATCG ATATTTGAAA ATATGGCATA TTGAAAATGT CGCCGATGTG
 2801 AGTTTCTGTG TAACTGATAT CGCCATTTTT CCAAAAGTGA TTTTGGGCA
 2851 TACGCGATAT CTGGCGATAG CGCTTATATC GTTTACGGGG GATGGCGATA

```

2901 GACGACTTTG GTGACTTGGG CGATTCTGTG TGTCGCAAAT ATCGCAGTTT
2951 CGATATAGGT GACAGACGAT ATGAGGCTAT ATCGCCGATA GAGGCGACAT
3001 CAAGCTGGCA CATGGCCAAT GCATATCGAT CTATACATTG AATCAATATT
3051 GGCCATTAGC CATATTATTC ATTGGTTATA TAGCATAAAT CAATATTGGC
3101 TATTGGCCAT TGCATACGTT GTATCCATAT CATAATATGT ACATTTATAT
3151 TGGCTCATGT CCAACATTAC CGCCATGTTG ACATTGATTA TTGACTAGTT
3201 APTAATAGTA ATCAATTACG GGGTCATTAG TTCATAGCCC ATATATGGAG
3251 TTCCGCGTTA CATAACTTAC GGTAAATGGC CCGCCTGGCT GACCGCCCAA
3301 CGACCCCCGC CCATTGACGT CAATAATGAC GTATGTTCCC ATAGTAACGC
3351 CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT ACGGTAAACT
3401 GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
3451 TGACGTCAAT GACGGTAAAT GGCCCGCCTG GCATTATGCC CAGTACATGA
3501 CCTTATGGGA CTTTCCTACT TGGCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT
3551 ATTACCATGG TGATGCGGTT TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCG
3601 GTTTGACTCA CGGGGATTTT CAAGTCTCCA CCCCATTGAC GTCAATGGGA
3651 GTTTGTTTTG GCACCAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG TCGTAACAAC
3701 TCCGCCCCAT TGACGCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
3751 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC
3801 CACGCTGTTT TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGC
3851 AAGCTTGCCG CCACCATGGA GACCCCCGCC CAGCTGCTGT TCCTGCTGCT
3901 GCTGTGGCTG CCCGACACCA CCGCGACAT TCTGCTGACC CAGTCTCCAG
3951 CCACCCTGTC TCTGAGTCCA GGAGAAAGAG CCACITTTCTC CTGCAGGGCC
4001 AGTCAGAACA TTGGCACAAG CATAAGTGG TATCAACAAA AAACAAATGG
4051 TGCTCCAAGG CTTCTCATAA GGTCTTCTTC TGAGTCTATC TCTGGGATCC
4101 CTTCCAGGTT TAGTGGCAGT GCATCAGGGA CAGATTTTAC TCTTACCATC
4151 AGCAGTCTGG AGCCTGAAGA TTTTGCAGTG TATTACTGTC AACAAAGTAA
4201 TACCTGGCCA TTCACGTTGG GCCAGGGGAC CAAGCTGGAG ATCAAACGTG
4251 AGTATTCTAG AAAGATCCTA GAATTCTAAA CTCTGAGGGG GTCGGATGAC
4301 GTGGCCATTC TTTGCCTAAA GCATTGAGTT TACTGCAAGG TCAGAAAAGC
4351 ATGCAAAGCC CTCAGAAATGG CTGCAAAGAG CTCCAACAAA ACAATTTAGA
4401 ACTTTATTAA GGAATAGGGG GAAGCTAGGA AGAAACTCAA AACATCAAGA
4451 TTTTAAATAC GCTTCTTGGT CTCCTTGCTA TAATTATCTG GGATAAGCAT
4501 GCTGTTTTCT GTCTGTCCCT AACATGCCCT GTGATTATCC GCAAACAACA
4551 CACCCAAGGG CAGAACTTTG TTAATTAAAC ACCATCCGTG TTGCTTCTTT
4601 CCTCAGGAAC TGTGGCTGCA CCATCTGTCT TCATCTTCCC GCCATCTGAT
4651 GAGCAGTTGA AATCTGGAAC TGCCCTCTGT GTGTGCCCTGC TGAATAACTT
4701 CTATCCCAGA GAGGCCAAAG TACAGTGGAA GGTGGATAAC GCCCTCCAAT

```

4751 CCGGTAACTC CCAGGAGAGT GTCACAGAGC AGGACAGCAA GGACAGCACC
4801 TACAGCCTCA GCAGCACCCCT GACGCTGAGC AAAGCAGACT ACCAGAAACA
4851 CAAAGTCTAC GCCTGCGAAG TCACCCATCA GGGCCTGAGC TCGCCCGTCA
4901 CAAAGAGCTT CAACAGGGGA GAGTGTTAGA GGGAGAAGTG CCCCCACCTG
4951 CTCCTCAGTT CCAGCCTGAC CCCCTCCCAT CCTTTGGCCT CTGACCCTTT
5001 TTCCACAGGG GACCTACCCC TATTGCGGTC CTCCAGCTCA TCTTTCACCT
5051 CACCCCCCTC CTCCTCCTTG GCTTTAATTA TGCTAATGTT GGAGSAGAAT
5101 GAATAAATAA AGTGAATCTT TGCACCTGTG GTTTCTCTCT TTCCTCATTT
5151 AATAATTATT ATCTGTTGTT TACCAACTAC TCAATTTCTC TTATAAGGSA
5201 CTAAATATGT AGTCATCCTA AGGCGCATAA CCATTTATAA AAATCATCCT
5251 TCATTCTATT TTACCCATAT ATCCTCTGCA AGACAGTCCT CCCTCAAACC
5301 CACAAGCCTT CTGTCCCTCAC AGTCCCCTGG GCCATGGTAG GAGAGACTTG
5351 CTTCCTTGTT TTCCCCTCCT CAGCAAGCCC TCATAGTCCT TTTTAAGSGT
5401 GACAGGTCTT ACAGTCATAT ATCCTTTGAT TCAATTCCCT GAGAATCAAC
5451 CAAAGCAAAT TTTTCAAAG AAGAAACCTG CTATAAAGAG AATCATTCAT
5501 TGCAACATGA TATAAATAA CAACACAATA AAAGCAATTA AATAAACAAA
5551 CAATAGGGAA ATGTTTAAGT TCATCATGGT ACTTAGACTT AATGGAATGT
5601 CATGCCTTAT TTACATTTTT AAACAGGTAC TGAGGGACTC CTGTCTGCCA
5651 AGGGCCGTAT TGAGTACTTT CCACAACCTA ATTTAATCCA CACTATACTG
5701 TGAGATTAAA AACATTCAAT AAAATGTTGC AAAGGTTCTA TAAAGCTGAG
5751 AGACAAATAT ATTCTATAAC TCAGCAATCC CACTTCTAGA TGA CTGAGTG
5801 TCCCCACCCA CCAAAAACT ATGCAAGAAT GTTCAAAGCA GCTTTATTTA
5851 CAAAAGCCAA AAATTGGAAA TAGCCCGATT GTCCAACAAT AGAATGAGTT
5901 ATTAACTGT GGTATGTTTA TACATTAGAA TACCCAATGA GGAGAATTAA
5951 CAAGCTACAA CTATACCTAC TCACACAGAT GAATCTCATA AAAATAATGT
6001 TACATAAGAG AAAC TCAATG CAAAAGATAT GTTCTGTATG TTTTCATCCA
6051 TATAAAGTTC AAAACCAGGT AAAAATAAAG TTAGAAATTT GGATGGAAAT
6101 TACTCTTAGC TGGGGGTGGG CGAGTTAGTG CCTGGGAGAA GACAAGAAGG
6151 GGCTTCTGGG GTCTTGGTAA TGTCTGTTC CTCGTGTGGG GTTGTCAGT
6201 TATGATCTGT GCACTGTTCT GTATACACAT TATGCTTCAA AATAACTTCA
6251 CATAAAGAAC ATCTTATACC CAGTTAATAG ATAGAAGAGG AATAAGTAAT
6301 AGGTCAAGAC CACGCAGCTG GTAAGTGGGG GGGCCTGGGA TCAAATAGCT
6351 ACCTGCCTAA TCCTGCCCTC TTGAGCCCTG AATGAGTCTG CCTTCCAGGG
6401 CTCAAGGTGC TCAACAAAAC AACAGGCCCTG CTATTTTCCT GGCATCTGTG
6451 CCCTGTTTGG CTAGCTAGGA GCACACATAC ATAGAAATTA AATGAAACAG
6501 ACCTTCAGCA AGGGGACAGA GGACAGAATT AACCTTGCCC AGACACTGGA
6551 AACCCATGTA TGAACACTCA CATGTTTGGG AAGGGGGAAG GGCACATGTA

6601 AATGAGGACT CTTCTCATT CTATGGGGCA CTCTGGCCCT GCGGCTCTCA
 6651 GCTACTCATC CATCCAACAC ACCTTTCTAA GTACCTCTCT CTGCCTACAC
 6701 TCTGAAGGGG TTCAGGAGTA ACTAACACAG CATCCCTTCC CTCAAATGAC
 6751 TGACAATCCC TTTGTCTGCG TTTGTTTTTC TTTCCAGTCA GTACTGGGAA
 6801 AGTGGGGGAG GACAGTCATG GAGAACTAC ATAAGGAAGC ACCTTGCCCT
 6851 TCTGCCTCTT GAGAATGTTG ATGAGTATCA AATCTTTCAA ACTTTGGAGG
 6901 TTTGAGTAGG GGTGAGACTC AGTAATGTCC CTTCCAATGA CATGAACTTG
 6951 CTCACTCATC CCTGGGGGCC AAATTGAACA ATCAAAGGCA GGCATAATCC
 7001 AGCTATGAAT TCTAGGATCG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT
 7051 TTGGACAAAC CACAAC TAGA ATGCAGTGAA AAAAATGCTT TATTTGTGAA
 7101 ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAAAC ATTATAAGCT GCAATAAACA
 7151 AGTTAACAAC AACAAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT CAGGGGGAGG
 7201 TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACC TCTACAAATG TGGTATGGCT
 7251 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAATATTC CTTATTAACC
 7301 CCTTTACAAA TTAAAAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGTAG CATAGTTATT
 7351 AATAGCAGAC ACTCTATGCC TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT
 7401 GATTATAACT GTTATGCCTA CTTATAAAGG TTACAGAATA TTTTTCATA
 7451 ATTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTCC TTTGTGGTGT AAATAGCAAA
 7501 GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAA AAACCTTAGCA
 7551 ATTCTGAAGG AAAGTCCTTG GGGTCTTCTA CCTTCTCTT CTTTTTTGGA
 7601 GGAGTAGAAT GTTGAGAGTC AGCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT
 7651 TTCTTCTGAG CAAAACAGGT TTTCTCATT AAAGGCATTC CACCACTGCT
 7701 CCCATTCATC AGTTCCATAG GTTGAATCT AAAATACACA AACAAATTAGA
 7751 ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA AATTTTATAT TTACCTTAGA
 7801 GCTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTGTCCAA TTATGTCACA CCACAGAAGT
 7851 AAGGTTCTT CACAAAGATC CGGGACCAA GCGGCCATCG TGCCCTCCCA
 7901 CTCCTGCAGT TCGGGGGCAT GGATGCGCGG ATAGCCGCTG CTGGTTCTCT
 7951 GGATGCCGAC GGATTTGCAC TGCCGCTAGA ACTCCGCGAG GTCGTCCAGC
 8001 CTCAGGCAGC AGCTGAACCA ACTCGCGAGG GGATCGAGCC CGCGGTGGGC
 8051 GAAGAACTCC AGCATGAGAT CCCCGCGCTG GAGGATCATC CAGCCGGCGT
 8101 CCGGAAAAC GATTCCGAAG CCCAACCTTT CATAGAAGGC GCGGTGGGAA
 8151 TCGAAATCTC GTGATGGCAG GTTGGGCGTC GCTTGGTCCG TCATTTGAA
 8201 CCCCAGAGTC CCGCTCAGAA GAACTCGTCA AGAAGGCGAT AGAAGGCGAT
 8251 GCGCTGCGAA TCGGGAGCGG CGATACCGTA AAGCACGAGG AAGCGGTCAG
 8301 CCCATTGCCC GCCAAGCTCT TCAGCAATAT CACGGGTAGC CAACGCTATG
 8351 TCCTGATAGC GGTCCGCCAC ACCCAGCCGG CCACAGTCGA TGAATCCAGA
 8401 AAAGCGGCCA TTTTCCACCA TGATATTCCG CAAGCAGGCA TCGCCATGGG

8451 TCACGACGAG ATCCTCGCCG TCGGGCATGC GCGCCTTGAG CCTGGCGAAC
 8501 AGTTCCGGCTG GCGCGAGCCC CTGATGCTCT TCGTCCAGAT CATCCTGATC
 8551 GACAAGACCG GCTTCCATCC GAGTACGTGC TCGCTCGATG CGATGTTTCG
 8601 CTTGGTGGTC GAATGGGCAG GTAGCCGGAT CAAGCGTATG CAGCCGCCGC
 8651 ATTGCATCAG CCATGATGGA TACTTTCTCG GCAGGAGCAA GGTGAGATGA
 8701 CAGGAGATCC TGCCCCGGCA CTTCGCCCAA TAGCAGCCAG TCCCTTCCCG
 8751 CTTCAGTGAC AACGTCGAGC ACAGCTGCGC AAGGAACGCC CGTCGTGGCC
 8801 AGCCACGATA GCCGCGCTGC CTCGTCCTGC AGTTCATTCA GGGCACCGGA
 8851 CAGGTCCGTC TTGACAAAAA GAACCGGGCG CCCCTGCGCT GACAGCCGGA
 8901 ACACGGCGGC ATCAGAGCAG CCGATTGTCT GTTGTGCCCA GTCATAGCCG
 8951 AATAGCCTCT CCACCCAAGC GGCCGGAGAA CCTGCGTGCA ATCCATCTTG
 9001 TTCAATCATG CGAAACGATC CTCATCCTGT CTCTTGATCA GATCTTGATC
 9051 CCCTGCGCCA TCAGATCCTT GSCGGCAAGA AAGCCATCCA GTTTACTTTG
 9101 CAGGGCTTCC CAACCTTACC AGAGGGCGCC CCAGCTGGCA ATTCCGGTTC
 9151 GCTTGCTGTC CATAAAACCG CCCAGTCTAG CTATCGCCAT GTAAGCCCAC
 9201 TGCAAGCTAC CTGCTTCTC TTTGCGCTTG CGTTTTCCT TGTCCAGATA
 9251 GCCCAGTAGC TGACATTCAT CCGGGGTCAG CACCGTTTCT GCGGACTGGC
 9301 TTTCTACGTG TTCCGCTTCC TTTAGCAGCC CTTGCGCCCT GAGTGCTTGC
 9351 GGCAGCGTGA AG

SEQ ID N°:31: Parte da sequência de aminoácidos da cadeia pesada humanizada designada VHE-N73D

EVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDIWGQ GTTVTVSS

SEQ ID N°:32: Parte da sequência de aminoácidos da cadeia pesada humanizada designada VHQ-N73D

QVQLVESGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYIIHWVKQE PGQGLEWIGY
FNPNHGTKY NEKFKGRATL TADKSISTAY MELSSLRSED TAVYYCARSG
PYAWFDIWGQ GTTVTVSS

SEQ ID N°:33: Sequência de nucleótidos que codifica a sequência de aminoácidos SEQ ID N°: 8

GACATTCTGCTGACCCAGTCTCCAGCCACCCTGTCTCTGAGTCCAGGAGAAAGAGCCA
 CTCTCTCCTGCAGGGGCCAGTCAGAACATTGGCACAAGCATACAGTGGTATCAACAAAA
 CCAGGTCCAGGCTCCAAGGCTTCTCATAAGGTCTTCTTCTGAGTCTATCTCTGGGATCCC
 TTCCAGGTTTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTTACTCTTACCATCAGCAGTCTGG
 AGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAACAAAGTAATACCTGGCCATTACAGTTC
 GGCCAGGGGACCAAGCTTGAAATCAAA

SEQ ID Nº:34: Sequência de nucleótidos que
 codifica sequência de aminoácidos SEQ ID Nº: 31

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACCTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

SEQ ID Nº:35 Sequência de nucleótidos que
 codifica a sequência de aminoácidos SEQ ID Nº: 32

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCAGGAGCCGAAGTGAAAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAG
 GTGTCCTGCAAGGCCTCTGGATACACATTCACCTAATTATATTATCCACTGGGTGAAGCA
 GGAGCCTGGTCAGGGCCTTGAATGGATTGGATATTTTAATCCTTACAATCATGGTACTA
 AGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAGGGCCACACTAACTGCAGACAAATCCATCAGCACA
 GCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGCGCTCTGAGGACACTGCGGTCTACTACTGTGCAA
 GATCAGGACCCTATGCCTGGTTTGACACCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTC
 CTCA

SEQ ID Nº 36 Sequência de nucleótidos do vector
 de expressão LCVL1Sp20

1 CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA
 51 GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAATATTA GAAGATGTTG CTTTTACTCT
 101 TAAGTTGGTT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA

```

151  GAGGGTTTTTC AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
201  AATTGAGGT CTTGTTTGIG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
251  GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAACA
301  ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTAAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
351  TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
401  AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
451  GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTTGAAA CACTCTGTCC
501  AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
551  TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTCAG CCGAAACTGG AGAGGTCCTC
601  TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAAAT TTAGCTTGAG TAGTTCTAGT
651  TTCCCCAAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATTT
701  TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
751  TAATATAFTT AGAAAACCTC TTAAAATTAC TCTATTTATC TTCCCTCTGA
801  TTATGGTCT CCATTCAATT CTTTTCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
851  CTTTGITCAT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCCTAC TATTAAGACT
901  TTGACATTC TGTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTFCAA GACCACCTTC
951  TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACITTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
1001 CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTPTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
1051 ATTATCCGCA AACCAACACAC CCAAGSGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
1101 ATCCTGTTTG CTTCTTTCCT CAGGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
1151 TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG CTCTGTTGTG
1201 TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT
1251 GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG
1301 ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA
1351 GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TGCGAAGTCA CCCATCAGGG
1401 CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451 AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501 TTGGCCTCTG ACCCTTTTTC CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCTCT
1551 CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCCTCTC CTCCTTGGCT TTAATTATGC
1601 TAATGTTGGA GGAGAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
1651 TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTATTATC TGTTGTTTTA CCAACTACTC
1701 AATTCTCTT ATAAGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
1751 GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801 AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
1851 GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAGTAA
1901 CAACAACAAT TGCATTCAAT TTATGTTTCA GGTTCAAGGG GAGGTGTGGG
1951 AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT

```


2001 GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAT ATTCCTTATT AACCCCTTTT
 2051 CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
 2101 AGACACTCTA TGCCTGTGFG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT
 2151 AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTTT CATAATTTTC
 2201 TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC
 2251 AAGAGTTCTA TTACTAAACA CAGCATGACT CAAAAAAGTT AGCAATTCCTG
 2301 AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTTT TGGAGGAGTA
 2351 GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCTTC
 2401 TGAGCAAAAC AGGTTTTCTT CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCATT
 2451 CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
 2501 AGTTTAACAC ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTTACCT TAGAGCTTTA
 2551 AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
 2601 CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCCTCC CCACTCCTGC
 2651 AGTTCGGGGG CATGGATGCG CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCTGGATGCC
 2701 GACGGATTTG CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC
 2751 AGCAGCTGAA CCAACTGCGG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA
 2801 AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCCTG
 2851 TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAAGTT ATACTTGATG CCTTTTTCTT
 2901 CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTT
 2951 CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCTGCATGAT
 3001 CCTTGTCACA AAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCATG GCTTCCTGGT
 3051 AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
 3101 TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
 3151 ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
 3201 TTCTGTCTTT TAAAGGTGGA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTT
 3251 CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT
 3301 CATTCCTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCT GAGCGGAGGC CAGGGTCGGT
 3351 CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG ACACGGCCAC GATGCAATTC
 3401 AATGGTCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG
 3451 CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTTGC
 3501 AAAAGCCTAG GCCTCCAAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA
 3551 GAGGGCCGAG GCGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC
 3601 CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAACTGGGCG GAGTTAGGGG CGGGATGGGC
 3651 GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG
 3701 CATACTTCTG CTTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
 3751 ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACCTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG
 3801 GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGGTTTT

```

3851   CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
3901   CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCG TCAGGGCGCG
3951   TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
4001   CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
4051   ACTGAGAGTG CACCATATGC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
4101   GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCTCGCTC
4151   ACTGACTCGC TCGCTCGGT CGTTCCGCTG CGGCGAGCG TATCAGCTCA
4201   CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAA
4251   AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCC
4301   GCGTTGCTGG CGTTTTCCTA TAGGCTCCGC CCCCCTGACC ASCATCACAA
4351   AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGCGAAA CCGACAGGA CTATAAAGAT
4401   ACCAGGCGTT TCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGCTCTCC TGTCCGACC
4451   CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCTTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGC
4501   GCTTTCTCAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCTTC
4551   GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CAOGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGC
4601   GCCTTATCCG GTAACATCG TCTTGAGTCC AACC CGGTAA GACACGACTT
4651   ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGSTATG
4701   TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CGGCTACACT
4751   AGAAGGACAG TATTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGG
4801   AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAACCACC GCTGGTAGCG
4851   GTGGTTTTTT TGTGTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCT
4901   CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAACGA
4951   AAACTCACGT TAAGGGATTT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCA
5001   CCTAGATCCT TTFAAATTAA AAATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATA
5051   TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACC
5101   TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTCATC CATAGTTGCC TGACTCCCCG
5151   TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCT
5201   GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT TATCAGCAAT
5251   AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT CCAACTTTAT
5301   CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGGAAGCTAG AGTAAGTAGT
5351   TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGT
5401   GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTCCCAAC
5451   GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA AGCGGTAGC
5501   TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTCAGAAAGT AAGTTGGCCG CAGTGTTATC
5551   ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCG
5601   TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAA
5651   TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CAOGGATAA

