

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

(51) Classificação Internacional:

A61K 39/395 (2013.01) **C07K 16/28** (2013.01)
A61P 35/00 (2013.01) **A61P 37/00** (2013.01)
A61P 21/04 (2013.01) **C12N 15/13** (2013.01)
C12N 15/85 (2013.01) **C12N 5/10** (2013.01)
C07K 16/46 (2013.01)

(22) Data de pedido: **2006.07.25**

(30) Prioridade(s): **2005.07.25 US 702499 P**
2006.05.16 US 800595 P

(43) Data de publicação do pedido: **2008.04.23**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.02.12**
089/2014

(73) Titular(es):

**EMERGENT PRODUCT DEVELOPMENT
SEATTLE, LLC
2401 FOURTH AVENUE, SUITE 1050 SEATTLE,
WASHINGTON 98121 US**

(72) Inventor(es):

WILLIAM BRADY US
SANDY ALEXANDER SIMON US
JEFFREY A. LEDBETTER US
MARTHA SUSAN HAYDEN-LEDBETTER US
LAURA SUE GROSMIRE US

(74) Mandatário:

MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA PT
RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA CD37 E ESPECÍFICAS PARA CD20**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO FORNECE DE FORMA GERAL MÉTODOS PARA A REDUÇÃO DE CÉLULAS B EM UM INDIVÍDUO COM O USO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA CD37. EM PARTICULAR, A INVENÇÃO FORNECE MÉTODOS PARA A REDUÇÃO DE CÉLULAS B COM A UTILIZAÇÃO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA CD37 ISOLADAMENTE OU UMA COMBINAÇÃO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA CD37 E MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA CD20 E, EM ALGUNS CASOS, UMA COMBINAÇÃO SINÉRGICA. A INVENÇÃO AINDA FORNECE MATERIAIS E MÉTODOS PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS QUE ENVOLVEM ATIVIDADE ABERRANTE DE CÉLULA B. ALÉM DISSO, A INVENÇÃO FORNECE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO HUMANIZADAS ESPECÍFICAS PARA CD37.

RESUMO

MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO ESPECÍFICAS PARA CD37 E ESPECÍFICAS PARA CD20

A presente invenção fornece de forma geral métodos para a redução de células B em um indivíduo com o uso de moléculas de ligação específicas para CD37. Em particular, a invenção fornece métodos para a redução de células B com a utilização de moléculas de ligação específicas para CD37 isoladamente ou uma combinação de moléculas de ligação específicas para CD37 e moléculas de ligação específicas para CD20 e, em alguns casos, uma combinação sinérgica. A invenção ainda fornece materiais e métodos para o tratamento de doenças que envolvem atividade aberrante de célula B. Além disso, a invenção fornece moléculas de ligação humanizadas específicas para CD37.

DESCRIÇÃO

**REDUÇÃO DE CÉLULAS B COM O USO DE MOLÉCULAS DE LIGAÇÃO
ESPECÍFICAS PARA CD37 E ESPECÍFICAS PARA CD20**

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção geralmente proporciona a utilização de moléculas de ligação específica do CD37 em métodos para a redução de células B em um indivíduo. Em particular, a invenção proporciona o uso de CD-37 de moléculas de ligação específicos em combinação com moléculas de ligação específicas de CD20, em alguns casos, uma combinação sinérgica, em métodos de redução de células-B. A invenção proporciona ainda materiais e à sua utilização em métodos para o tratamento de atividade aberrante de células B.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Em seu papel normal, o Sistema imunológico humano protege o corpo de danos decorrentes de substâncias estranhas e patógenos. Uma forma pela qual o sistema imunológico protege o corpo é por produção de células especializadas denominadas linfócitos B ou células B. As células B produzem anticorpos que se ligam e, em alguns casos, medeiam a destruição de uma substância estranha ou patógeno.