```

5701 TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTT
 5751 CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTEAG ATCCAGTTCG
 5801 ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCAC
 5851 CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGG
 5901 GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTGGAATAC TCATACTCTT CCTTTTTCAC
 5951 TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATT
 6001 TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGCG ACATTTCCCC
 6051 GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAAAC
 6101 TATAAAAATA GCGGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTG
 6151 CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGGAAGCAAC
 6201 GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAATA
 6251 TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAAACCA
 6301 CACCTTCCAG TAGTATCTG TTACTGTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
 6351 AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
 6401 GGCTCCCATTA CTCGAAGCTC AGCAAAACAT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
 6451 CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTTGT TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC
 6501 TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTGTT GATATCATGG CTACTAAAAT
 6551 GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
 6601 TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
 6651 GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT
 6701 TGAAAACCTA CATAGTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
 6751 GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
 6801 TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTAAAGA GAGAACTGGG
 6851 ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAATGTTG
 6901 TAATTAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAACAA
 6951 CAACAACAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
 7001 CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAATTAT GTACTGCCTA
 7051 GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
 7101 ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
 7151 ACATTAGTTT TGTTTGTTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAAT
 7201 CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
 7251 AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
 7301 GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTCAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
 7351 TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
 7401 GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
 7451 GCTTCCGTGA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
 7501 AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG

```

7551  ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
7601  AGAGCCACTC TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
7651  GTGGTATCAA CAAAAACCAG GTCAGGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
7701  CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTFAGTGG CAGTGGATCA
7751  GGGACAGATT TTACTCTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
7801  AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTCAAG TTCGGCCAGG
7851  GGACCAAGCT TGAAATCAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
7901  GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAAATCTTA
7951  CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
8001  CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
8051  CAGTGTAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

```

**SEQ ID Nº:37 Sequência de nucleótidos do vector
de expressão HCVHEN73Dsp20**

```

1  ctagagaggt ctggtggagc ctgcaaaagt ccagctttca aaggaacaca gaagtatgtg
61  tatggaatat tagaagatgt tgcttttact cttaagttgg ttctaggaa aaatagttaa
121  atactgtgac tttaaaatgt gagagggttt tcaagtactc atttttttaa atgtccaaaa
181  tttttgtcaa tcaatttgag gtcttggttg tgtagaactg acattactta aagtttaacc
241  gaggaatggg agtgaggctc tctcataccc tattcagaac tgacttttaa caataataaa
301  ttaagtttaa aatattttta aatgaattga gcaatgttga gttggagtca agatggcoga
361  tcagaaccag aacacctgca gcagctggca ggaagcaggt catgtggcaa ggctatttgg
421  ggaagggaaa ataaaaccac taggtaaact tgtagctgtg gtttgaagaa gtggttttga
481  aacactctgt ccagccccac caaaccgaaa gtccaggtcg agcaaacac cacctgggta
541  atttgcattt ctaaaataag ttgaggattc agcogaaact ggagaggtcc tcttttaact
601  tattgagttc aaccttttaa ttttagcttg agtagttcta gtttccocaa acttaagttt
661  atcgacttct aaaatgtatt taagctttct ggggcaggcc aggcctgacc ttggctttgg
721  ggcagggagg gggctaagggt gaggcaggtg gcgccagcca ggtgcacacc caatgcccat
781  gagcccgagc actggacgct gaacctcgcg gacagttaag aaccagggg cctctgcgcc
841  ctgggccccag ctctgtccca caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcctccac
901  caagggccca tgggtcttcc cctgtgcacc ctcttccaag agcacctctg ggggcacagc
961  ggccctgggc tgcttggtca aggactactt ccccgaaacc gtgacggtgt cgtggaactc
1021  aggcgcctcg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggactcta
1081  ctccctcagc agcgtggtga cctgtccctc cagcagcttg ggcacccaga cctacatctg
1141  caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa ggtggacaag agagttagtg agaggccagc
1201  acagggaggg aggggtgtctg ctggaagcca ggctcagcgc tctgtcctgg agcatccccg
1261  gctatgcagt cccagtcagc ggcagcaagg caggccccgt ctgcctcttc acccggaggg
1321  ctctgccccg cccacteatg ctgagggaga gggctctctg gctttttccc caggctctgg
1381  gcaggcacag gctaggtgcc cctaaccag gccctgcaca caaaggggca ggtgctgggc
1441  tcagacctgc caagagccat atccgggagg acctgcctcc tgacctaaag ccaccccaaa

```

1501 ggccaaaactc tccaactccct cagctcggac accttctctc dtcccagatt ccagtaactc
1561 ccaatctttct ctctgcagag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc
1621 caggtaagcc agcccaggcc tcgccctcca gctcaaggcg ggacaggtgc cctagagtag
1681 cctgcataca gggacaggcc ccagccgggt gctgacaegt ccacctccat ctcttctca
1741 gcacctgaac tectgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc
1801 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac
1861 cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag
1921 ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtggtea gcgctctcac cgtctgcac
1981 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaa tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc
2041 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa ggtggggacc gtgggggtgc agggccacat
2101 ggacagagge cggtcggcc caccctctgc cctgagagtg accgctgtac caacctctgt
2161 ccctacaggg cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat
2221 gaccaagaac caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatgc
2281 cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaaacta aagaccacgc ctccgtgct
2341 ggactcggac ggctccttct tctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca
2401 gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacaggca
2461 gaagagcctc tcctgtccc cgggtaaatg agtgcgacgg ccggcaagcc cccgtcccc
2521 gggctctcgc ggtcgcaoga ggatgcttgg caggtacccc gtctacatac ttcccaggca
2581 cccagcatgg aaataaagca cccaccactg ccctgggccc ctgcgagact gtgatgggtc
2641 ttccacggg tcaggccgag tctgaggcct gagtggcatg agggaggcag agcgggtccc
2701 actgtccca cactggcca ggctgtgcag gtgtgcctgg gccgcctagg gtggggtca
2761 gccaggggt gccctcgga ggggtgggga ttgcccagcg tggccctccc tcacgcagca
2821 gctgccctgg gctgggccc gagaagcctt agggagccct ggggacagac acacagcccc
2881 tgctctgtga ggagactgtc ctgtctgtg agcgccctgt cctccgaccc cgatgcccac
2941 tcgggggcat gcctagtcca tgcgcgtagg gacaggccct cctcaccca tctacccca
3001 cggcactaac cctggcagc cctgcccagc ctgcaccccg catggggaca caaccgactc
3061 cggggacatg cactctgggg ccctgtggag ggactgggtg agatgcccac acacacactc
3121 agcccagacc cgttcaacaa accccgaact gaggttggtc gagcgggagt gcggccagag
3181 cctgcctcgg ccgtcagggg ggactcccgg gctcactcga aggaggtgcc accatttcag
3241 ctttggtagc ttttcttctt cttttaaat ttctaaagct cattaatgt ctttgatgtt
3301 tcttttgtga tgacaataaa atatcctttt taagtcttgt acttcgtgat gggagccgcc
3361 ttctgtgtc cagcgccctc ctgccccgg tgggaagcac ggtcaggagg aggtgggtcc
3421 agctgcacct cgggggctcc ctgcactcgc ccccgccctc ctgcagccac acgcattgcc
3481 cgagcgacc tccttgccc ctgtcactac atggaccctt ggggcttctc ctcttttcta
3541 catggatgca gtttctctc ctgctgggca cgggtgctgc tgccctggtc actctgcggg
3601 ggacagggcc tccagggaaa gctgggtcga ggctgggagc tggctcaggc tggccaggca
3661 gagccacagg gagggccttc cagaaccaac catggtccga agcgagaggt ggggtgtcaga
3721 tccagacatg ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtga
3781 aaaatgcttt atctgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg
3841 caataaaca gttacaaca acaattgcat tcattttatg ttccaggttc agggggaggt
3901 gtgggaggtt ttttaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtatggctg attatgatct

3961 ctagtcaagg cactatacat caaatattcc ttattaaccc ctttacaast taaaaagcta
 4021 aagggtacaca atttttgagc atagttatta atagcagaca ctctatgcct gtgtggagta
 4081 agaaaaaaca gtatgttatg attataactg ttatgcctac ttataaaggt tacagaatat
 4141 ttttccataa ttttcttgta tagcagtgca gctttttcct ttgtgggtgta aatagcaaaag
 4201 caagcaagag ttctattact aaacacagca tgactcaaaa aacttagcaa ttctgaaggga
 4261 aagtccttgg ggtcttctac ctttctcttc ttttttggag gaggtagaatg ttgagagtca
 4321 gcagtagect catcatcact agatggcatt tcttctgagc aaaacaggtt ttctcatta
 4381 aaggcattcc accactgctc ccattcatca gttccatagg ttggaatcta aaatacacaa
 4441 acaattagaa tcagtagttt aacacattat acacttaaaa attttatatt taccttagag
 4501 ctttaaatct ctgtaggtag tttgtccaat tatgtcacac cacagaagta aggttccttc
 4561 acaaagatcc ggaccaaagc ggccatcgtg cctccccact cctgcagttc gggggcatgg
 4621 atgcgcggat agccgctgct ggtttcctgg atgccgacgg atttgcactg ccggtagaac
 4681 tccgcgaggt cgtccagcct caggcagcag ctgaaccaac tcgcgagggg atcgagcccg
 4741 ggggtgggca agaartccag catgagatcc ccgcgctgga ggatcatcca gccggcgtcc
 4801 cggaaaacga ttccgaagcc caacctttca tagaaggcgg cgggtggaatc gaaatctcgt
 4861 gatggcaggt tgggcgtcgc ttggtcggtc atttcgaacc ccagagtccc gctcagaaga
 4921 actcgtcaag aaggcgatag aaggcgatgc gctgcgaatc gggagcggcg ataccgtaaa
 4981 gcacgaggaa gcggtcagcc cattccgccg caagctcttc agcaatatca cgggtagcca
 5041 acgctatgtc ctgatagcgg tccgccacac ccagccggcc acagtcgatg aatccagaaa
 5101 agcggccatt ttccaccatg atattcggca agcaggcatc gccatgggtc acgacgagat
 5161 cctcgccgtc gggcatgcgc gccttgagcc tggcgaaacag ttcggtctggc gcgagccctt
 5221 gatgctcttc gtccagatca tcttgatcga caagaccggc ttccatccga gtacgtgctc
 5281 gctcgatgag atgtttcgtc tgggtggtcga atgggcaggt agccggatca agcgtatgca
 5341 gccgccgcat tgcacagcc atgatggata ctttctcggc aggagcaagg tgagatgaca
 5401 ggagatcctg ccccggcact tcgcccaata gcagccagtc ccttcccgtc tcagtacaaa
 5461 cgtcgagcac agctgcgcaa ggaacgcccg tcgtggccag ccacgatagc cgcgtgcct
 5521 cgtcctgcag ttcatcagg gcaccggaca ggtcggctctt gacaaaaaga accgggcgcc
 5581 cctgcgctga cagccggaac acggcggcat cagagcagcc gattgtctgt tgtgccagt
 5641 catagccgaa tagcctctcc acccaagcgg ccggagaacc tgcgtgcaat ccctcttgtt
 5701 caatcatgag aaacgatcct catcctgtct cttgatcaga tcttgatccc ctgcgccatc
 5761 agatccttgg cggcaagaaa gccatccagt ttactttgca gggcttccca acctaccag
 5821 agggcgcccc agctggcaat tcgggttcgc ttgctgtcca taaaaccgcc cagtctagct
 5881 atcgccatgt aagcccactg caagctacct gctttctctt tgcgtttggc ttttcccttg
 5941 tccagatagc ccagtagctg acattcater ggggtcagca ccgtttctgc ggactggctt
 6001 tctacgtgtt ccgcttctct tagcagccct tgcgccctga gtgcttgagg cagcgtgaag
 6061 ctttttgcaa aagcctaggc ctccaaaaaa gcctctctac tacttctgga atagctcaga
 6121 ggccgaggcg gcctcggcct ctgcataaat aaaaaaatt agtcagccat ggggcggaga
 6181 atgggcggaa ctgggcggag ttagggcgcg gatgggcgga gttagggcg ggactatggt
 6241 tgctgactaa ttgagatgca tgccttgcat acttctgcct gctggggagc ctggggactt
 6301 tccacacctg gttgctgact aattgagatg catgctttgc atactctgc ctgctgggga
 6361 gcctggggac ttccacacac ctaactgaca cacattccac agctgcctcg cgcgtttcgg

6421 tgatgaecgt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta
 6481 agcggatgcc gggagcagac aagcccgta gggcgcgta ggggtgttg ggggtgtcg
 6541 gggcgagcc atgaccagc cagtagcga tagcggagt tatactggct taactatgag
 6601 gcatcagagc agattgtact gagagtgcac catatgcggt gtgaaatacc gcacagatgc
 6661 gtaaggagaa aataccgcat caggcgctct tccgcttcc cgtcactga ctgcctgagc
 6721 tcggctcgtt ggtgaggcg agcggatat gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc
 6781 acagaatcag gggataacgc aggaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaaggccagg
 6841 aacogtaaaa agcccgctt gctggcgctt ttccatagga tccgcccccc tgacgagcat
 6901 cacaataatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaaccgca caggactata aagataccag
 6961 gcgtttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgacctgac gcttaccgga
 7021 taacctgtcg cctttctccc ttccggagac gtggcgcttt ctcatagctc acgctgtagg
 7081 tatctcagtt cgggtgtagg cgttcgctcc aagctgggct gtgtgcagca acccccgctt
 7141 cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac
 7201 gacttatcgc cactggcagc agccactggg aacaggatta gcagagcag gtatgtaggc
 7261 ggtgctacag agttcttgaa gtggtggcct aactaaggct acactagaag gacagtatct
 7321 ggtatctgag ctctgctgaa gccagttacc ttoggaaaaa gagttagtag ctcttgatcc
 7381 ggcaaacaaa ccacgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc
 7441 agaaaaaag gatctcaaga agatcccttg atcttttcta cggggtctga cgtcagtggt
 7501 aacgaaaaat caggttaagg gattttgggc atgagattat caaaaaggat cttcacctag
 7561 atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatetaaa gtatatatga gtaaaacttg
 7621 totgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg
 7681 tcatccatag ttgcctgact ccccgctcgt tagataacta cgatacggga gggttacca
 7741 tctggcccca gtgctgcaat gataccgaga gaccacgct caccggctcc agatttatca
 7801 gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagt gtcccgcaac tttatccgcc
 7861 tccatccagt ctattaattg ttgccgggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt
 7921 ttgcgcaacg ttgttgccat tgcctgagga atcgtgggtg cagctcgtc gtttggtatg
 7981 gcttcattca gctccggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtc
 8041 aaaaaagcgg ttagctcctt cggctcctcg atcgttgtca gaagtaagt ggccgcagtg
 8101 ttatcactca tgggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga
 8161 tgcctttctg tgactgggtg gtactcaacc aagtcattct gagaatagt tatgcggcga
 8221 ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta
 8281 aaagtgtcga tcattggaaa acgttctctg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg
 8341 ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcaaccaact gatcttcagc atcttttact
 8401 ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaa ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata
 8461 agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt
 8521 tatcagggtt atgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaacia
 8581 ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt
 8641 atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgagga cctttcgtct tcaagaattc
 8701 gagctcggta cccatcagcc aaaaagcatg cctgccacac aacatcaatt tctggaaaac
 8761 gctacactta attatttcta gtagaacagc tctttggttt gccaaaaaga atcacctata
 8821 gtggcatcta agcacaaaaa ggagaaaaaa atcacaaaga aatgattgag aggcataata

8881 aaaattatca aaaaattatg agttttacga tttcatcttt ttccaagttg aaatcatagg
 8941 gtggctttta cacagtgcac aggaatgtgc atgctgccat tatggtgctc tgcctaaaat
 9001 ggttggagcc ttgtcatgct acagagaaac tgtcatacag cagggsgtgc caaatttccc
 9061 tattttttta tatcattgag caggtgcaca gaagaccaga aagcactttc tatcaggetc
 9121 gccttccctc tcttttccag tatgaagcaa aaactgccaa tgaactagc aattgttaaa
 9181 ttcctttttc aaacagtatt tgtgctatca gaacatagtg cattcaaaag tctagcctga
 9241 gagaacaacc cagttttatt cattcctcct actacctctc tcattccccc tgtttgtgtt
 9301 ctccctccca ttttaattgt ctatctagtc caaactaagc acacgatcca gtccacatta
 9361 aacaacatgt tttcacttta agtcaaatac aagacacctt taatatcagc ccttggtcat
 9421 aatcgtgctt ctagtgcatt aatgtacatg tcacactgta ctgttgggtt ttgtgtctca
 9481 tcatgaacaa tgttgtgaag gtattaaagt gagagtaagc agaattagat tctctaatg
 9541 atgcaccccc aactaagag cagaaataat attaaaaata gaaaaaaaag ttttcatga
 9601 gatttcaaat acccaggtat gagctgcagt ttcttcaagt taaagcatcg aggttgtcag
 9661 ttacactatt acaggaaaca tatgcagagt ttttatttta gtatattagt ttccacatat
 9721 gtggaattac tattaacta ttctttcttt tcaaatgctt accattgtaa atgagtttgt
 9781 gacttttgtt aggtgagtgc acatgactct ggatgcctaa gaggactgaa gaagttggag
 9841 ttataggtag ttttattcta cttgactggt cagtgcctaa aatacaactg aggtccttta
 9901 aactgctgtt catgaacttc ttaattgata tatctcatga gatctctaaa ctatttttat
 9961 tatgacacgt ttcaccattt tcaactgtaac gatttttatg ttttatatta atgtaactat
 10021 atgacacttc ccaaaatccc catattcaca attgaactgt ttcaaagttt taccttgact
 10081 tatgggaat gaasacccac attttataat tttaaaatga aatgtttatt ttatatctct
 10141 gcaaatttca caaggaaaga ttagtcaactg gtgtgtgaga gcagaggagc ataagagttc
 10201 aggaatagaa tccattatga ttctggaggc aaggagaac tgatgccaag gtttcagtat
 10261 aagagcagta tccactggaa aggataaagt cactacatct gagcacagag caggacatct
 10321 acataatgag tggtcactaa tgggocactg ttacactggt atatgtataa ggctcaagaa
 10381 tgagcactga ggctgtaagg tgtatgggtg aggacatcag gatgtaaac cagctcaggt
 10441 agaggactca gaggacagca cagtccagcat gaactaataa acatcagata agataaggca
 10501 caagctcagc tatatagggg aagggatcct tgtaaatctg attgtgcctc cagtctagtt
 10561 caatgtgact taggaagccc agtcatatgc aaatctagag aagactttag agtagaaatc
 10621 tgaggctcac ctacataacc agcaagcgag tgaccagtta gtcttaaggc accacttctt
 10681 agacatcatg gcttgggtgt ggaccttgcc attcctgatg gcagctgcc aaagtaagac
 10741 atcagaaaaa agagttccaa ggggaattga agcagttcca tgaatactca ccttctgtg
 10801 ttcttttccac aggtgtccag gcagaggtgc agctggtgga gtcaggagcc gaagtgaana
 10861 agcctggggc ttcagtgaag gtgtcctgca aggcctctgg atacacattc actaattata
 10921 ttatccactg ggtgaagcag gacctggctc agggccttga atggattgga tattttaatc
 10981 cttacaatca tggtaactaag tacaatgaga agttcaaagg cagggccaca ctaactgcag
 11041 acaaatccat cagcacagcc tacatggagc tcagcagcct gcgctctgag gacactgcgg
 11101 tctactactg tgcaagatca ggacctatg cctggtttga cacctggggc caagggacca
 11161 cggtcaccgt ctctcaggt aagaatggcc actctagggc ctttgttttc tgcgtctgcc
 11221 tgtgggattt catgagcatt gcaagttgt cctcgggaca tgttcogagg ggacctgggc
 11281 ggactggcca ggaggggagc ggcactgggg tgcttgagg atctgggagc ctctgtggt


```

11341 tttccgatgc ctttggaaaa tgggaactgag gttggggtgcg tctgagacag taactcagecc
11401 tgggggcttg gtgaagatcg ccgcacagca gogagtcctg gaaatatctt atttagactt
11461 gtgaggtgcg ctgtgtgtca atttacatct taaatccttt attggctgga aagagaattg
11521 ttggagtggg tgaatccagc caggagggac gcggggggat cca

```

**SEQ ID Nº: 38 Sequência de nucleótidos do vector
de expressão HCVHQN73Dsp20**

```

1   CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA GAAGTATGTG
61  TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG TTCCTAGGAA AAATAGTTAA
121 ATACTGTGAC TTTAAATGTI GAGAGGGTTT TCAAGTACTC ATTTTTTTTAA ATGTCCAAAA
181 TTTTGTCAA TCAATTTGAG GTCTTGTGTTG TGTAGAAGTG ACATTACTTA AGTTTAAACC
241 GAGGAATGGG AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
301 TTAAGTTTAA AATATTTTAA AATGAATTGA GCAATGTGTA GTTGGAGTCA AGATGCCCGA
361 TCAGAACCAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT CATGTGGCAA GGCTATTTGG
421 GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA
481 AACACTCTTT CCAGCCCCAC CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA
541 ATTTGCATTT CTAAATAAGT TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTAACT
601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA ACTTAAAGTTT
661 ATGACTTCTT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC AGGCCTGACC TTGGCTTTGG
721 GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT
781 GAGCCCAGAC ACTGGACGCT GAACCTGCGG GACAGTTAAG AAGCCAGGGG CCTCTGCGCC
841 CTGGGCCCCAG CTCTGTCCCA CACCGGGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTCCCAAG AGCACCTCTG GGGGCACAGC
961 GGCCCTGGGC TGCCCTGGTC AGGACTACTT CCCCAGACCG GTGACGGTGT CGTGGAACTC
1021 AGGCGGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCGGGCTGTC CTACAGTCTT CAGGACTCTA
1081 CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG
1141 CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGGCG TCCTGCCTGG ACGCATCCCG
1261 GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT CTGCCTCTTC ACCCGAGGC
1321 CTCTGCCCCG CCCACTCATG CTCAGGAGAG GGGTCTTCTG GCTTTTTCCC CAGGCTCTGG
1381 GCAGGCACAG GCTAGGTGCC CCTAACCCAG GCGCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC
1441 TCAGACCTGC CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA
1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT CCAGTAACTC
1561 CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC TCACACATGC CCACCGTGCC
1621 CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CTTAGAGTAG
1681 CCTGCATCCA GGGACAGGCC CCAGCGGGGT GCTGACAGT CCACCTCCAT CTCTTCTCA
1741 GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCTGAGTTC TTCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT CCGGACCCCC TGAGGTGACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
1861 CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
1921 CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCAGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTTCAC CGTCTGACAC
1981 CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGGCC

```

2041 CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT
 2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCTCTGCG CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC CAACCTCTGT
 2161 CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG CCCCCATCCC GGGAGGAGAT
 2221 GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGK
 2281 CGTGGAGTGG GAGAGCAATG GGCAGCCGGA GAACAACTAC AAGACCACGC CTCCCGTGCT
 2341 GGACTCGAC GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCF
 2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC ACTACACGCA
 2461 GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGCAGCGG CCGGCAAGCC CCCGCTCCCC
 2521 GGGCTCTCGC GGTGCGACGA GGATGCTTGG CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAAGCA
 2581 CCCAGCATGG AAATAAAGCA CCCACCACTG CCGTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC
 2641 TTTCCACGGG TCAGGCCGAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGGTCCC
 2701 ACTGTCCCCA CACTGGCCCC GGTGTGTGAG GTGTGCCTGG GCCGCTAGG GTGGGGCTCA
 2761 GCGAGGGGCT GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA
 2821 GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT AGGAGCCCTT GGGACAGAC ACACAGCCCC
 2881 TGCCCTCTGA GGAGACTGTC CTGTCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCCCA
 2941 TCGGGGGCAT GCCTAGTCCA TGCGCGTAGG GACAGGCCCT CCCTCACCCA TCTACCCCCA
 3001 CGGCACTAAC CCTGGCAGC CCTGCCCAGC CTCGCACCCG CATGGGGACA CAACCGACTC
 3061 CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC AGATGCCAC ACACACACTC
 3121 AGCCCAGACC COTPCAACAA ACCCGCACT GAGGTGGTGC GAGCGGGAGT GCGGCCAGAG
 3181 CCTGCCCTCG CCGTCAGGGA GGACTCCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTTCA
 3241 CTTTGGTAGC TTTTCTTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAAATTGT CTTTGATGTT
 3301 TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCTTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT GGGAGCCGCC
 3361 TTCTGTGTC CACGCGCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC GGTCAGGAGG AGGCTGGTCC
 3421 AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTCGC CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTECC
 3481 CGAGCGACCC TCCCTGGCCC CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA
 3541 CATGGATGCA GTTCTCTCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTCGGGG
 3601 GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTGGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC TGGCCAGGCA
 3661 GAGCCACAGG GAGGGCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA AGCGAGAGGT GCGTGTGAGA
 3721 TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA
 3781 AAAATGCTTT ATTTGTGAAA TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA TTATAAGCTG
 3841 CAATAAACAA GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTCAGGTTT AGGGGGAGGT
 3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG ATTATGATCT
 3961 CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC CTTTACAAAT TAAAAAGCTA
 4021 AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA
 4081 AGAAAAACA GTATGTTATG ATTATACTG TTATGCCTAC TTATAAGGT TACAGAATAT
 4141 TTTTCCATAA TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTCCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
 4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGAATCAAAA AACTTAGCAA TTCTGAAGGA
 4261 AAGTCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG GAGTAGAATG TTGAGAGTCA
 4321 GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCATTA
 4381 AAGGCATTC ACCACTGCTC CCAATCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA
 4441 ACAATTAGAA TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACTTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG

4501 CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA AGGTTCCTTC
 4561 ACAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT CCTGCAGTTC GGGGGCATGG
 4621 ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC
 4681 TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCC
 4741 GGGTGGGCGA AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
 4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC GAAATCTCGT
 4861 GATGGCAGGT TGGGCGTCCG TTGGTGGTTC ATTTGGAACC CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA
 4921 ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC GCTGCGAATC GGGAGCGGGC ATACCGTAAA
 4981 GCACGAGGAA GCGGTCAGCC CATTCGCGCG CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGTAGCCCA
 5041 ACGCTATGTC CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
 5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGCGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTG ACGACGAGAT
 5161 CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG TTGGGCTGGC GCGAGCCCCCT
 5221 GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC
 5281 GCTCGATGCG ATGTTTCGCT TGGTGGTCTGA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA
 5341 GCGCGCGCAT TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
 5401 GGAGATCCTG CCCCCGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CTTCCCCGCT TCAGTGACAA
 5461 CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCGCG TCGTGGCCAG CCACGATAGC CGCGCTGCCT
 5521 CGTCTGCGAG TTCATTCAAG GCACCGGACA GGTGGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC
 5581 CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAGT
 5641 CATAGCCGAA TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACG TGCSTGCAAT CCATCTTGTT
 5701 CAATCATGCG AAGCGATCCT CATCTGTCT CTGATCAGA TCTTGATGCC CTGCGCCATC
 5761 AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TACTTTTGA GGGCTTCCCA ACCTTACCAG
 5821 AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTCGC TTGCTGTCCA TAAACCGGCC CAGTCTAGCT
 5881 ATCGCCATGT AAGCCCACTG CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TGGCTTGGC TTTTCCCTTG
 5941 TCCAGATAGC CCACTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGACTGGCTT
 6001 TCTACGTGTT CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TCGCCCTGA GTGCTTGGCG CAGCGTGAAG
 6061 CTTTTTTGAA AAGCCTAGGC CTCGAAAAAA GCCTCCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA
 6121 GGCCGAGGCG GCCTGGGCTT CTGCATAAAT AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA
 6181 ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGAATATGGT
 6241 TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
 6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC CTGCTGGGGA
 6361 GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAAGTCACA CACATTCAC AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG
 6421 TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA
 6481 AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG
 6541 GGGCGCAGCC ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAAGTATGCG
 6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC
 6661 GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTGCTGCGC
 6721 TCGGTCGTTT GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC
 6781 ACGAATCAG GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAGGCCAGG
 6841 AACCCTAAAA AGGCGCGCTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT
 6901 CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCGA CAGGACTATA AAGATACCAG

6961 GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTC CGACCCGTGCC GCTTACCGGA
7021 TACCTGTCCG CCTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG
7061 TATCTCAGTT CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT
7141 CAGCCCGACC GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC
7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC
7261 GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT
7321 GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTGTATCC
7381 GGCAAAACAA CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTGTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGCG
7441 AGAAAAAAG GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
7501 AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAGGAT CTTACCTAG
7561 ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG
7621 TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG
7681 TCATCCATAG TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA
7741 TCTGGCCCCA GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTTSCAAC TTTATCCGCC
7861 TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTGCGC AGTTAATAGT
7921 TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGGTATG
7981 GCTTCAFTCA GCTCCGTTT CCACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC
8041 AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT CGGTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG
8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATCTCTTA CTGTATGCC ATCCGTAAGA
8161 TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA
8221 CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAACACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA
8281 AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG
8341 TTGAGATCCA GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGGATA
8461 AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT
8521 TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA
8581 ATAGGGGTTT CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT
8641 ATCATGACAT TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAGGAGGC CCTTTCCTCT TCAAGAATTC
8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT TCTGGAAAAC
8761 GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT GCCAAAAGA ATCACCTATA
8821 GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA
8881 AAAATTATCA AAAAATTATG AGTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG
8941 GTGGCTTTAA CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAT
9001 GGTGGAGGCC TTGTCTGCT ACAGAGAAAC TGTATACAG CAGGGGCTGC CAAATTTCCA
9061 TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA AAGCACTTTC TATCAGGCTG
9121 GCCTTCCTCT TCTTTCCAG TATGAAGCAA AAAGTCCAA TGAAACTAGC AATTGTTAAA
9181 TTCCTTTTTC AAACAGTATT TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA
9241 GAGAACAACC CAGTTTTATT CATTCCTCCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGTTTGTGTT
9301 CTCCCTCCCA TTTAATTGT CTATCTAGTC CAACTAAGC ACACGATCCA GTCCACATTA
9361 AACACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT TAATATCAGC CCTTGTTCAT

```

9421  AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA
9481  TCATGAACAA TGTGTGAAG GTATTAAAGT GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG
9541  ATGCACACCC ACACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAG TTTTACATGA
9601  GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG AGGTTGTCAG
9661  TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA GTATATTAGT TTTACACATAT
9721  GTGGAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTTT TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT
9781  GACTTTGTGT AGGTGAGTGC ACATGACTCT GGATGCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGGAG
9841  TTATAGGTAG TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCCCTTA
9901  AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA CTATTTTTAT
9961  TATGACACGT TTCACCATTT TCACTGTAAAC GATTTTATG TTTTATATTA ATGTAACTAT
10021 ATGACACTTC CCRAAATCCC CATATTCACA ATTGAAGTGT TFCRAAGTTT TACCTTGACT
10081 TATGGGAAAT GAAAACCAC ATTTTATAAT TTTAAATGA AATGTTTATT TTATATTTCT
10141 GCAAATTTCA CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG GTTTCAGTAT
10261 AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT GAGCAGAGAG CAGGACATCT
10321 ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA
10381 TGAGCACTGA GGCTGTAAGG TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT
10441 AGAGGACTCA GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAATCTG ATTGTGCATC CAGTCTAGTT
10561 CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG AAGACTTTAG AGTAGAAATC
10621 TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT
10681 AGACATCATG GCTTGGGTGT GGACCTTGCC ATTCCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC
10741 ATCAGAAAAA AGAGTTCCAA GGGGANTTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGA GTCAGGAGCC GAAGTGAAAA
10861 AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTCA AGGCCTCTGC ATACACATTC ACTAATTATA
10921 TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC
10981 CTTACAATCA TGGTACTAAG TACAATGAGA AGTTCRAAG CAGGGCCACA CTAAGTGCAG
11041 ACAAATCCAT CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCCG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCTTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC CAAGGGACCA
11161 CGGTACCGT CTCTCAGGT AAGAAATGGC ACTCTAGGGC CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC
11221 TGTGGGATT CATGAGCATT GCAAAGTTGT CCTCGGACA GTTCCGAGG GGACCTGGGC
11281 GGACTGGCCA GGAGGGGACG GGCCTGGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT
11341 TTTCCGATGC CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401 TGGGGGCTT GTCAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCCT GAAATATCTT ATTTAGACTT
11461 GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTT ATTGGCTGGA AAGAGAATTG
11521 TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC GCGGGGGGAT CCA

```

SEQ ID N°: 39 Sequência de nucleótidos do vector
de expressão LCVL2Sp20

```

1      CTAGAGTCCT AGAGAGGTCT GGTGGAGCCT GCAAAAGTCC AGCTTTCAAA
51     GGAACACAGA AGTATGTGTA TGGAATATTA GAAGATGTTG CTTTTACTCT

```

```

101   TAAGTTGGGT CCTAGGAAAA ATAGTTAAAT ACTGTGACTT TAAAATGTGA
151   GAGGGTTTTT AAGTACTCAT TTTTTTAAAT GTCCAAAATT TTTGTCAATC
201   AATTTGAGGT CTTGTTTGTG TAGAACTGAC ATTACTTAAA GTTTAACCGA
251   GGAATGGGAG TGAGGCTCTC TCATACCCTA TTCAGAACTG ACTTTTAACA
301   ATAATAAATT AAGTTTAAAA TATTTTTTAAA TGAATTGAGC AATGTTGAGT
351   TGGAGTCAAG ATGGCCGATC AGAACCAGAA CACCTGCAGC AGCTGGCAGG
401   AAGCAGGTCA TGTGGCAAGG CTATTTGGGG AAGGGAAAAT AAAACCACTA
451   GGTAAACTTG TAGCTGTGGT TTGAAGAAGT GGTTTTGAAG CACTCTGTCC
501   AGCCCCACCA AACCGAAAGT CCAGGCTGAG CAAAACACCA CCTGGGTAAT
551   TTGCATTTCT AAAATAAGTT GAGGATTCAG CCGAAACTGG AGAGGTCCTC
601   TTTTAACTTA TTGAGTTCAA CCTTTTAATT TTAGCTTGAG TAGTCTAGT
651   TTCCCCAAAC TTAAGTTTAT CGACTTCTAA AATGTATTTA GAACTCATTT
701   TCAAAATTAG GTTATGTAAG AAATTGAAGG ACTTTAGTGT CTTTAATTTT
751   TAATATATTT AGAAAACTTC TTAATAATTAC TCTATTATTC TTCCCTCTGA
801   TTATTGGTCT CCATTCAATT CTTTCCCAAT ACCCGAAGCA TTTACAGTGA
851   CTTTGTTTCT GATCTTTTTT AGTTGTTTGT TTTGCCCTAC TATTAAGACT
901   TTGACATTCT GGTCAAAACG GCTTCACAAA TCTTTTTCAA GACCACTTTC
951   TGAGTATTCA TTTTAGGAGA AATACTTTTT TTTTAAATGA ATGCAATTAT
1001  CTAGGACCTG CAGGCATGCT GTTTTCTGTC TGTCCCTAAC ATGCCCTGTG
1051  ATTATCCGCA AACAACACAC CCAAGGGCAG AACTTTGTTA CTTAAACACC
1101  ATCCTGTTTG CTTCCTTCCT CAGGAACTGT GGCTGCACCA TCTGTCTTCA
1151  TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACGCG CTCTGTTGTG
1201  TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAGGTT
1251  GGATAACGCC CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG
1301  ACAGCAAGGA CAGCACCTAC AGCCTCAGCA GCACCCGACG GCTGAGCAAA
1351  GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC TCCGAAGTCA CCCATCAGGG
1401  CCTGAGCTCG CCCCACACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG TGTTAGAGGG
1451  AGAAGTGCCC CCACCTGCTC CTCAGTTCCA GCCTGACCCC CTCCCATCCT
1501  TTGGCCTCTG ACCCTTTTTC CACAGGGGAC CTACCCCTAT TGCGGTCTCT
1551  CAGCTCATCT TTCACCTCAC CCCCCTCTTC CTCTTGGCTT TTAATATGTC
1601  TAATGTTGGA GGAGAAATGAA TAAATAAAGT GAATCTTTGC ACCTGTGGTT
1651  TCTCTCTTTC CTCATTTAAT AATTAATATC TGTGTTTTTA CCAACTACTC
1701  AATTTCTCTT ATAAGGGACT AAATATGTAG TCATCCTAAG GCGGGATATC
1751  GAGATCTGAA GCTGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT GAGTTTGGAC
1801  AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAAAAAAAT GCTTTATTTG TGAAATTTGT
1851  GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA
1901  CAACAACAAT TGCATTCAAT TTATGTTTCA GTTTCAGGGG GAGGTGTGGG
1951  AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT
2001  GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAT ATTCCCTTAT AACCCCTTTA
2051  CAAATTAAAA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT TATTAATAGC
2101  AGACACTCTA TGCCGTGTGT GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT

```

```

2151   AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTTC CATAATTTTC
2201   TTGTATAGCA GTGCAGCTTT TTCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC
2251   AAGAGTTCTA TTACTAACA CAGCATGACT CAAAAAACTT AGCAATTCTG
2301   AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC TCTTCTTTT TGGAGGAGTA
2351   GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG GCATTTCCTC
2401   TGAGCAAAAC AGGTTTTCTT CATTAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCAAT
2451   CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT
2501   AGTTTAAAC ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTTACCT TAGAGCTTTA
2551   AATCTCTGTA GGTAGTTTGT CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT
2601   CCTTCACAAA GATCCGGACC AAAGCGGCCA TCGTGCTCC CCACTCCTGC
2651   AGTTCCGGGG CATGGATGCC CGGATAGCCG CTGCTGGTTT CCGGATGCC
2701   GACGGATTTC CACTGCCGGT AGAACTCCGC GAGGTCGTCC AGCCTCAGGC
2751   AGCAGCTGAA CCAACTCGCG AGGGGATCGA GCATCCCCCA TGGTCTTATA
2801   AAAATGCATA GCTTTAGGAG GGGAGCAGAG AACTTGAAAG CATCTTCCTG
2851   TTAGTCTTTC TTCTCGTAGA CTTCAAACCT ATACTTGATG CCTTTTTCTT
2901   CCTGGACCTC AGAGAGGACG CCTGGGTATT CTGGGAGAAG TTTATATTTT
2951   CCCAAATCAA TTTCTGGGAA AAACGTGTCA CTTTCAAATT CCGCATGAT
3001   CCTTGTCA CAAGAGTCTGA GGTGGCCTGG TTGATTCATG GCTTCCTGGT
3051   AAACAGAACT GCCTCCGACT ATCCAAACCA TGTCTACTTT ACTTGCCAAT
3101   TCCGGTTGTT CAATAAGTCT TAAGGCATCA TCCAAACTTT TGGCAAGAAA
3151   ATGAGCTCCT CGTGGTGGTT CTTTGAGTTC TCTACTGAGA ACTATATTAA
3201   TTCTGTCTT TAAAGGTGGA TTCTTCTCAG GAATGGAGAA CCAGGTTTTT
3251   CTACCCATAA TCACCAGATT CTGTTTACCT TCCACTGAAG AGGTTGTGGT
3301   CATTCCTTGG AAGTACTTGA ACTCGTTCCT GAGCGGAGGC CAGGGTCGGT
3351   CTCCGTTCTT GCCAATCCCC ATATTTTGGG ACACGGCGAC GATGCAGTTC
3401   AATGATCGAA CCATGATGGC AGCGGGGATA AAATCCTACC AGCCTTCACG
3451   CTAGGATTGC CGTCAAGTTT GGGGGTACCG AGCTCGAATT AGCTTTTGGC
3501   AAAAGCCTAG GCCTCCAAA AAGCCTCCTC ACTACTTCTG GAATAGCTCA
3551   GAGGGCCGAG GCGGCCTCGG CCTCTGCATA AATAAAAAAA ATTAGTCAGC
3601   CATGGGGCGG AGAATGGGCG GAATCGGCG GAGTTAGGGG CGGATGGGC
3651   GGAGTTAGGG GCGGGACTAT GGTGCTGAC TAATTGAGAT GCATGCTTTG
3701   CATACTTCTG CCTGCTGGGG AGCCTGGGGA CTTTCCACAC CTGGTTGCTG
3751   ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCTGCTGG GGAGCCTGGG
3801   GACTTTCCAC ACCCTAACTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGGCTTT
3851   CGGTGATGAC GGTGAAAACC TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA
3901   CAGCTTGTCT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA GACAAGCCCC TCAGGGCGCG
3951   TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC AGTCACGTAG
4001   CGATAGCGGA GTGTATACTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
4051   ACTGAGAGTG CACCATATCC GGCCGCATAT GCGGTGTGAA ATACCGCACA
4101   GATGCGTAAG GAGAAAATAC CGCATCAGGC GCTCTTCCGC TTCCTCGCTC
4151   ACTGACTCGC TCGGCTCGGT CGTTCGGCTG CGGCGAGCGG TATCAGCTCA