No entanto, em alguns casos, há uma alteração do sistema imunológico humano, e especificamente dos linfócitos B do sistema imunológico humano, e surge uma doença. Há vários cânceros que envolvem a proliferação descontrolada de células B. Também há várias doenças autoimunes que envolvem

a produção por células B de anticorpos que, em vez de se ligarem às substâncias estranhas e aos patógenos, ligam-se a partes do corpo. Tais anticorpos são algumas vezes denominados auto-anticorpos. Além disso, há várias doenças autoimunes e inflamatórias que envolvem células B em sua patologia, por exemplo, através da apresentação inadequada de antígeno de célula B às células T, ou através de outras vias que envolvem células B. Por exemplo, camundongos com tendência autoimune deficientes em células B não desenvolvem doença renal autoimune, vasculite ou auto-anticorpos. Veja Shlomchik e cols., J. Exp. Med., 180: 1.295-306 (1994). Curiosamente, esses mesmos camundongos com tendência autoimune que possuem células B, mas são deficientes na produção de imunoglobulinas, desenvolvem doenças autoimunes quando induzidos experimentalmente, como descrito por Chan e cols., J. Exp. Med., 189: 1.639-48 (1999), o que indica que as células B têm uma participação integral no desenvolvimento de doença autoimune.

As células B podem ser identificadas por moléculas na sua superfície celular. CD20 foi a primeira molécula de superfície específica para a linhagem de célula B humana identificada por um anticorpo monoclonal. Ela é uma fosfoproteína transmembrana de célula B não glicosilada hidrofóbica de 35 kDa que tem tanto a sua extremidade amino 3 0 quanto a extremidade carbóxi situadas dentro da célula. Veja Einfeld e cols., EMBO J., 7:711-17(1998). CD20 é expressa por todas as células B maduras normais, mas não é expressa por células B precursoras ou células plasmáticas. Não foram identificados ligantes naturais para CD20, e a função de CD20 na biologia das células B ainda não é completamente compreendida.

Outra molécula da superfície celular específica para a linhagem de células B é CD37. CD37 é uma proteína altamente glicosilada de 40-52 kDa que pertence à família de tetraspanina transmembrana de antígenos da superfície celular. Ela atravessa a membrana celular quatro vezes, formando duas alças extracelulares e expondo suas extremidades amino e carbóxi ao citoplasma. CD37 é altamente expressa em (slg+) células B normais produtoras de anticorpo, mas não é expressa em pré-células B ou em células plasmáticas. A expressão de CD37 em células T em repouso e ativadas, monócitos e granulócitos, é baixa, e não há expressão detetável de CD37 em células NK (natural killer), plaquetas ou eritrócitos. Veja Belov e cols., *Cancer Res.*, 61(11): 4.483-4.489 (2001); Schwartz-Albiez e cols., *J. Immunol.*, 140(3): 905-914 (1988); e Link e cols., *J. Immunol.*, 137(9): 3.013-3.018 (1988). Além das células B normais, quase todas as malignidades originadas de células B são positivas para expressão de CD37, incluindo leucemia linfocítica crônica (CLL), linfoma não Hodgkin (NHL) e leucemia de células pilosas [Moore e cols., *Journal of Pathology*, 152: 13-21 (1987); Merson e Brochier, *Immunology Letters*, 19: 269-272 (1988); e Faure e cols., *American Journal of Dermatopathology*, 12 (3): 122-133 (1990)]. CD37 participa da regulação da função das células B, uma vez que foi constatado que camundongos desprovidos de CD37 possuem níveis baixos de IgG1 sérica e têm deficiência da resposta humoral a antígenos virais e a antígenos modelares. Parece que ela atua como uma molécula co-estimuladora não clássica ou influencia diretamente a apresentação de antígeno por meio da formação de complexo com moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) da classe II. Veja

Knobeloch e cols., *Mol. Cell. Biol.*, 20(15): 5.363-5.369 (2000). Parece que CD37 também participa da sinalização TCR. Veja Van Spriel e cols., *J. Immunol.*, 172: 2.953-2.961 (2004).