```

```

4201   CTCAAAGGCG GTAATACGGT TATCCACAGA ATCAGGGGAT AACGCAGGAJ
4251   AGAACATGTG AGCAAAAGGC CAGCAAAAGG CCAGGAACCG TAAAAAGGCJ
4301   GCGTTGCTGG CGTTTTTCCA TAGGCTCCGC CCCCCTGACG AGCATCACAJ
4351   AAATCGACGC TCAAGTCAGA GGTGGGAAA CCCGACAGGA CTATAAAGAJ
4401   ACCAGGCGTT TCCCCCTGGA AGCTCCCTCG TCGGCTCTCC TGTTCGGACJ
4451   CTGCCGCTTA CCGGATACCT GTCCGCCCTT CTCCCTTCGG GAAGCGTGGJ
4501   GCTTTCCTAT AGCTCACGCT GTAGGTATCT CAGTTCGGTG TAGGTCTGTJ
4551   GCTCCAAGCT GGGCTGTGTG CACGAACCCC CCGTTCAGCC CGACCGCTGJ
4601   GCCTTATCCG GTAACCTATCG TCTTGAGTCC AACCCGGTAA GACACGACTJ
4651   ATCGCCACTG GCAGCAGCCA CTGGTAACAG GATTAGCAGA GCGAGGTATJ
4701   TAGGCGGTGC TACAGAGTTC TTGAAGTGGT GGCCTAACTA CCGCTACACTJ
4751   AGAAGGACAG TATTTGGTAT CTGCGCTCTG CTGAAGCCAG TTACCTTCGJ
4801   AAAAAGAGTT GGTAGCTCTT GATCCGGCAA ACAAAACCACC GCTGGTAGCJ
4851   GTGGTTTTTT TGTTCGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA AAAAGGATCJ
4901   CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC AGTGGAAACJ
4951   AAATCACGCT TAAGGGATT TGGTCATGAG ATTATCAAAA AGGATCTTCAJ
5001   CCTAGATCCT TTAAATTAA AATGAAGTT TTAAATCAAT CTAAAGTATAJ
5051   TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA GTGAGGCACJ
5101   TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TCGTTTATC CATAGTTGCC TGACTCCCCGJ
5151   TCGTGTAGAT AACTACGATA CCGGAGGGCT TACCATCTGG CCCCAGTGCTJ
5201   GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACC GCTCCAGATT TATCAGCAATJ
5251   AAACCAGCCA GCCCGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCCT GCAACTTTATJ
5301   CCGCTCCAT CCACTCTATT AATTGTTGCC GCGAAGCTAG AGTAAGTAGJ
5351   TCGCCAGTTA ATAGTTTGGC CAACGTTGTT GCCATTGCTG CAGGCATCGJ
5401   GGTGTCAAGC TCCTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC GGTTCCCAACJ
5451   GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCCATGT TGTGCAAAA AGCGGTTAGJ
5501   TCCTTCGGTC CTCGATCGT GTTCAGAAAT AAGTTGGCCG CAGTGTATCJ
5551   ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC ATGCCATCCGJ
5601   TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC ATTCTGAGAAJ
5651   TAGTGTATGC GCGCAGCAG TTGCTCTTGC CCGGCGTCAA CACGGGATRAJ
5701   TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT GGAAAACGTTJ
5751   CTTCGGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG ATCCAGTTGJ
5801   ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT TTACTTTCACJ
5851   CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC GCAAAAAGGJ
5901   GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT CCTTTTCAAJ
5951   TATTATTGAA GCATTIATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG GATACATATTJ
6001   TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC ACATTTCCCCJ
6051   GAAAAGTGCC ACCTGACGTC TAAGAAACCA TTATTATCAT GACATTAACCJ
6101   TATAAAAATA GCGTATCAC GAGGCCCTTT CGTCTTCAAG AATTCAGCTGJ
6151   CTCGAGGAAG AGCTCAAACC CATGCTACTC TCTGGCTTGA TGGAGCAACJ
6201   GCTTTCATAG CTGAGCTGTC ATAAATAATA AAGAGATTTT TTTATTAAAJ

```



```

6251   TTGAAAAGAT GGGTTATTTA TGTAAGACTC TGTCTTCATT TTAAAAACCA
6301   CACCTTCCAG TAGTATTCTG TTAAGTTTCT GGCAATCACT GTGATCAAGA
6351   AGCTACACGG TGAGTTGTGC TTCTCAGTCC TAAGGGATAC ATCTACAAGA
6401   GGCTCCCATG CTCGAAGCTC AGGAAACATT GTAGAAAAGG AGGCAAAAGA
6451   CTGACAGAGC CAGAGGACCA AGAAATTTGT TGTGAGGTTG TGTCTCCTAC
6501   TAACAATATA AGCAATATCT ATAAATTTGT GATATCATGG CTACTAAAAT
6551   GTGAGTTGAA CGAGGAGGAC ACAAAATGAAC ATGACAATCA GAATGAGGCC
6601   TCTCACCTGC AAAAAACACT ATAGAGAAGC AGATAAAGCT GTCAGCAGAA
6651   GAGGCGCACC TCCTTATAGA AGAAGCCTAC CAGGTTTGAT ATATCAGCCT
6701   TGAAAACCTA CATAGTATTT ACATTATATC GAGTCTATGA GACATATTTA
6751   GTAATGCATA TGTATGTGTG TGTGTGCATG TATGTGTGTA AATACATATG
6801   TTCATAGAAA AATGTGTAAA AAGAGATCAT GAATTTAAGA GAGAACTGGG
6851   ACAATTTTTT TCAGGGAGTT GTAATCAGGA AAGTTAAGGG AAAAAATGTTG
6901   TAATTAAAAT TCAGGCTCAG AAACAAACAA AGGAAAAGAA AAAAAAACAA
6951   CAACAACAAC AAAAAACAA AACAAAGGAG AAGCTGTATG GCCACAATAG
7001   CATCTACAGC TAACTGTGAA AGGATAATGG AACAAAGTTAT GTACTGCCTA
7051   GAGCAGTATG ATGCCTAAAT CATCTCGACA TGGAGGAAAA TAGAACAAAG
7101   ACACTCTACA TAGACTATGA TAGAAATCAA AATAAGGTGT AAGACATAGA
7151   ACATTAGTTT TGTTTGTTGT TCAAAGAGAC TCACATTCCC ACAAAAAAT
7201   CTGTGGGATT TTACAGGTCT GCAATAAGCT GCTGACCTGA TGATTTCTGC
7251   AGCTGTGCCT ACCCTTTGCT GATTTGCATG TACCCAAAGC ATAGCTTACT
7301   GACATGAGGA TTTCTTCATA GTCAGGTCAC ACCCTTTGCT GGAGTCAGAA
7351   TCACACTGAT CACACACAGT CATGAGTGTG CTCACTCAGG TCCTGGCGTT
7401   GCTGCTGCTG TGGCTTACAG GTAATGAAGA CAGCACTAGA ATTTTATTGA
7451   GCTTCCTGTA CACTGTGCTG CTTGTCTCTG TGAAAATTCT CTTGTGAATT
7501   AATCATGTGG GGATCTGTTT TCAATTTTTC AATTGTAGGT ACGCGTTGTG
7551   ACATTCTGCT GACCCAGTCT CCAGCCACCC TGTCTCTGAG TCCAGGAGAA
7601   AGAGCCACTT TCTCCTGCAG GGCCAGTCAG AACATTGGCA CAAGCATACA
7651   GTGGTATCAA CAAAAACAA ATGGTGCTCC AAGGCTTCTC ATAAGGTCTT
7701   CTTCTGAGTC TATCTCTGGG ATCCCTTCCA GGTTTAGTGG CAGTGGATCA
7751   , GGGACAGATT TTAAGTTTAC CATCAGCAGT CTGGAGCCTG AAGATTTTGC
7801   AGTGTATTAC TGTCAACAAA GTAATACCTG GCCATTACAG TTCGGCCAGG
7851   GGACCAAGCT TGAAATCAAA CGTAAGTAGA ATCCAAAGTC TCTTTCTTCC
7901   GTTGTCTATG TCTGTGGCTT CTATGTCTAA AAATGATGTA TAAATCTTA
7951   CTCTGAAACC AGATTCTGGC ACTCTCCAAG GCAAAGATAC AGAGTAACTC
8001   CGTAAGCAAA GCTGGGAATA GGCTAGACAT GTTCTCTGGA GAATGAATGC
8051   CAGTGTAAATA ATTAACACAA GTGATAGTTT CAGAAATGCT CTAGTT

```

SEQ ID N°: 40 Sequência de nucleótidos do vetor
de expressão HCVHESp20

```

1   CTAGAGAGST CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
51  GAAGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
101 TTCTTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTTAAATGT GAGAGGGTTT
151 TCAAGTACTC ATTTTFTTAA ATGTCCAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
201 GTCTTGTTTG TGTAGAACTG ACATTACTTA AAGTTTAACC GAGGAATGGG
251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
301 PTAAGTTTAA AATATTTTAA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
351 AGATGGCCCA TCAGAACCAG AACACCTECA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
401 CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAAACCAC TAGGTAAACT
451 TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
501 CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGGGTA ATTTGCATTT
551 CFAAAATAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGTTC TCTTTTAACT
601 TATTGAGTTC AACCTTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTTCTA GTTTCCCCAA
651 ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATT TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
701 AGGCCTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
751 GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
801 GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCAGGGG CCTCTGCGCC CTGGGCCCCAG
851 CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
901 CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCTCCAAAG AGCACCTCTG
951 GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCCAACCG
1001 GTGACGGTGT CGTGGAACCT AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT
1051 CCGGCTGTG CTACAGTCCT CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA
1101 CCGTGCCCTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
1151 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGCGC TCCTGCTTGG
1251 ACGCATCCCC GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
1301 CTGCCTCTTC ACCCGGAGGC CTCTGCCCCG CCCACTCATG CTCAGGGAGA
1351 GGGTCTTTCT GCTTTTTCCT CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC
1401 CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
1451 CAAGAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA
1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCAGATT
1551 CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
1601 TCACACATGC CCAACGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA
1651 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
1701 CCAGCCGGGT GCTGACACGT CCACCTCCAT CTCTTCCTCA GCACCTGAAC
1751 TCCTGGGGGG ACCGTCACTC TTCCTCTTCC CCCCCAACCC CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT CCGGACCCCC TGAGGTCACA TGGGTGGTGG TGGACGTGAG
1851 CCACGAAGAC CTTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCCTGGAGG
1901 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC

```

```

1951 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
2001 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
2051 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT
2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCCTCTG CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC
2151 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCTG
2201 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCCT
2251 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
2301 GGCAGCCGSA GAACAACACT AAGACCACGC CTCCCCTGCT GGA CTCCGAC
2351 GGCTCCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACRAGA GCAGGTGGCA
2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
2451 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGGTAAATG AGTGGGACGG
2501 CCGGCAAGCC CCGCTCCTCC GGGCTCTCGC GGTCCACCGA GGATGCTTGG
2551 CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAAGCA
2601 CCCACCACTG CCCTGGGCCC CTGGGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG
2651 TCAGGCCGAG TCTGAGGCCT GAGTGGCATG AGGGAGGCAG AGCGGCTCCC
2701 ACTGTCCCCA CACTGGCCCA GGCTGTGCAG GTGTGCCTGG GCCGCCTAGG
2751 GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT GCCCTCGGCA GGGTGGGGGA TTTGCCAGCG
2801 TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT
2851 AGGAGCCCTT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCCCTCTGT GGAGACTGTC
2901 CTGTCTCTGT AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCCAC TCGGGGGCAT
2951 GCCTAGTCCA TGCGGCTAGG GACAGGCCCT CCTCACCCA TCTACCCCCA
3001 CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCCAGC CTCGCACCCG CATGGGGACA
3051 CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGA CTGCTGC
3101 AGATGCCCAC ACACACACTC AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT
3151 GAGGTTGGTC GAGCGGGAGT GCGGCCAGAG CCTGCCTCGG CCGTCAGGGA
3201 GGACTCCCGG GCTCACTCSA AGGAGGTGCC ACCATTTAG CTTTGSTAGC
3251 TTTTCTCTCT CTTTAAATTT TTCTAAAGCT CATTAAATTG CTTTGATGTT
3301 TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
3351 GGGAGCCGCC TTCTGTGTTC CACGCGCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC
3401 GGTGAGAGG AGGCTGGTCC AACTGCACCT CCGGGGCTCC CTGCACTCGC
3451 CCCCCGCTTC CTGCAGCCAC ACGCATTGCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC
3501 CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA CATGGATGCA
3551 GTTTCTCTCT CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
3601 GGACAGGGCC TCCAGGGAAA GCTGGGTGGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
3651 TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGGCCCTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
3701 AGCGAGAGGT GGGTGTGAGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
3751 TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA
3801 TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
3851 GTTAACAACA ACAATTGCTT TCATTTTATG TTTCAGGTTT AGGGGGAGGT
3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCTT CTACAAATGT GGTATGGCTG
3951 ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAAATATTCC TTATTAACCC

```

```

4001   CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTTSAGC ATAGTTATTA
4051   ATAGCAGACA CTCTATGCCT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
4101   ATTATAACTG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAATAT TTTCCATAA
4151   TTTTCTTGTA TAGCAGTGCA GCTTTTTCCT TTGTGGTGTA AATAGCAAAG
4201   CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGA CTCAAAA AACTTAGCAA
4251   TTCTGAAGGA AAGTCCTTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG
4301   GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
4351   TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
4401   CCATTTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AAATACACAA ACAATTAGAA
4451   TCAGTAGTTF AACAATTAT ACACCTTAAA ATTTTATATF TACCTTAGAG
4501   CTTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTACAC CACAGAAAGTA
4551   AGGTTCTCTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCGTG CCTCCCCACT
4601   CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGCGGAT AGCCGCTGCT GGTTCCTGG
4651   ATGCGGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT
4701   CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCGCGAGGGG ATCGAGCCCG GGGTGGGCGA
4751   AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCGCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
4801   CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
4851   GAAATCTCGT GATGCGAGGT TGGGCGTCGC TTGCTCGCTC ATTTGGAACC
4901   CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
4951   GCTCGGAATC GGGAGCGCGC ATACCGTAAA GCACGAGGAA CGCGTCAGCC
5001   CATTCGCGGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGTAGCCA ACCTATGTC
5051   CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
5101   AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
5151   ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
5201   TTGGGCTGSC GCGAGCCCTT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
5251   CAAGACCGGC TTCCATCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCGCT
5301   TGGTGGTCCA ATGGGCAGGT AGCCGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCAT
5351   TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
5401   GGAGATCCTG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCGCT
5451   TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCG TCGTGGCCAG
5501   CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGCGT TTCATTGAGG GCACCGGACA
5551   GGTGCTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
5601   ACGGCGGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAGT CATAGCCGAA
5651   TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TGCCTGCAAT CCATCTTGT
5701   CAATCATGCC AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC
5751   CTGCGCCATC AGATCCTTGG CGGCAAGAAA GCCATCCAGT TTA CT TTGCA
5801   GGGCTTCCCA ACCTTACCG AGGCGCCCCC AGCTGGCAAT TCCGTTGCG
5851   TTGCTGTCCA TAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACTG
5901   CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TCGCTTGGG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
5951   CCAGTAGCTG ACATTATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGA CT TGGCTT
6001   TCTACGTGTT CCGCTTCTT TAGCAGCCCT TCGCCCTGA GTGCTTGGCG

```

```

6051 CAGCGTGAAG CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCGAAAAAA GCCTCCTCAC
6101 TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GGCCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT
6151 AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
6201 TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGACTATGGT TGCTGACTAA
6251 TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC
6351 CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAACGACA CACATTCCAC
6401 AGCTGCCTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAACCTCT GACACATGCA
6451 GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTGTCTGTGA AGCGGATGCC GCGAGCAGAC
6501 AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGTGTTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC
6551 ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG
6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGAC CATATGCGGT GTGAAATACC
6651 GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCGCTTCCT
6701 CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTG GGCTGCGGCG AGCGGTATCA
6751 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
6801 AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
6851 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGCCCCCCC TGACGAGCAT
6901 CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
6951 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT
7001 CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CTTTCTCCC TCGGGGAGC
7051 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
7101 CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCAGC
7151 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC
7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
7251 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
7301 AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
7351 TTCCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA CCACCGCTGG
7401 TAGCGGTGGT TTTTTGTGTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
7451 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
7501 AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT
7551 CTTACCTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAA TCAATCTAAA
7601 GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCCT AATCAGTGAG
7651 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
7701 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
7751 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTATCA
7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC
7851 TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGAGAA GCTAGAGTAA
7901 GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
7951 ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGTTT
8001 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
8051 TTAGCTCCTT CGGTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCACTG

```

```

8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGSCAT AATTCTCTTA CTGTCAATGCC
8151 ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGCTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT
8201 GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCCGGC GTCAACACGG
8251 GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
8301 ACGTTCTTCG GGCCGAAAAC TCTCAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
8351 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA
8451 AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT
8501 TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
8551 ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT
8601 TCCCCGAAA GTGCLACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCATGACAT
8651 TAACCTATAA AAATAGGCGT ATCAGGAGGC CCTTTCGTCT TCAAGATTCT
8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
8751 TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTT
8801 GCCAAAAAGA ATCACCCTATA GTGGCATCTA AGCACA AAAA GGAGAAAAAA
8851 ATCACAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
8901 AGTTTTACGA TTTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
8951 CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCTC TGCCTAAAAAT
9001 GGTGGAGGCC TTGTCATGCT ACAGAGAAAC TGTCATACAG CAGGGGGTGC
9051 CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
9101 AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCTTTCCAG TATGAAGCAA
9151 AAAGTGCCAA TGAACTAGC AATGTTTAAA TTCCTTTTTC AAACAGTATT
9201 TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAACC
9251 CAGTTTTIAT CATTCTCTCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGTTTGTGTT
9301 CTCCTCCCA TTTAATTGT CTATCTAGTC CAACTAAGC ACACGATCCA
9351 GTCCACATTA AACAACATGT TTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT
9401 TAATATCAGC CCTGTTCAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
9451 TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTGTGAAG
9501 GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC
9551 AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAAG TTTTACATGA
9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG
9651 AGGTTGTGAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA
9701 GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAAACTA TTCTTTCTTT
9751 TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
9801 ACATGACTCT GGATGCCTAA GAGGACTGAA GAAGTTGAG TTATAGGTAG
9851 TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCTTTTA
9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
9951 CTATTTTTAT TATGACACGT TTCACCTTT TCACTGTAA CATTTTTATG
10001 TTTTATATTA ATGTAACAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTCACA
10051 ATTGAAGTGT TTCAAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAAT GAAACCCAC
10101 ATTTTATAAT TTTAAATGA AATGTTTATT TTATATTCTT GCAAAATFCA

```

```

10153 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAGG
10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATRAGGCA
10501 CAAGCTCAGC TATATAGGGT AAGGGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC
10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
10651 TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCCT AGACATCATG GCTTGGGTGT
10701 GGACCTTGCC ATTCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
10751 AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTCTCTGTG
10801 TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCAGAGGTGC AGCTGGTGGA GTCAGGAGCC
10851 GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTGCA AGGCCTCTGG
10901 ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
10951 AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
11001 TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAA ACAATCCAT
11051 CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101 TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCCATAG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151 CAAGGGACCA CGGTCAACGT CTCCTCAGGT AAGAAATGGCC ACTCTAGGGC
11201 CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAAGTTGT
11251 CCTCGGGACA TGTTCGGAGG GGACCTGGGC GGACTGCCCC GGAGGGGAGG
11301 GGCACTGGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTICCGATGC
11351 CTTTGCAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401 TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
11451 ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501 ATTGGCTGGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551 GCGGGGGGAT CCA

```

**SEQ ID Nº:41 Sequência de nucleótidos do vector
de expressão HCVHQSp20**

```

1 CTAGAGAGGT CTGGTGGAGC CTGCAAAAGT CCAGCTTTCA AAGGAACACA
51 GAGGTATGTG TATGGAATAT TAGAAGATGT TGCTTTTACT CTTAAGTTGG
101 TTCTAGGAA AAATAGTTAA ATACTGTGAC TTAAAAATGT GAGAGGGTTT
151 TCAAGTACTC ATTTTTTTAA ATGTCCAAAA TTTTGTCAA TCAATTTGAG
201 GTCTGTGTTG TGTAGAAGTG ACATTAATTA AAGTTTAACC GAGGAATGGG
251 AGTGAGGCTC TCTCATACCC TATTCAGAAC TGACTTTTAA CAATAATAAA
301 TTAAGTTTAA AATATTTTAA AATGAATTGA GCAATGTTGA GTTGGAGTCA
351 AGATGGCCGA TCAGAACAG AACACCTGCA GCAGCTGGCA GGAAGCAGGT
401 CATGTGGCAA GGCTATTTGG GGAAGGGAAA ATAAACCAC TAGCTAAACT

```

```

451  TGTAGCTGTG GTTTGAAGAA GTGGTFTTGA AACACTCTGT CCAGCCCCAC
501  CAAACCGAAA GTCCAGGCTG AGCAAAACAC CACCTGSGTA ATTGCAFTT
551  CTAAATAAAG TTGAGGATTC AGCCGAAACT GGAGAGGTCC TCTTTTAACT
601  TATTGAGTTC AACCCTTTAA TTTTAGCTTG AGTAGTCTA GTTTCGCCAA
651  ACTTAAGTTT ATCGACTTCT AAAATGTATF TAAGCTTTCT GGGGCAGGCC
701  AGGCTTGACC TTGGCTTTGG GGCAGGGAGG GGGCTAAGGT GAGGCAGGTG
751  GCGCCAGCCA GGTGCACACC CAATGCCCAT GAGCCCAGAC ACTGGACGCT
801  GAACCTCGCG GACAGTTAAG AACCAGGGG CCTCTGCGCC CTGGGCCAG
851  CTCTGTCCCA CACCGCGGTC ACATGGCACC ACCTCTCTTG CAGCCTCCAC
901  CAAGGGCCCA TGGGTCTTCC CCTTGGCACC CTCTTCCAAG AGCACCTCTG
951  GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCCAACC
1001 GTGACCGTGT CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT
1051 CCGGCTGTTC CTACAGTCTT CAGGACTCTA CTCTCTCAGC AGGTTGGTGA
1101 CCGTGCCTTC CAGCAGCTTG GGCACCCAGA CCTACATCTG CAACGTGAAT
1151 CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AGAGTTGGTG AGAGGCCAGC
1201 ACAGGGAGGG AGGGTGTCTG CTGGAAGCCA GGCTCAGGCG TCCTGCTTGG
1251 ACGCATCCCC GCTATGCAGT CCCAGTCCAG GGCAGCAAGG CAGGCCCCGT
1301 CTGCTCTTTC ACCCGAGGC CTCTGCCCCG CCCACTCATG CTCAGGGAGA
1351 GGGTCTTCTG GCTTTTTCCT CAGGCTCTGG GCAGGCACAG GCTAGGTGCC
1401 CCTAACCCAG GCCCTGCACA CAAAGGGGCA GGTGCTGGGC TCAGACCTGC
1451 CAACAGCCAT ATCCGGGAGG ACCCTGCCCC TGACCTAAGC CCACCCCAA
1501 GGCCAAACTC TCCACTCCCT CAGCTCGGAC ACCTTCTCTC CTCCCAGATT
1551 CCAGTAACTC CCAATCTTCT CTCTGCAGAG CCCAAATCTT GTGACAAAAC
1601 TCACACATGC CCACCGTGCC CAGGTAAGCC AGCCCAGGCC TCGCCCTCCA
1651 GCTCAAGGCG GGACAGGTGC CCTAGAGTAG CCTGCATCCA GGGACAGGCC
1701 CCAGCCGGGT GCTGACAGT CCACCTCCAT CTCTTCTTCA GCACCTGAAC
1751 TCCTGGGGGG ACCGTCAATC TTCCTCTTCC CCCCAAAACC CAAGGACACC
1801 CTCATGATCT CCGGACCCCC TGAGGTCACA TGCTTGGTGG TGGACGTGAG
1851 CCACGAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGAGG
1901 TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC
1951 CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCTGTCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA
2001 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
2051 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGTGGGACCC GTGGGGTGCG AGGGCCACAT
2101 GGACAGAGGC CGGCTCGGCC CACCCTCTGC CCTGAGAGTG ACCGCTGTAC
2151 CAACCTCTGT CCCTACAGGG CAGCCCCGAG AACCACAGGT GTACACCCCTG
2201 CCCCCATCCC GGGAGGAGAT GACCAAGAAC CAGGTCAGCC TGACCTGCTT
2251 GGTCAAAGGC TTCTATCCCA GCGACATCGC CGTGGAGTGG GAGAGCAATG
2301 GGCAGCCCGA GAACAACCTAC AAGACCACGC CTCCCCTGCT GGACTCCGAC
2351 GGTCTCTTCT TCCTCTATAG CAAGCTCACC GTGGACAAGA GCAGGTGGCA
2401 GCAGGGGAAC GTCTTCTCAT GCTCCGTGAT GCATGAGGCT CTGCACAACC
2451 ACTACACGCA GAAGAGCCTC TCCCTGTCCC CGGTTAAATG AGTGGGACGG

```


2501 CCGGCAAGCC CCGCTCCCC GGGCTCTCGC GGTCCACGA GGATGCTTGG
 2551 CACGTACCCC GTCTACATAC TTCCCAGGCA CCCAGCATGG AAATAAAGCA
 2601 CCCACCACTG CCCTGGGCCC CTGCGAGACT GTGATGGTTC TTTCCACGGG
 2651 TCAGGCGGAG TCTGAGGCTT GAGTGGCATG ACGGAGGCAG AGCGGGTCCC
 2701 ACTGTCOCCA CACTGGCCCA GGTGTGCGAG GTGTGCCTGG GCCGCCTAGG
 2751 GTGGGGCTCA GCCAGGGGCT GCCCTCGGCA GGTGGGGGA TTTGCCAGCG
 2801 TGGCCCTCCC TCCAGCAGCA GCTGCCCTGG GCTGGGCCAC GAGAAGCCCT
 2851 AGGAGCCCCT GGGGACAGAC ACACAGCCCC TGCTCTGTA GGAGACTGTC
 2901 CTGTCTGTG AGCGCCCTGT CCTCCGACCC CGATGCCAC TCGGGGGCAT
 2951 GCCTAGTCCA TGCGCGTAGG GACAGGCCCT CCTCACCCTA TCTACCCCCA
 3001 CGGCACTAAC CCCTGGCAGC CCTGCCCAGC CTCGCACCCG CATGGGGACA
 3051 CAACCGACTC CGGGGACATG CACTCTCGGG CCCTGTGGAG GGACTGGTGC
 3101 AGATGCCCAC ACACACACTC AGCCCAGACC CGTTCAACAA ACCCCGCACT
 3151 GAGGTTGGTC GAGCGGACTT GCGGCCAGAG CCTGCCTCGG CCCTCAGGGA
 3201 GGACTCCCGG GCTCACTCGA AGGAGGTGCC ACCATTTTCA CTTTGGTAGC
 3251 TTTTCTCTT CTTTAAATT TTCTAAAGCT CATTAAATTGT CTTTGATGTT
 3301 TCTTTTGTGA TGACAATAAA ATATCCTTTT TAAGTCTTGT ACTTCGTGAT
 3351 GGGAGCCGCC TTCTGTGTC CACGCGCCTC CTGCCCCCGG TGGGAAGCAC
 3401 GGTCAAGAGG AGGCTGGTCC AGCTGCACCT CGGGGGCTCC CTGCACTGGC
 3451 CCCCCGCTC CTGCAGCCAC ACGCATTTCC CGAGCGACCC TCCCTGGCCC
 3501 CTGTCACTAC ATGGACCCCT GGGGCTTCTC CTCTTTTCTA CATGGATGCA
 3551 GTTCTCTCTC CTGCTGGGCA CGGTGCTGCC TGCCCTGGTC ACTCTGCGGG
 3601 GGACAGGCCC TCCAGGGAAA GCTGGGTGGA GGCTGGGAGC TGGCTCAGGC
 3651 TGGCCAGGCA GAGCCACAGG GAGGCCCTTC CAGAACCAAC CATGGTCCGA
 3701 AGCGAGAGGT GGTGTGCGA TCCAGACATG ATAAGATACA TTGATGAGTT
 3751 TGGACAAACC ACAACTAGAA TGCAGTGAAA AAAATGCTTT ATTTGTGAAA
 3801 TTTGTGATGC TATTGCTTTA TTTGTAACCA TTATAAGCTG CAATAAACAA
 3851 GTTAACAACA ACAATTGCAT TCATTTTATG TTTCAGGTTT AGGGGGAGGT
 3901 GTGGGAGGTT TTTTAAAGCA AGTAAACCT CTACAAATGT GGTATGGCTG
 3951 ATTATGATCT CTAGTCAAGG CACTATACAT CAATAATTCC TTATTAACCC
 4001 CTTTACAAAT TAAAAAGCTA AAGGTACACA ATTTTGTAGC ATAGTTATTA
 4051 ATAGCAGACA CTCTATGCTT GTGTGGAGTA AGAAAAACA GTATGTTATG
 4101 ATTATAACTG TTATGCCTAC TTATAAAGGT TACAGAAAT TTTTCCATAA
 4151 TTTTCTGTGA TAGCAGTGCA GCTTTTCTCT TTGTGGTGTG AATAGCAAAG
 4201 CAAGCAAGAG TTCTATTACT AAACACAGCA TGAATCAAAA AACTTAGCAA
 4251 TTCTGAAGGA AAGTCCCTGG GGTCTTCTAC CTTTCTCTTC TTTTGTGGAG
 4301 GAGTAGAATG TTGAGAGTCA GCAGTAGCCT CATCATCACT AGATGGCATT
 4351 TCTTCTGAGC AAAACAGGTT TTCTCATTA AAGGCATTCC ACCACTGCTC
 4401 CCATTCATCA GTTCCATAGG TTGGAATCTA AATACACAA ACAATTAGAA
 4451 TCAGTAGTTT AACACATTAT ACACCTAAAA ATTTTATATT TACCTTAGAG
 4501 CFTTAAATCT CTGTAGGTAG TTTGTCCAAT TATGTCACAC CACAGAAGTA

4551 AGGTTCCCTTC ACAAAGATCC GGACCAAAGC GGCCATCCTG CCTCCCCACT
 4601 CCTGCAGTTC GGGGGCATGG ATGCGCGSAT AGCCGCTGCT GCTTTCCTGG
 4651 ATGCCGACGG ATTTGCACTG CCGGTAGAAC TCCGCGAGGT CGTCCAGCCT
 4701 CAGGCAGCAG CTGAACCAAC TCCCGAGGGG ATCGAGCCCC GGGTGGGCGA
 4751 AGAACTCCAG CATGAGATCC CCGCCTGGA GGATCATCCA GCCGGCGTCC
 4801 CGGAAAACGA TTCCGAAGCC CAACCTTTCA TAGAAGGCGG CGGTGGAATC
 4851 GAAATCTCGT GATGGCAGGT TGGGCGTCCG TTGGTCCGTC ATTTGGAACC
 4901 CCAGAGTCCC GCTCAGAAGA ACTCGTCAAG AAGGCGATAG AAGGCGATGC
 4951 GCTGCGAATC GGGAGCGGCG ATACCGTAAA GCACGAGGAA GCCGTCAGCC
 5001 CATTGCGCGC CAAGCTCTTC AGCAATATCA CGGGTAGCCA ACGCTATGTC
 5051 CTGATAGCGG TCCGCCACAC CCAGCCGGCC ACAGTCGATG AATCCAGAAA
 5101 AGCGGCCATT TTCCACCATG ATATTGGCA AGCAGGCATC GCCATGGGTC
 5151 ACGACGAGAT CCTCGCCGTC GGGCATGCGC GCCTTGAGCC TGGCGAACAG
 5201 TTCGGCTGGC GCGAGCCCTT GATGCTCTTC GTCCAGATCA TCCTGATCGA
 5251 CAAGACCGGC TTCCATCCGA GTACGTGCTC GCTCGATGCG ATGTTTCCCT
 5301 TGGTGGTCTA ATGGGCAGGT AGCCGGATCA AGCGTATGCA GCCGCCGCT
 5351 TGCATCAGCC ATGATGGATA CTTTCTCGGC AGGAGCAAGG TGAGATGACA
 5401 GGAGATCCTG CCCCGGCACT TCGCCCAATA GCAGCCAGTC CCTTCCCGCT
 5451 TCAGTGACAA CGTCGAGCAC AGCTGCGCAA GGAACGCCCC TCGTGGCCAG
 5501 CCACGATAGC CGCGCTGCCT CGTCCTGCAG TTCATTGAGG GCACCGGACA
 5551 GGTCGGTCTT GACAAAAAGA ACCGGGCGCC CCTGCGCTGA CAGCCGGAAC
 5601 ACCGCCGCAT CAGAGCAGCC GATTGTCTGT TGTGCCCAAT CATAGCCGAA
 5651 TAGCCTCTCC ACCCAAGCGG CCGGAGAACC TCGGTGCAAT CCATCTTGTT
 5701 CAATCATGCG AAACGATCCT CATCCTGTCT CTTGATCAGA TCTTGATCCC
 5751 CTGCGCCATC AGATCCTTGG CCGCAAGAAA GCCATCCAGT TTACTTTGCA
 5801 GGGCTTCCCA ACCTTACCAG AGGGCGCCCC AGCTGGCAAT TCCGGTTGCG
 5851 TTGCTGTCCA TAAAACCGCC CAGTCTAGCT ATCGCCATGT AAGCCCACAG
 5901 CAAGCTACCT GCTTTCTCTT TCGCCTTGGG TTTTCCCTTG TCCAGATAGC
 5951 CCAGTAGCTG ACATTCATCC GGGGTCAGCA CCGTTTCTGC GGA CTGGCTT
 6001 TCTACGTGTT CCGCTTCCTT TAGCAGCCCT TCGGCCCTGA GTGCTTGGCG
 6051 CAGCGTGAAG CTTTTTGCAA AAGCCTAGGC CTCCAAAAAA GCCTCCTCAC
 6101 TACTTCTGGA ATAGCTCAGA GCGCGAGGCG GCCTCGGCCT CTGCATAAAT
 6151 AAAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGGCGGAGA ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG
 6201 TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGACTATGGT TGCTGACTAA
 6251 TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGGGACTT
 6301 TCCACACCTG GTTGCTGACT AATTGAGATG CATGCTTTGC ATACTTCTGC
 6351 CTGCTGGGGA GCCTGGGGAC TTTCCACACC CTAAGTGACA CACATTCAC
 6401 AGCTGCTTCG CGCGTTTCGG TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA
 6451 GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA AGCGGATGCC GGGAGCAGAC
 6501 AAGCCCTTCA GGGCGCTCA GCGGTGTTG GCGGGTGTG GGGCGCAGCC
 6551 ATGACCCAGT CACGTAGCGA TAGCGGAGTG TATACTGGCT TAACTATGCG

6601 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC
 6651 GCACAGATGC GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGGCGCTCT TCGCTTCCT
 6701 CGCTCACTGA CTCGCTGCSG TCGGTCGTTT GGCTGCGGCG AGCGGTATCA
 6751 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
 6801 AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
 6851 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT
 6901 CACAAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
 6951 AAGATACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTCCGC TCTCTGTTC
 7001 CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTCTCCCC TTCGGGAAGC
 7051 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CCGTCTAGGT
 7101 CGTTGCGTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
 7151 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC
 7201 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
 7251 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
 7301 ACACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
 7351 TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA CCACCGCTGG
 7401 TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG
 7451 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG
 7501 AACGAAACT CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAGGAT
 7551 CTTCACTAG ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTAAAT TCAATCTAAA
 7601 GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG
 7651 GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT
 7701 CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA
 7751 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA
 7801 GCAATAAACC AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAAGT GTCCTGCAAC
 7851 TTTATCCGCC TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCCCGAA GCTAGAGTAA
 7901 GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTGCAGGC
 7951 ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC
 8001 CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG
 8051 TTAGCTCCTT CGGTCTCTCC ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GCGCCGAGTG
 8101 TTATCACTCA TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCAATGCC
 8151 ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG TGA CTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATYCT
 8201 GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCCGC GTCAACACGG
 8251 GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA
 8301 ACGTCTTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA
 8351 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT
 8401 TTCACCAGCG TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA
 8451 AAAGGGAATA AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT
 8501 TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC
 8551 ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC CGCGCACATT
 8601 TCCCCGAAAA GTGCCACCTG ACGTCTAAGA AACCATTATT ATCTGACAT

```

8651 TAACCTATAA AARTAGGCGT ATCACSAGGC CCTTTCGTCT TCAAGAATTC
8701 GAGCTCGGTA CCCATCAGCC AAAAAGCATG CCTGCCACAC AACATCAATT
8751 TCTGGAAAAC GCTACACTTA ATTATTTCTA GTAGAACAGC TCTTTGGTTY
8801 GCCAAAAAGA ATCACCTATA GTGGCATCTA AGCACAAAAA GGAGAAAAAA
8851 ATCACAAAGA AATGATTGAG AGGCATAATA AAAATTATCA AAAAATTATG
8901 AGTTTTACGA TTTCATCTTT TTCCAAGTTG AAATCATAGG GTGGCTTTAA
8951 CACAGTGACA AGGAATGTGC ATGCTGCCAT TATGGTGCCT TGCCTAAAT
9001 GGTGGAGGCC TTGTCTGCT ACAGAGAAAC TGTCTACAG CAGGGGGTGC
9051 CAAATTTCCA TATTTTTTTA TATCATTGAG CAGGTGCACA GAAGACCAGA
9101 AAGCACTTTC TATCAGGCTG GCCTTCCTCT TCCTTTCCAG TATGAAGCAA
9151 AAAGTGCCTA TGAACTAGC AATTGTTAAA TTCCTTTTTC AAACAGTATT
9201 TGTGCTATCA GAACATAGTG CATTCAAAAG TCTAGCCTGA GAGAACAACC
9251 CAGTTTTATT CATTCCTCCT ACTACCTCTC TCATTCCCAC TGYTTGTGTT
9301 CTCCCTCCCA TTTTAATTGT CTATCTAGTC CAAACTAAGC ACACGATCCA
9351 GTCCACATTA AACACATGT TTTCACTTTA AGTCAAATAC AAGACACCTT
9401 TAATATCAGC CCTTGTTTAT AATCGTGCTT CTAGTGACTT AATGTACATG
9451 TCACACTGTA CTGTTGGGTT TTGTGTCTCA TCATGAACAA TGTGTGAAG
9501 GTATTAAGTG GAGAGTAAGC AGAATTAGAT TCCTCTAATG ATGCACACCC
9551 AACTAAGAG CAGAAATAAT ATTAAAAATA GAAAAAAAAG TTTTACATGA
9601 GATTTCAAAT ACCCAGGTAT GAGCTGCAGT TTCTTCAAGT TAAAGCATCG
9651 AGGTTGTCAG TTACACTATT ACAGGAAACA TATGCAGAGT TTTTATTTTA
9701 GTATATTAGT TTTCACATAT GTGGAATTAC TATTAACTA TTCTTTCTTT
9751 TCAAATGCTT ACCATTGTAA ATGAGTTTGT GACTTTGTGT AGGTGAGTGC
9801 ACATGACTCT GGATGCCATA GAGGACTGAA GAAGTTGAG TTATAGGTAG
9851 TTTTATTCTA CTTGACTGTT CAGTGCTAAA AATACAACTG AGGTCTTTTA
9901 AACTGCTGTT CATGAACCTC TTAATTGATA TATCTCATGA GATCTCTAAA
9951 CTATTTTTAT TATGACACGT TTCACCATTT TCACTGTAA CATTTTTTATG
10001 TTTTATATTA ATGTAACTAT ATGACACTTC CCAAAATCCC CATATTCACA
10051 ATTGAACTGT TTCAAGTTT TACCTTGACT TATGGGAAAT GAAACCCAC
10101 ATTTTATAAT TTAAATATGA AATGTTTATP TTATATTTCT GCAAATTTCA
10151 CAAGGAAAGA TTAGTCACTG GTGTGTGAGA GCAGAGGAGC ATAAGAGTTC
10201 AGGAATAGAA TCCATTATGA TTCTGGAGGC AAGGAAGAAC TGATGCCAAG
10251 GTTTCAGTAT AAGAGCAGTA TCCACTGGAA AGGATAAAGT CACTACATCT
10301 GAGCACAGAG CAGGACATCT ACATAATGAG TGGTCACTAA TGGGCCACTG
10351 TTACACTGTT ATATGTATAA GGCTCAAGAA TGAGCACTGA GGCTGTAAAG
10401 TGTATGGGTG AGGACATCAG GATGTAAACC CAGCTCAGGT AGAGGACTCA
10451 GAGGACAGCA CAGTCAGCAT GAACTAATAA ACATCAGATA AGATAAGGCA
10501 CAAGCTCAGC TATATAGGCT AAGGGATCTT TGTAAATCTG ATTGTGCATC
10551 CAGTCTAGTT CAATGTGACT TAGGAAGCCC AGTCATATGC AAATCTAGAG
10601 AAGACTTTAG AGTAGAAATC TGAGGCTCAC CTCACATACC AGCAAGCGAG
10651 TGACCAGTTA GTCTTAAGGC ACCACTTCTT AGACATCATG GCTTGGGTGT

```

```

10701  GGACCTTGCC ATTCTGATG GCAGCTGCCC AAAGTAAGAC ATCAGAAAAA
10751  AGAGTTCCAA GGGGAATTGA AGCAGTTCCA TGAATACTCA CCTTCCTGTG
10801  TTCTTTTCAC AGGTGTCCAG GCACAGGTGC AGCTGGTGGA GTCAGGAGCC
10851  GAAGTGAAAA AGCCTGGGGC TTCAGTGAAG GTGTCTTSCA AGGCTCTGG
10901  ATACACATTC ACTAATTATA TTATCCACTG GGTGAAGCAG GAGCCTGGTC
10951  AGGGCCTTGA ATGGATTGGA TATTTTAATC CTTACAATCA TGGTACTAAG
11001  TACAATGAGA AGTTCAAAGG CAGGGCCACA CTAAGTGCAA ACAAAATCCAT
11051  CAGCACAGCC TACATGGAGC TCAGCAGCCT GCGCTCTGAG GACACTGCGG
11101  TCTACTACTG TGCAAGATCA GGACCTTATG CCTGGTTTGA CACCTGGGGC
11151  CAAGGGACCA CGGTACCCGT CTCCTCAGGT AAGAATGGCC ACTCTAGGGC
11201  CTTTGTTTTC TGCTGCTGCC TGTGGGATTT CATGAGCATT GCAAAGTTGT
11251  CCTCGGGACA TGTTCCGAGG GGACCTGGGC GGACTGGCCA GGAGGGGACG
11301  GGCACCTGGG TGCCTTGAGG ATCTGGGAGC CTCTGTGGAT TTTCOGATGC
11351  CTTTGGAAAA TGGGACTGAG GTTGGGTGCG TCTGAGACAG TAACTCAGCC
11401  TGGGGGCTTG GTGAAGATCG CCGCACAGCA GCGAGTCCGT GAAATATCTT
11451  ATTTAGACTT GTGAGGTGCG CTGTGTGTCA ATTTACATCT TAAATCCTTT
11501  ATTGCTTGA AAGAGAATTG TTGGAGTGGG TGAATCCAGC CAGGAGGGAC
11551  GCGGGGGGAT CCA

```

Exemplo 9: Eficácia in vitro de anticorpos humanizados de ligação a CD45RO/RB

VHE/humV1 e VHQ/humV1

Para determinar a eficácia dos anticorpos humanizados de ligação a CD45RO/RB VHE/humV1 e VHQ/humV1 em comparação com o anticorpo quimérico, a capacidade para induzir apoptose nas células T humanas e também é analisada a capacidade para inibir proliferação de células T humanas.

Células e reagentes

As células mononucleares de sangue periférico (PBMC) são isoladas de amostras de leucoferese de doadores

humanos saudáveis com tipo de sangue conhecido, mas tipo de HLA desconhecido, por centrifugação em Ficoll-Hypaque (Pharmacia LKB). As PBMC utilizadas como estimuladores são primeiro diminuídos em células T e NK utilizando esferas ferromagnéticas revestidas com CD3 (Miltenyi). As esferas e as células contaminantes são removidas através de campo magnético. As PBMC com células T diminuídas são utilizadas como células estimuladoras após irradiação (50 Gy). As células T CD4⁺ são utilizadas como células responsivas em MLR e são isoladas de PBMC com um kit de selecção negativa de células T CD4 (Miltenyi).

As células obtidas são analisadas através de FACScan ou FACSCalibur (Becton Dickinson & Co., CA) e a pureza das células obtidas é >75%. As células são suspensas em meio RPMI1640lina, estreptomicina e L-glutamina.

Ensaio de Apoptose

As PBMC humanas de três dadores saudáveis voluntários são cultivadas em meio de crescimento (RPMI1640+10%FCS) durante a noite (<16h) na presença de mAb quimérico de ligação a CD45R0/RB, anticorpos humanizados (VHE/humV1 e VHQ/humV1) ou mAb anti-LPS controlo. Se indicado, é incluído um reagente de reticulação, fragmento F(ab')₂ de anti-IgG humano de cabra (Cat.Nº 109-006-098, JacksonLab) a uma concentração de µg/mL que é duas vezes maior do que a das concentrações de anticorpos a anti-CD45 das amostras. A concentração de PBS em todos os poços introduzidos pelos

reagentes de anticorpo é mantida constante em todas as amostras, nomeadamente a 20% (v/v) para amostras sem agente de ligação reticulada ou a 40% (v/v) para amostras com agente de ligação reticulada. As experiências anteriores demonstram que a quantidade de PBS não afecta a leitura.

Após cultura durante a noite na presença dos anticorpos, as amostras são sujeitas a análises de citometria de fluxo e coradas com o marcador de apoptose Anexina V-FITC (Cat.Nº 556419, BD/Pharmlngen) e o marcador de células T CD2-PE (Cat.Nº 556609, BD/Pharmlngen). As amostras são separadas num instrumento Becton Dickinson FACSCalibur e os dados são analisados utilizando o CellQuest Pro Software.

A partir dos dados recolhidos, as curvas são ajustadas utilizando o programa de computador Origin v7.0300 A equação utilizada para ajustar é

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^n} + A_2 \quad (\text{"Sigmoid-Logistic"})$$

A1: valor final (para ajuste de sessões marcadas para "partilhadas" e "flutuantes")

A2: valor inicial (para ajuste de sessões marcadas para "partilhadas" e "flutuantes")

p: potência

X0: ED₅₀; IC₅₀ (ver a seguir).

Na ausência de agente de ligação reticulada, VHE/humV1 é mais eficaz, com um valor de ED₅₀ de 14871 nM, seguidos por VHQ/humV1 com 377219 nM. O anticorpo quimérico de ligação a CD45R0/RB é menos eficaz com um valor ED₅₀ de 24401205 nM.

Na presença de um anti-soro agente de ligação reticulada, os valores de ED₅₀ são ajustados dramaticamente para uma maior eficácia em pelo menos duas ordens de magnitude. Adicionalmente, a presença de agente de ligação reticulada permitiu níveis superiores de apoptose a concentrações de anticorpo muito elevadas, atingindo até 80%, enquanto a ausência de agente de ligação reticulada permitiu apenas até 50% de apoptose. Na presença de agente de ligação reticulada, as curvas (concentração de anticorpo/% de apoptose) são bi-modais com dois patamares: o primeiro patamar é atingido com baixas concentrações de anticorpo (~5~nM), enquanto nível de apoptose corresponde ao nível máximo obtido na ausência de agente de ligação reticulada. O segundo patamar é atingido com concentrações elevadas de anticorpo (~500 nM) e a apoptose é observada no intervalo de 70-80% da população de células T.

Ambos os mAb humanizados de ligação a CD45R0/RB são igualmente eficazes e melhores ou iguais no que

respeita à sua capacidade para induzir apoptose nas células T humanas primárias.

Ensaaios de Reacções mistas de Linfócitos

Um $\times 10^5$ PBMC ou 5×10^4 de células CD4+ são misturadas com 1×10^5 ou 5×10^4 PBMC reduzidas em células T irradiadas (50 Gy) em cada poço de placas de cultura de 96 poços na presença ou ausência das diferentes concentrações de mAb.

As células misturadas são cultivadas durante 5 dias e a proliferação é determinada por pulso das células com ^3H -timidina durante as últimas 16-20 horas de cultura. A inibição de MLR a cada concentração de anticorpo é expressa como uma percentagem de inibição como descrito no exemplo 2.

O efeito do aumento das concentrações de VHE/humV1 e VHQ/humV1 em MLR é avaliado em respostas a três combinações de estimuladores. Todos os anticorpos inibem a MLR de uma forma dependente da dose. Os valores de IC_{50} (ver acima) são semelhantes para os Ab humanizados VHE/humV1 (7 ± 7 nM) e VHQ/humV1 (39 ± 54 nM). Ambos os anticorpos humanizados são mais potentes na inibição de MLR do que o anticorpo quimérico parental (IC_{50} de 347 ± 434 nM). Como é normalmente observado com as experiências com MLR, a variabilidade do dador é elevada nestas experiências.

VHE-N73D/humV1

Para dirigir o efeito biológico da apoptose induzida por VHE-N73D/humV1 em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC), as PBMC alvo são incubadas durante a noite na presença de várias concentrações de VHE-N73D/humV1 e são subsequentemente analisadas para ligação do marcador de apoptose Anexina V através de análise de citometria de fluxo: As PBMC humanas são incubadas durante a noite em 1 mL de meio de cultura de tecido contendo várias concentrações de VHE-N73D/humV1, ou outra molécula variante de ligação a CD45RO/RB humanizada, VHE/humV1, ou mAb anti-CD45RO/RB quimérico ou os fragmentos F(ab')₂ anti-Fc de Ig humana de cabra de ligação reticulada a 2x a concentração de massa de cada mAb são adicionados, mimando a ligação reticulada do anticorpo humanizado CD45RO/RB através de receptores Fc, que podem ocorrer *in vivo*. No dia seguinte, as células são lavadas por centrifugação durante 10 min a 400 vezes a força da gravidade convencional (g) e o meio é removido. As células são ressuspensas em tampão FACS (PBS contendo 1% v/v de FBS, 0,1 % p/v de EDTA e 0,1% p/v de azida de sódio) e semeadas em placas de microtitulação de 96 poços em V a uma densidade celular de 1×10^5 células por poço. Cada amostra de células é incubada durante 30 minutos a 4 °C em 50 µL de tampão FACS contendo 100 µg/mL de soro normal de ratinho para bloquear sítios de ligação não específicos em células e com CD2 conjugado com ficoeritrina (PE) para identificar células T humanas. Após lavagem duas vezes por centrifugação, as células são

ressuspensas em 100 μ L de tampão de coloração de Anexina V proficiente em cálcio (Vendedor do kit BD/Pharmingen 556419) contendo 1:100 v/v de Anexina V marcada com FITC. Após incubação durante 15 minutos à temperatura ambiente no escuro, é adicionada 7-aminoactinomicina D (7-AAD) para produzir uma concentração final de 1 μ g/mL e analisada utilizando um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson). Os valores de ED_{50} para a eficácia dos anticorpos em induzir apoptose podem ser calculados a partir de uma análise da quantidade de apoptose (= intensidade da fluorescência de Anexina V-FITCe) induzidos como uma função da concentração de anticorpo utilizando o programa de computador Origin 7.5 com uma equação da curva de ajuste Sigmoidal/Logistic.

Após estas análises, é observado um efeito bifásico de todos os anticorpos humanizados CD45RO/RB testados: a baixas concentrações de anticorpo, encontra-se um nível baixo inferior a 30% de apoptose de células T. O valor de ED_{50} para atingir este nível de apoptose é calculado como $0,31 \pm 0,13$ nM para VHE-N73D/humV1. A maiores concentrações de anticorpo, a apoptose pode ser induzida até 70% das células T. O valor de ED_{50} para atingir este nível superior de apoptose é calculado como 352 ± 83 nM para VHE-N73D/humV1. Resumidamente, verifica-se que VHE-N73D/humV1 também induz apoptose nas células T humanas, que pode ser estimulada por ligação reticulada

Exemplo 10: Especificidade da molécula de ligação
CD45RB/RO

Molécula de ligação quimérica CD45RB/RO

A molécula CD45 é expressa em todos os leucócitos. Todavia, diferentes isoformas são expressas pelos vários subconjuntos de leucócitos. De modo a determinar a reactividade do subconjunto de leucócitos da molécula de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO foi efectuada a marcação imunofluorescente de leucócitos humanos com marcadores específicos de subconjuntos e marcação imunofluorescente simultânea com um anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO conjugado com um corante, seguido por análise de citometria de fluxo.

Resumidamente, os subconjuntos específicos de uma preparação isolada de fresco de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC), plaquetas humanas, neutrófilos do sangue periférico humano ou células estaminais hematopoiéticas derivadas de medula óssea humana são identificadas por incubação com anticorpos contra CD2 acoplados a ficoeritrina (linfócitos T), CD14 (monócitos), CD19 (B linfócitos), CD34 (células estaminais), CD42a (plaquetas), CD56 (células killer naturais) ou CD66b (granulócitos). A ligação simultânea de uma molécula de ligação quimérica CD45RB/RO marcada com FITCc é detectada em linfócitos T, monócitos, células estaminais, células killer naturais e granulócitos, mas não em plaquetas ou linfócitos B.

VHE-N73D/humV1

De modo a determinar a reactividade do subconjunto de leucócitos é efectuada a marcação imunofluorescente com VHE-N73D/humV1 de leucócitos humanos com marcadores específicos de subconjuntos e marcação imunofluorescente simultânea com um VHEN73D/humV1 conjugado com um corante, seguido por análise de citometria de fluxo.

Resumidamente, subconjuntos específicos de uma preparação isolada de fresco de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) ou neutrófilos humanos de sangue periférico são identificados após incubação com anticorpos contra CD3, CD4, CD8 acoplados com ficoeritrina (linfócitos T), CD14 (monócitos), CD16 (células killer naturais e monócitos), CD19 (linfócitos B), ou CD66b (granulócitos). A ligação simultânea de um VHE-N73D/humV1 marcados com FITC é detectada em linfócitos T, monócitos, células killer naturais e granulócitos, mas não em linfócitos B. Deste modo, as moléculas VHE-N73D/humV1 não reagem com linfócitos B humanos.

Exemplo 11: Indução *in vitro* de células T supressoras (células T reguladoras) e de células T funcionalmente paralisadas

Para demonstrar a capacidade de um anticorpo quimérico de ligação a CD45RO/RB induzir células T

supressoras, o anticorpo é incluído a várias concentrações durante a produção de linhas de células T CD8+ com a proteína 1 (MP1) da matriz de antigénio de *Hemophilus influenza*. Estas linhas são produzidas através de co-cultura repetida de linfócitos CD8+ humanos com monócitos CD14+ humanos pulsados com o antigénio. Mais tarde, os monócitos CD14+ podem ser substituídos por uma linha de células positiva para antigénio-2 de leucócitos humanos como uma célula apresentadora de antigénio MP1 (APC). Se estas células T CD8+ específicas para MP1 de uma cultura incluindo o anticorpo quimérico de ligação CD45RO/RB são misturados com células T CD8+ humanas isoladas de fresco e esta mistura de células é estimulada com o antigénio MP1 em APC, a adição de células T CD8+ a partir da cultura na presença da molécula de ligação a CD45RO/RB é capaz de reduzir a produção de IFN- γ de uma forma dependente da dose de anticorpo. Não existe ligação de anticorpo quimérico CD45RO/RB durante esta cultura do ensaio de IFN- γ , indicando que o pré-tratamento com o mAb CD45RO/RB induziu células T CD8+ capazes de suprimir a activação de células T isoladas de fresco. Devido a esta indução das células T supressoras reguladoras pelo anticorpo quimérico de ligação a CD45RO/RB, o anticorpo pode ser útil em doenças, em que se pensa que uma população de células T desregulada e/ou activada contribuiu para a patologia do problema. Os exemplos destas doenças incluem doenças autoimunes, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada e alergias.

Para demonstrar a capacidade de uma molécula quimérica de ligação a CD45RO/RB tornar células T hiporresponsivas (anérgicas) a estimulação adicional, *i.e.*, a paralisar funcionalmente células T, o anticorpo é incluído durante a produção de linhas de células T CD8+ reactivas com a proteína 1 da matriz (MP1) de antigénio de *Hemophilus influenza* como apresentado acima. A paralise é avaliada pela activação de células T (expostas antes a anticorpo quimérico de ligação a CD45RO/RB) com o antigénio MP1 apresentado por APC. Não existem moléculas de ligação a CD45RO/RB nesta cultura. As células T CD8+ não expostas a anticorpo quimérico de ligação a CD45RO/RB produzem previamente IFN- γ após o estímulo mencionado. Em contraste, as células T CD8+ pré-tratadas com anticorpo quimérico de ligação a CD45RO/RB apresentam uma produção marcadamente reduzida a inexistente desta citocina em resposta ao estímulo do antigénio, demonstrando a capacidade do anticorpo quimérico de ligação a CD45RO/RB funcionalmente paralisar células T humanas. Devido a esta indução de hiporresposta funcional de células T pela molécula de ligação CD45RO/RB, o anticorpo pode ser utilizado em doenças, tais como doenças autoimunitárias, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença da bexiga inflamada ou alergias, em que se pensa que uma população de células T activadas contribui para a patologia.

Exemplo 12: Estudos *in vivo* em pele de ratinhos

SCID-hu

O benefício terapêutico do anticorpo quimérico de

ligação CD45RB/RO na inflamação da pele é testado utilizando ratinhos SCID. A pele humana de indivíduos normais é transplantada para ratinhos SCID (SCID-hu Skin) e o processo inflamatório é mimado através da transferência adoptiva de leucócitos mononucleares isolados a partir de indivíduos humanos não relacionados com a pele humana dadora. O transplante da pele de adulto humano em ratinhos SCID (ratinhos SCID-hu Skin)

Dois pequenos pedaços (1 cm²) de pele de adulto humano (obtida de West Hungarian Regional Tissue Bank; WHRTB, Gyor) consistindo em epiderme total, a derme papilar e parte da derme reticular, são transplantados nos lados direito e esquerdo da parte traseira de ratinhos SCID C.B 17/ratinhos GbmsTac-P rkdscid Lystbg (Taconic, Germantown, NY) em substituição da pele de ratinhos. A qualidade dos enxertos é monitorizada durante 5-6 semanas seguindo pelo transplante e os ratinhos transplantados com sucesso (ratinhos SCID-hu Skin, geralmente >85%) são seleccionados para teste *in vivo* do anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO.

Enxerto de células mononucleares humanas em ratinhos SCID

Os leucócitos mononucleares (Spl) são isolados de biopsias de baço de adulto humano (WHRTB, Gyor) após suspensão celular (utilizando uma peneira de dissociação celular equipada com uma malha de tamanho 50) e procedi-

mentos de gradiente de densidade convencionais. As alíquotas de $\sim 5 \times 10^8$ Os Spl são ressuspensos em 1,5 mL de RPMI-10% FCS e injectados intraperitonealmente (i.p.), no dia experimental 0, nos ratinhos SCID-hu Skin. Estes números de Spl foram encontrados em experiências anteriores como sendo suficientes para induzir xeno-GvHD letal em >90% dos ratinhos em 4-6 semanas após transferência de células.

Tratamento com anticorpo de ratinhos SCID-hu Skin

Os ratinhos SCID-hu Skin, reconstituídos com Spl humano, são tratados com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO ou com mAb controlo anti-LPS no dia 0, imediatamente após a injeção de células mononucleares, nos dias 3 e 7 e depois a intervalos semanais. Os anticorpos são distribuídos subcutaneamente (s.c.) em 100 μ L de PBS a uma concentração final de 1 mg/kg de peso corporal (p.c.).

Avaliação do tratamento com anti-CD45

A eficácia de anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO é avaliada através da sobrevivência dos ratinhos transplantados e através da monitorização da rejeição dos enxertos de pele. A significância dos resultados é avaliada pelo método estatístico de análise de sobrevivência utilizando o teste Log-rank (método de Mantel) com o auxílio do programa Systat v10. no final das biopsias experimentais de enxerto de pele húmidos de ratinhos sacrificados para propósitos histológicos. Todos os ratinhos são

pesados no início (antes da transferência de células) e ao longo da experiência (em cada dois dias) como estimativa indirecta do seu estado de saúde. As linhas de regressão linear são produzidas utilizando o peso corporal versus valores dos dias pós-transferência de PBMC obtidas de cada ratinho e subsequentemente, os seus declives (ratinhos de controlo versus ratinhos tratados com anti-CD45) são comparados utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Resultados

Os enxertos de pele humana são muito bem tolerados pelos ratinhos SCID. Inicialmente, os enxertos sofrem um período de hiperproliferação de queratinócitos resultando na formação de crostas hiperqueratócicas. Cerca de 5 semanas após o transplante, as crostas caem dos enxertos e revelam um tecido contendo todas as estruturas características observadas em pele humana normal. Durante este processo, os enxertos de pele humana fundem-se com a pele de ratinho adjacente e produz uma rede de vasos humanos de crescimento recente que ligam os enxertos com o tecido de ratinho subjacente. Os Spl circulantes humanos transferidos para os ratinhos SCID-hu Skin (no dia experimental 0, aprox. 6 semanas após transplante de pele) infiltram os enxertos de pele e após reconhecimento de moléculas de aloantígeno expressas na pele humana montam uma resposta inflamatória que tem semelhanças com o processo inflamatório da pele que ocorre na pele psoriática, e que em alguns casos destroem completamente o enxerto.

O tratamento destes ratinhos com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO suprime o processo inflamatório e evita a rejeição dos enxertos da pele humana. Em contraste, a amostra obtida dos ratinhos tratados de controlo apresenta uma infiltração massiva com sinais múltiplos de necrose e uma dramática destruição da epiderme. Este processo é facilmente monitorizado à vista e documentado por simples fotografia dos ratinhos.

Seis de seis ratinhos SCID-hu Skin para os quais foram transferidos Spl alogeneicos humanos e tratados com mAb anti-LPS de controlo apresentam uma forte resposta inflamatória claramente visível à vista 23 dias após a transferência de células mononucleares. Todos os ratinhos apresentam lesões consideráveis, incluindo eritema, pústulas à escala e pronunciadas. Em contraste, os enxertos de pele de todos os ratinhos tratados com anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO possuíam uma aparência normal. As dramáticas diferenças entre os dois grupos de ratinhos é especificamente devida ao tratamento com anticorpo uma vez que a pele humana de todos os ratinhos tem uma aparência idêntica à do início da experiência. Este aspecto não é alterado até a segunda semana após a transferência das células, altura em que o grupo controlo começou a desenvolver lesões de pele. A experiência é terminada no dia 34 após transferência de células mononucleares. Por essa altura, um dos ratinhos controlo estava já morto (dia 30) e quatro outros são sacrificados

(dias 27, 27, 27 e 30) devido a uma forte xeno-GvHD. As reacções patológicas observadas nos ratinhos tratados com o anticorpo controlo também correlacionam com a perda de peso corporal nestes animais.

Em contraste, o grupo tratado com o anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO apresenta um estado de saúde durante todo o tempo da experiência.

Exemplo 13: Actividades in vivo de um anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO num modelo de transplante de células de ilhéu humanas

Ratinhos

Ratinhos fêmeas NOD/SCID (Charles River Laboratories, Calco, Itália) são mantidos sob condições específicas de isenção de patogénicos. O nível de glucose no sangue venoso da cauda é quantificado utilizando o sistema Glucometer Elite (Bayer, Alemanha). A diabetes é induzida nos ratinhos NOD/SCID através de uma injeção intravenosa de 180 mg/kg de estreptozotocina (Sigma, St.Luis, MO). Um diagnóstico de diabetes é feito após 2 medições consecutivas de glucose superior a 250 mg/dL.

Preparações e transplantes

São obtidos pâncreas a partir de dadores multi-órgão cadavéricos com o coração a bater. Os ilhéus são

isolados de acordo com o método descrito em Bertuzzi *et al.*, *Diabetes*, 1999, 48: 1971-8. Os ilhéus purificados são cultivados em frascos estéreis contendo 25 mL de meio M199 (Seromed Biochrom, Berlim, Alemanha) suplementado com 10% de FCS, 1% de L-glutamina, 100 unidades/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (meio completo). Os ilhéus são incubados a 30° em 5% de CO₂ e 95% de ar humidificado. Os ratinhos são anestesiados com uma injeção intraperitoneal de avertina e alíquotas de 1500 IE de ilhéus humanos são transplantados sob a cápsula de rim de ratinhos NOD/SCID diabéticos receptores como descrito em Davalli A.M. *et al.*, *Diabetes*, 1996, 45: 1161-7. Após transplante, 50x10⁶ PBMC isoladas de fresco são injectadas intraperitonealmente em ratinhos NOD/SCID.

Tratamento de ratinhos transplantados

Ratinhos transplantados Hu-PBL-NOD/SCID são tratados s.c. no dia 0, +3 e +5 com 1 mg/kg de um anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO. Os ratinhos de controlo são tratados com solução salina ou com mAb IgG purificado (Vinci.Biochem, Itália).

Análise Histológica

Os pólos de rim contendo enxertos de ilhéus humanos são congelados por imersão em Tissue Tek (Miles Lab., IN) e armazenados a -70°. Secções congeladas de 5 µm de espessura são coradas com mAb biotinilado contra

insulina humana ou CD3 humano seguido por conjugado de estreptavidina-peroxidase. É utilizada diaminobenzidina (DAKO, Carpinteria, CA) como cromogénio e hematoxilina como contrastante. A infiltração de linfócitos nos enxertos é avaliada em secções congeladas coradas com hematoxilina e eosina.

Resultados

Ratinhos normais NOD/SCID transplantados com ilhéus humanos permanecem normoglicémicos até 100 dias pós-transplante, enquanto o tempo médio de rejeição de ratinhos hu-PBL-NOD/SCID transplantados com ilhéus humanos é de 3513 dias. O tratamento curto de ratinhos hu-PBL-NOD/SCID transplantados com ilhéus humanos com um mAb da presente invenção prolonga significativamente a sobrevivência de ilhéus humanos com uma taxa de sobrevivência de >70% ao dia 60 e 50% ao dia 100 pós-transplante.

A análise histológica dos enxertos de ilhéu humano realizada 100 dias pós-transplante em ratinhos hu-PBL-NOD/SCID apresenta uma massiva infiltração de células T positivas para CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ em ratinhos receptores de controlo. Em contraste, nos ratinhos receptores tratados com um anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO é observada uma infiltração significativamente mais baixa do que a das células humanas. A coloração positiva para insulina demonstra que o enxerto funciona nos ratinhos hu-PBL-NOD/SCID receptores tratados com um anticorpo quimérico

de ligação a CD45RB/RO em comparação com ratinhos receptores de controlo. Em ratinhos transplantados com ilhéus e tratados com um anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO hu-PBL-NOD/SCID são detectadas baixas quantidades de IFN- γ humana no soro em comparação com os ratinhos receptores de controlo.

Estes dados indicam que o tratamento a curto prazo com um anticorpo quimérico de ligação a CD45RB/RO leva a uma sobrevivência prolongada do aloenxerto em ilhéu humano evitando a infiltração do enxerto e inibindo a tracção de rejeição mediada por leucócitos *in vivo*.

Lisboa, 4 de Maio de 2010

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo humanizado possuindo especificidade de ligação para ambos CD45RO e CD45RB compreendendo a região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°: 31 ou 32 e a região variável da cadeia leve de SEQ ID N°: 7 ou SEQ ID N°: 8.

2. Anticorpo humanizado da reivindicação 1 possuindo especificidade de ligação para CDR45RO e CD45RB compreendendo:

- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°: 31 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°: 7,
- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°: 31 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°: 8,
- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°: 32 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°: 7, ou
- uma região variável da cadeia pesada de SEQ ID N°: 32 e uma região variável da cadeia leve de SEQ ID N°: 8.

3. Polinucleótidos isolados que codificam o anticorpo humanizado das reivindicações 1 ou 2.

4. Vector de expressão compreendendo os polinucleótidos das reivindicações 3, vector este que é capaz

de produzir um anticorpo humanizado quando o referido vector está presente numa célula hospedeira compatível.

5. Célula hospedeira isolada que compreende um vector de expressão da reivindicação 4.

6. Anticorpo humanizado das reivindicações 1 ou 2 para utilização como um fármaco.

7. Anticorpo da reivindicação 6 para utilização no tratamento e/ou profilaxia de doenças autoimunitárias, rejeição de transplante, psoríase, dermatite, doença inflamatória do intestino e/ou alergias.

8. Anticorpo da reivindicação 7 no tratamento e/ou profilaxia de enxerto versus doença do hospedeiro (GVHD).

9. Anticorpo da reivindicação 7 na preparação de um medicamento para tratamento de rejeição de transplante de células do ilhéu pancreático.

10. Composição farmacêutica compreendendo o anticorpo da reivindicação 1 ou 2 em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

Lisboa, 4 de Maio de 2010

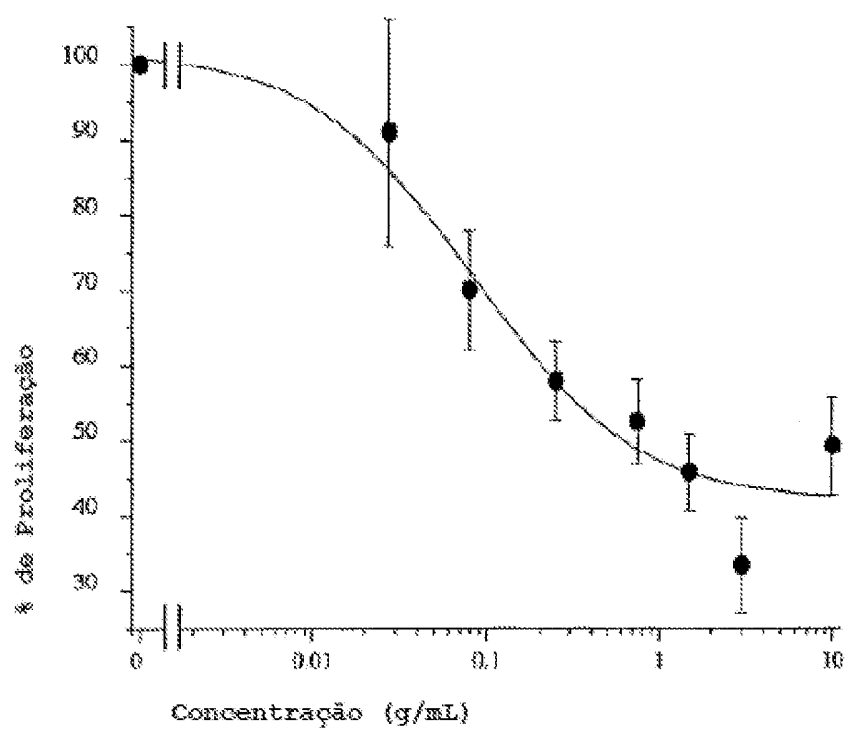
Figura 1

Figura 2

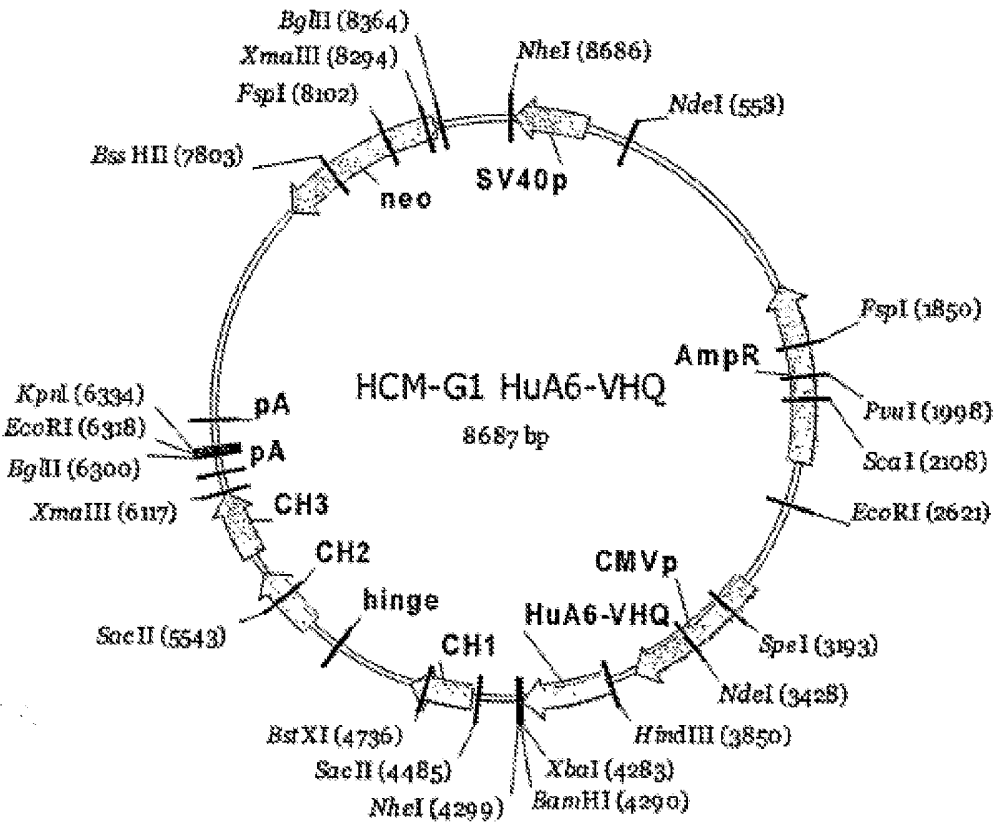


Figura 3

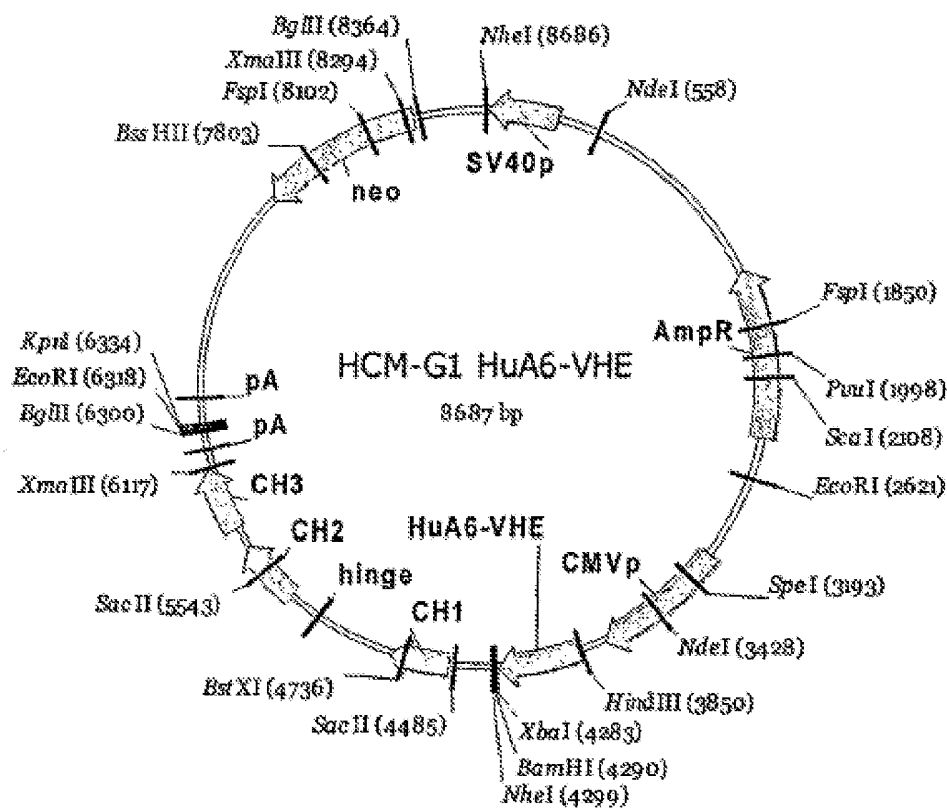


Figura 4

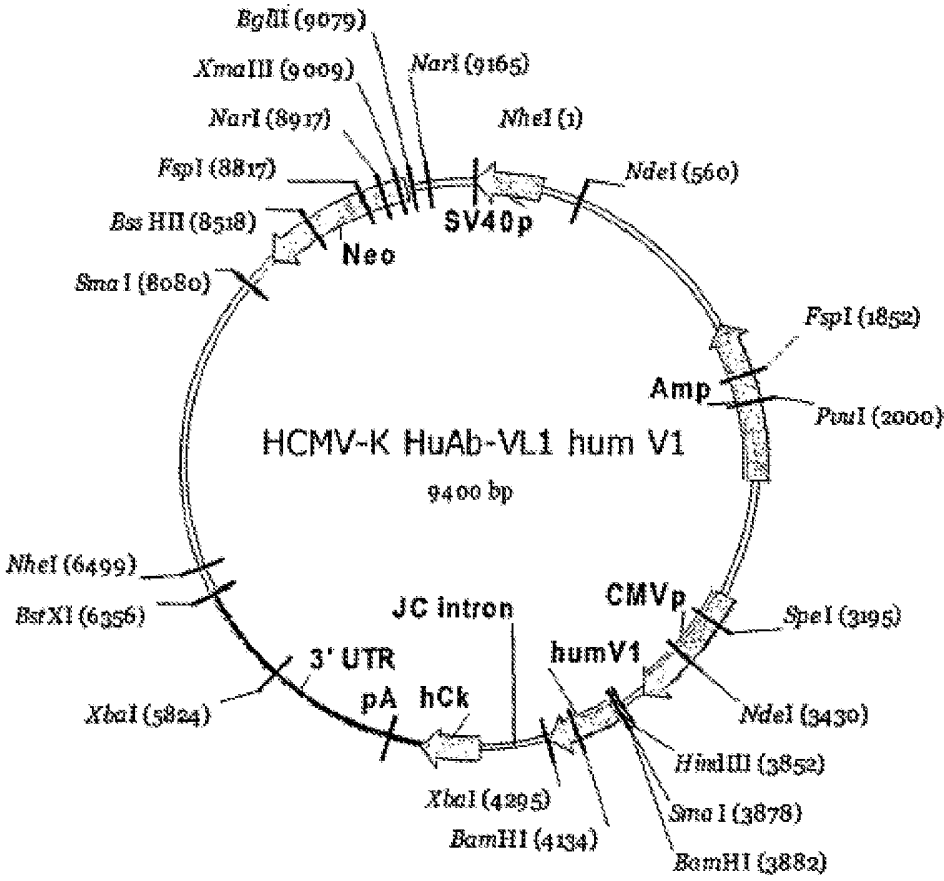


Figura 5

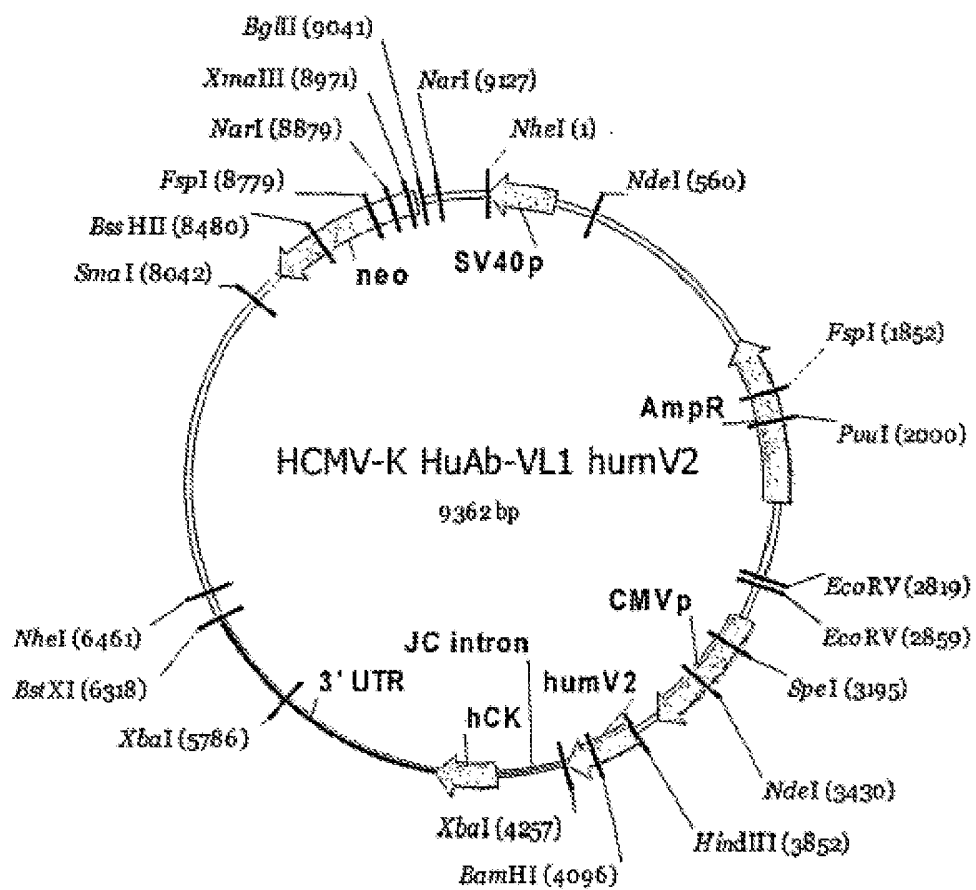


Figura 6

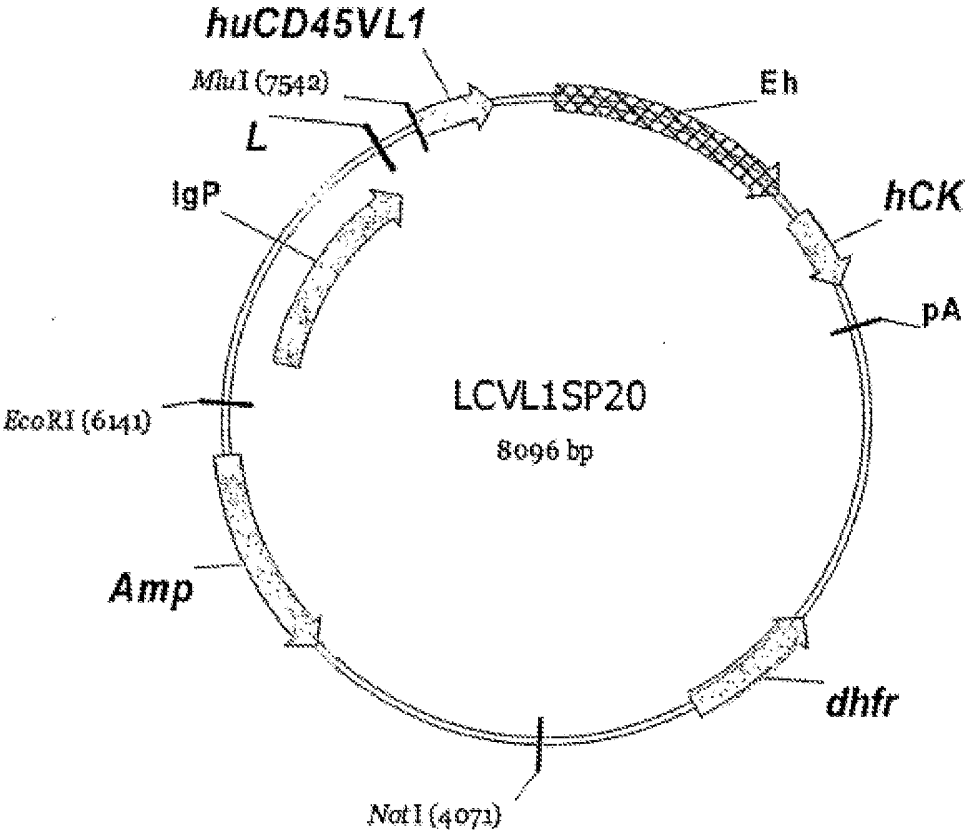


Figura 7

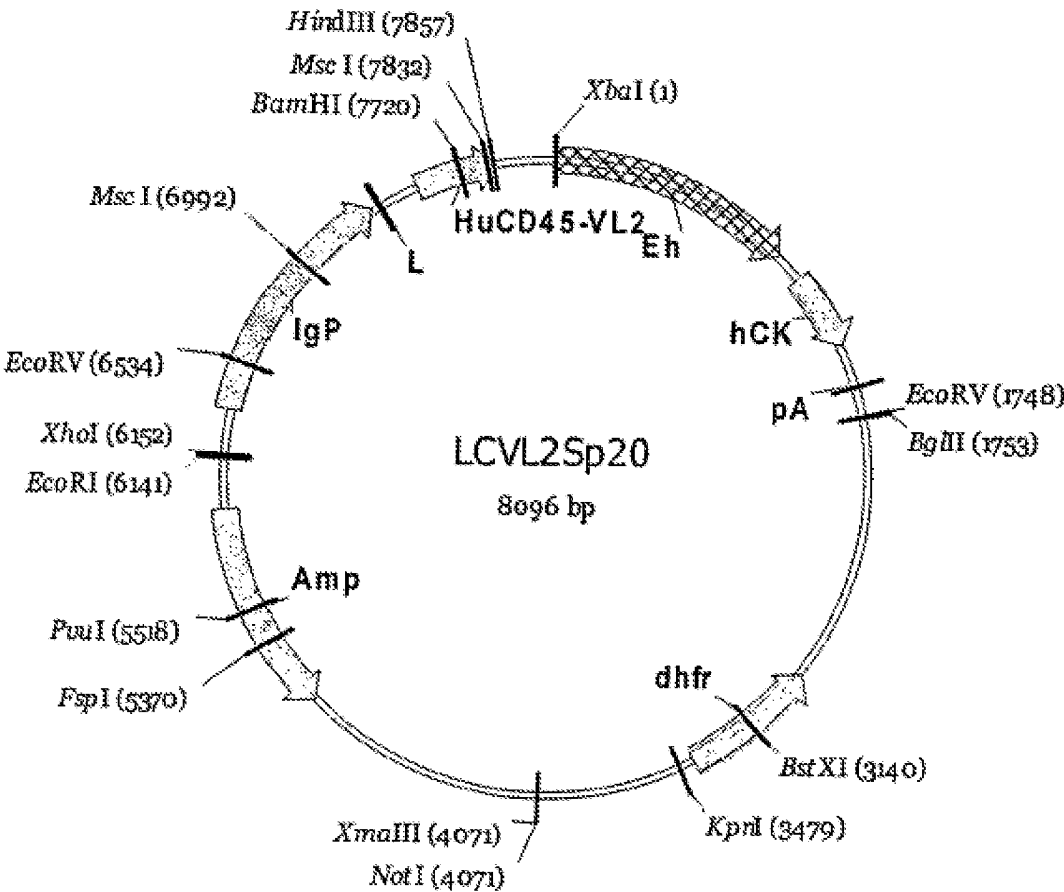


Figura 8

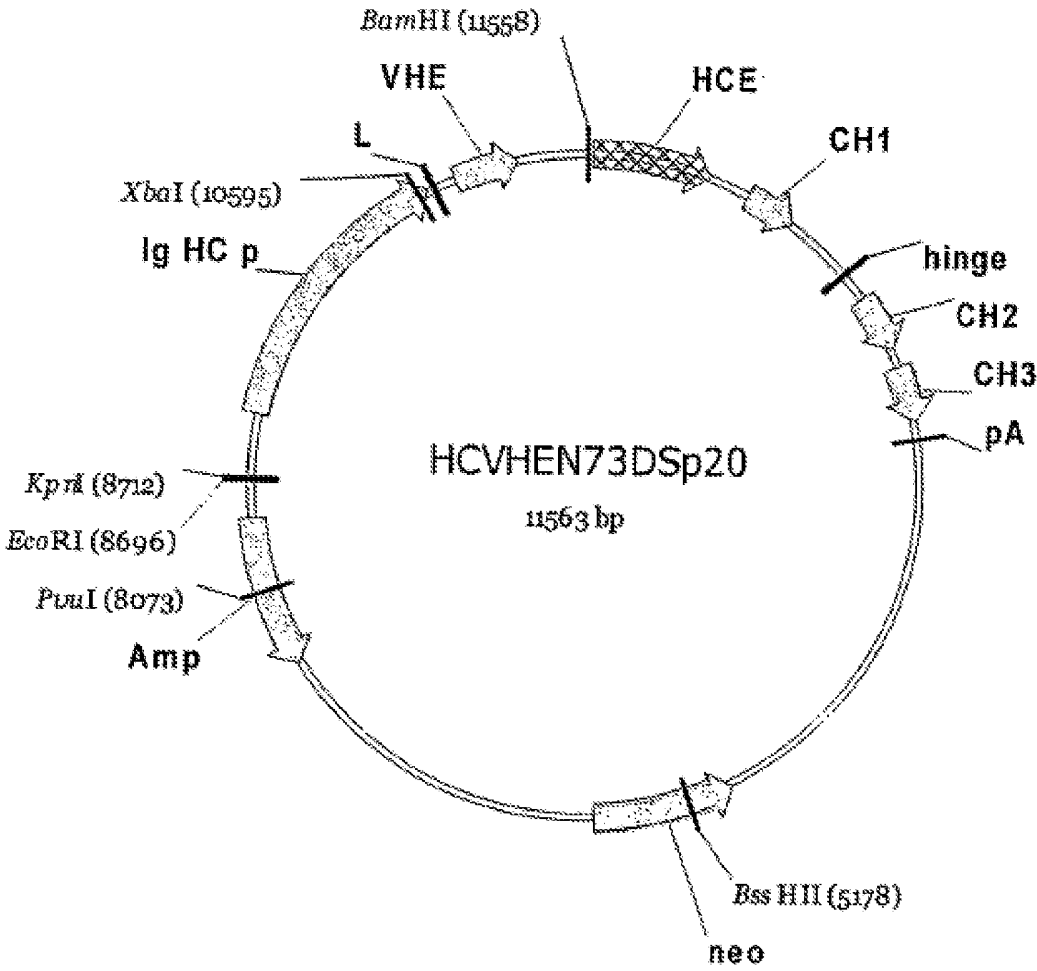


Figura 9

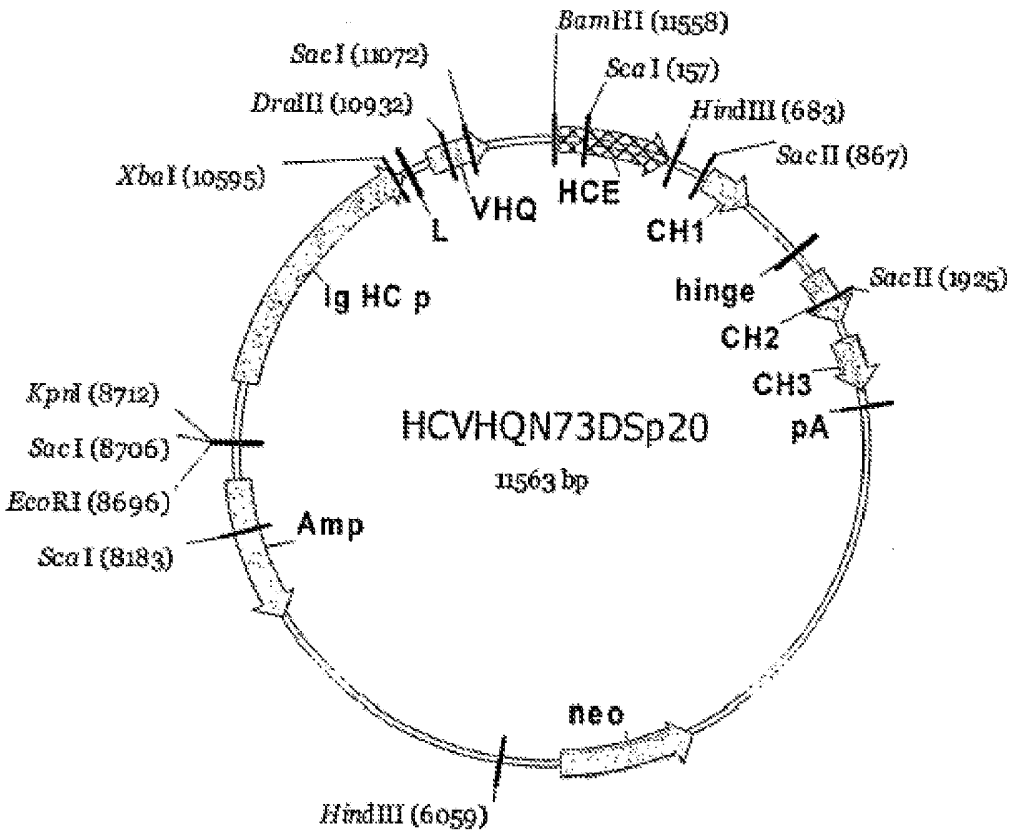


Figura 10

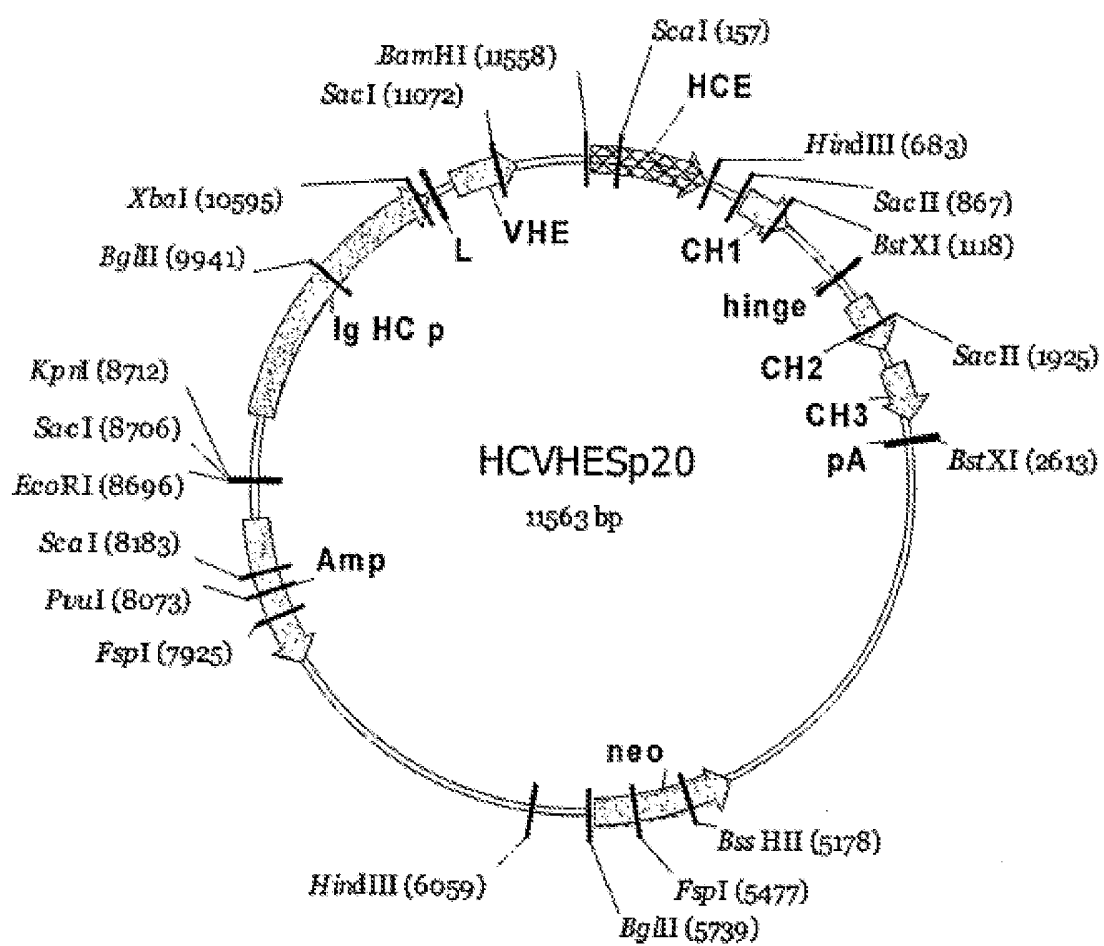


Figura 11

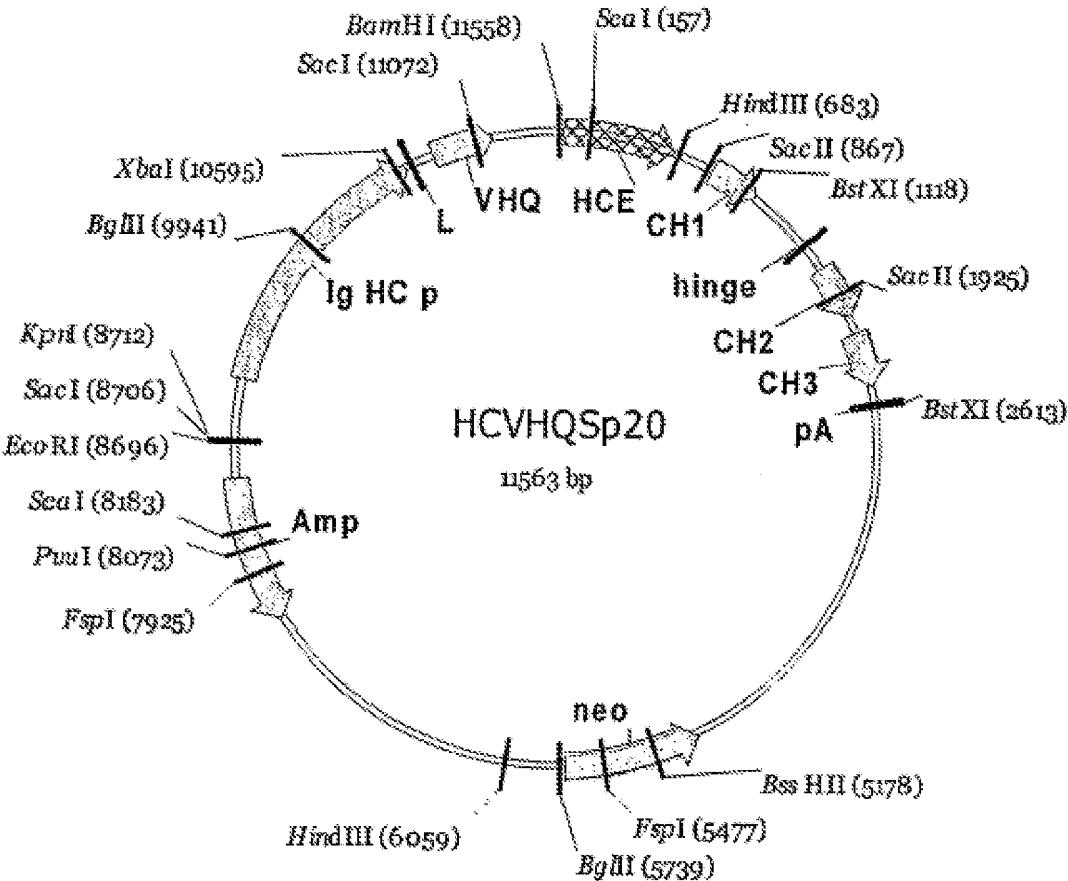


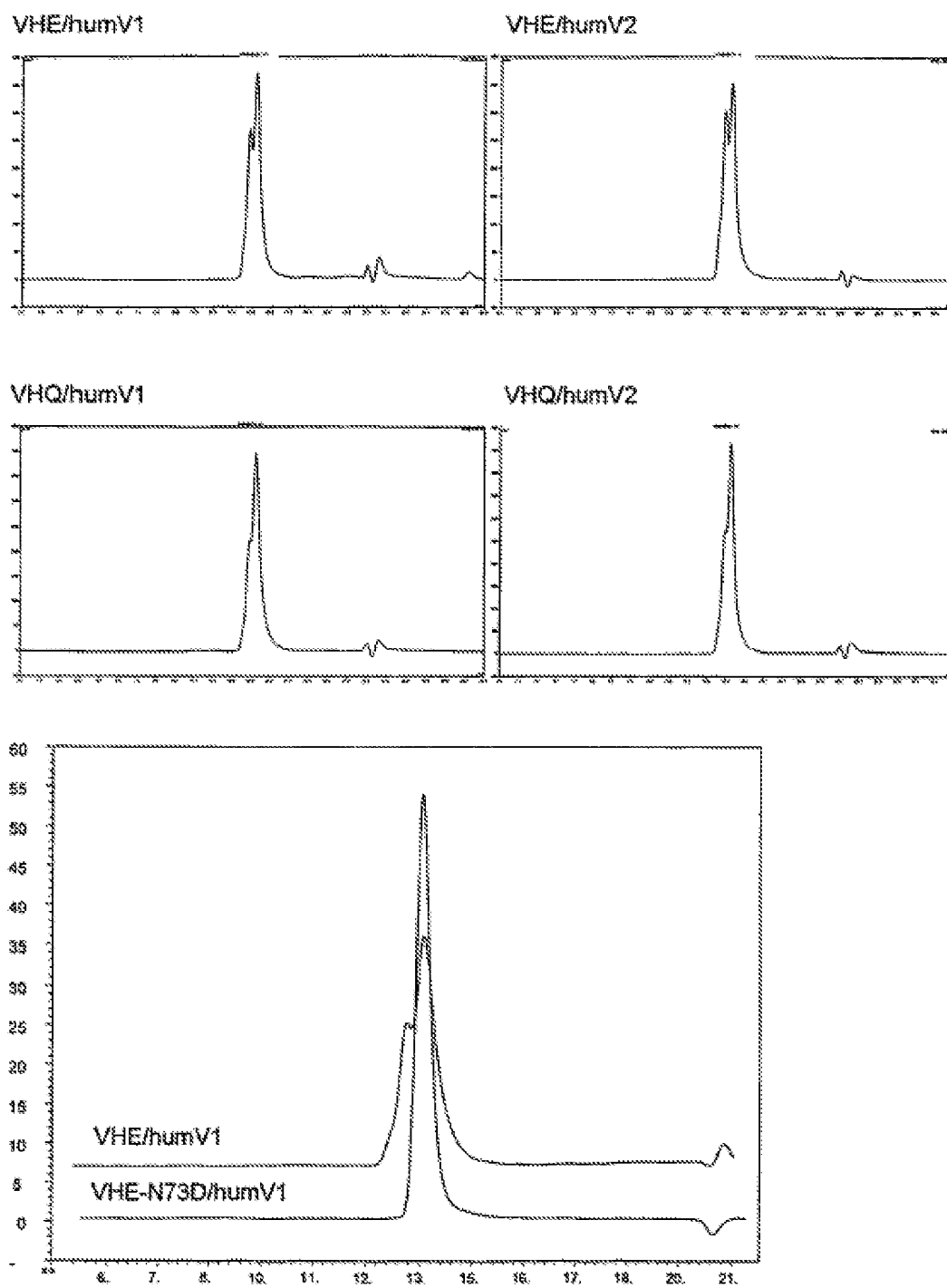
Figura 12

Figura 13

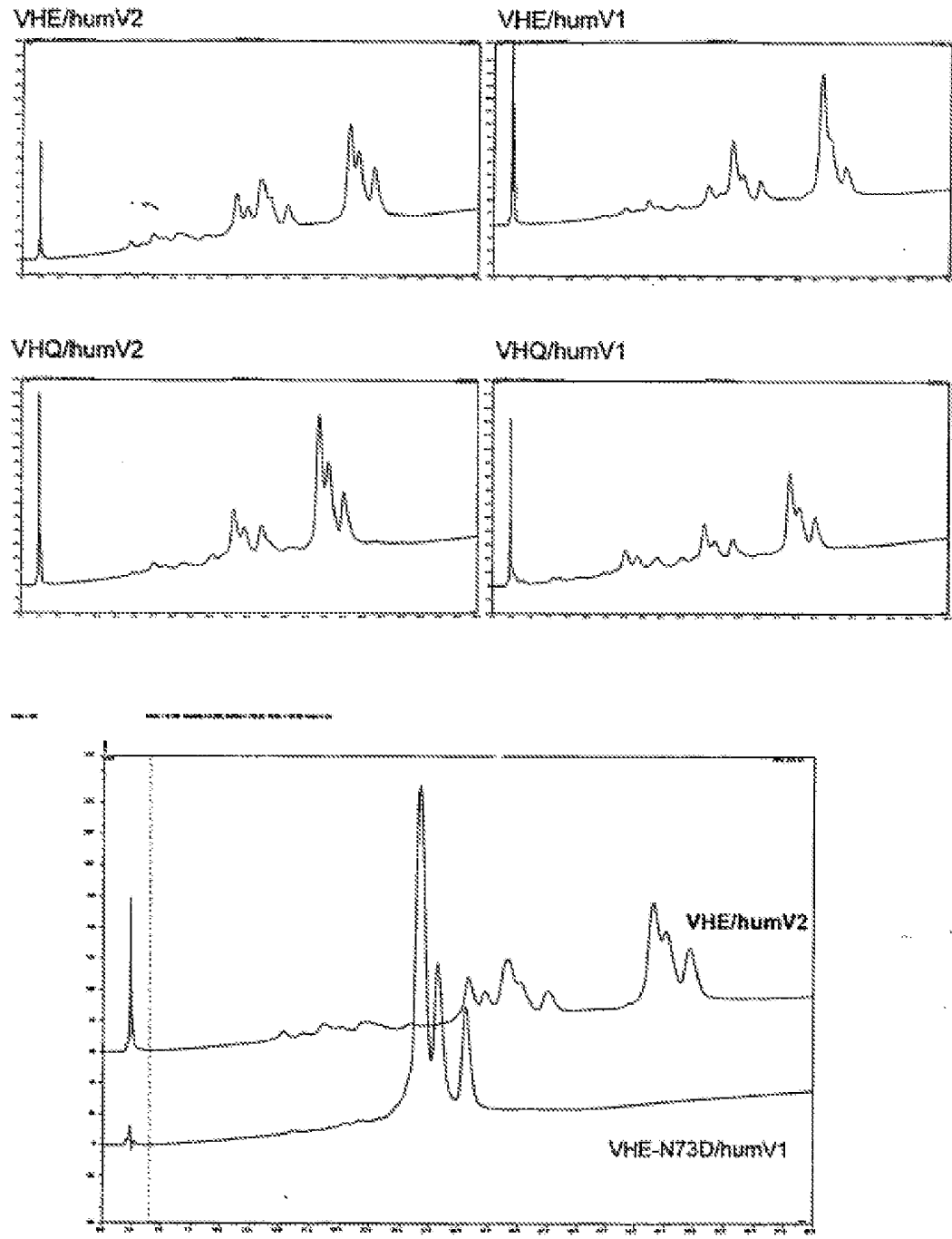
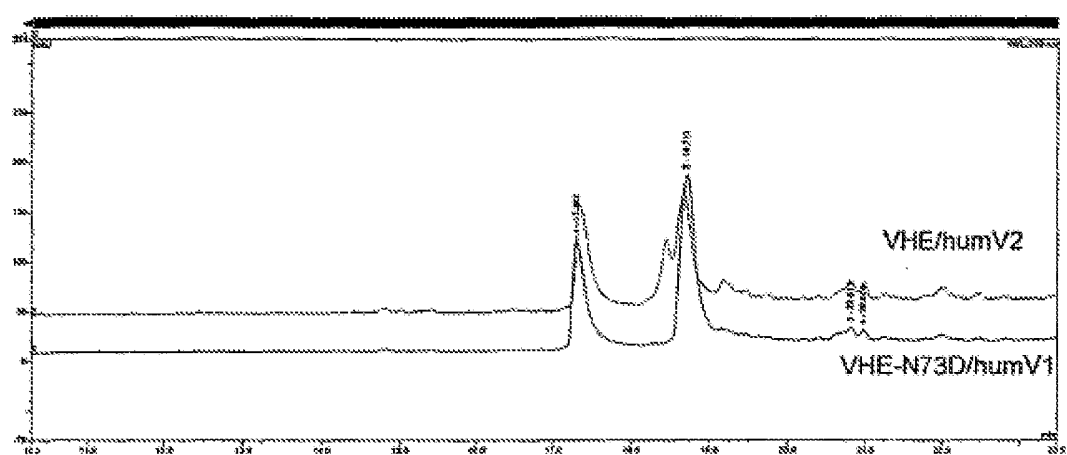


Figura 14

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2002072632 A
- EP 239400 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- Trowbridge IS et al. *Annu Rev Immunol.*, 1994, vol. 12, 85-118
- Streuli MF. et al. *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 166, 1548-1566
- Thomas ML. et al. *Immunol. Today*, 1988, vol. 9, 320-325
- Terry LA et al. *Immunol.*, 1988, vol. 64, 331-336
- Dunn-Walters D. et al. *Molecular Immunology*, 2000, vol. 37, 107-113
- Friends P. et al. *Transplantation*, 1999, vol. 68, 1632-1687
- Aversa et al. *Cellular Immunology*, 1994, vol. 158, 314-328
- Kabat, E.A. et al. Sequences of proteins of immunological interest. US department of health and human services, Public health service
- T. E. Creighton. *Proteins: Structure and Molecular Properties*. W. H. Freeman & Co, 79-86
- Kolbinger et al. *Protein Eng.*, November 1993, vol. 6 (6), 971-80
- Bertuzzi et al. *Diabetes*, 1999, vol. 48, 1971-8
- Davalli A.M. et al. *Diabetes*, 1996, vol. 45, 1161-7