Houve pesquisas e desenvolvimento de fármacos com base no conceito de que as próprias moléculas da superfície celular específicas para a linhagem de células B, por exemplo, CD37 ou CD20, podem ser alvos para anticorpos que se ligariam e mediarão a destruição de células B cancerosas e causadoras de doença autoimune que possuem CD37 ou CD20 nas suas superfícies. Na denominada "imunoterapia", anticorpos feitos (ou com base em anticorpos feitos) num animal não humano que se ligam a CD37 ou CD20 são administrados a um paciente para eliminar células B cancerosas ou causadoras de doença autoimune.

Um anticorpo para CD37 foi marcado com ^{131}I e testado em testes clínicos para terapia de linfoma não Hodgkin (NHL). Veja Press e cols., *J. Clin. Oncol.*, 7(3): 1.027-1.038 (1989); Bernstein e cols., *Cancer Res. (Supl.)*, 50:1.017-1.021 (1990); Press e cols., *Front. Radiat. Ther. Oncol.*, 24: 204-213 (1990); Press e cols., *Adv. Exp. Med. Biol.*, 303: 91-96 (1991) e Brown e cols., *Nucl. Med. Biol.*, 24: 657-663 (1997). O anticorpo, MB-1, é um anticorpo monoclonal murídeo IgG1 desprovido de funções efectoras de Fc, por exemplo, citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC), e MB-1 não inibiu o crescimento tumoral em um modelo de xenoinxerto in vivo, a menos que tenha sido marcado com um isótopo (Buchsbaum e cols., *Cancer Res.*, 52(83): 6.476-6.481 (1992)). A biodistribuição favorável de ^{131}I -MB-1 foi observada em pacientes com linfoma que tinham

cargas tumorais menores (<1 kg), e a terapia desses pacientes resultou em remissões completas do tumor que duram de 4 a 11 meses (Press e cols., 1989 e Bernstein e cols. 1990).

Além disso, um imunoconjugado composto pelo fármaco adriamicina ligado a G28-1, outro anticorpo anti-CD37, foi avaliado em camundongos e mostrou efeitos através de internalização e liberação intracelular do fármaco. Veja Braslawsky e cols., *Cancer Immunol. Immunother.*, 33(6): 367-374 (1991).

Vários grupos investigaram o uso de anticorpos anti-CD20 para o tratamento de doenças relacionadas às células B. Um tratamento consiste em anticorpos anti-CD20 preparados na forma de radionuclídeos para o tratamento de linfoma de células B (por exemplo, anticorpo anti-CD20 marcado com ^{131}I), além de uma forma marcada com ^{89}Sr para a atenuação de dor óssea causada por metástases de cancro de próstata e mama [Endo, *Gan To Kagaku Ryoho*, 26: 744-748 (1999)].

Outro grupo desenvolveu um anticorpo monoclonal quimérico específico para CD20, que consiste em regiões variáveis de cadeia pesada e leve originárias de camundongos fundidas às regiões constantes da cadeia pesada de IgG1 humana e da cadeia leve kappa humana. De acordo com o relatado, o anticorpo quimérico reteve a habilidade para se ligar a CD20 e a habilidade para mediar ADCC e para fixar complemento. Veja Liu e cols., *J. Immunol.* 139: 3.521-26 (1987). Ainda outro anticorpo quimérico anti-CD20 foi feito a partir de IDEC hibridoma C2B8, e foi denominado rituximab. Acredita-se que o mecanismo da atividade anti-

tumoral de rituximab seja uma combinação de várias atividades, incluindo ADCC, fixação de complemento e desencadeamento de sinais que promovem apoptose em células B malignas, embora o grande tamanho do anticorpo quimérico impeça a difusão ótima da molécula em tecidos linfóides que contêm células B malignas limitando, dessa forma, suas atividades anti-tumorais. ADCC é uma reação mediada por células na qual células citotóxicas inespecíficas que expressam recetores Fc (FcRs) (por exemplo, células Natural Killer (NK), neutrófilos e macrófagos) reconhecem anticorpo ligado em uma célula-alvo e, subsequentemente, causam a lise da célula-alvo. A fixação de complemento, ou citotoxicidade dependente de complemento (CDC), é a habilidade de uma molécula para efetuar a lise de um alvo na presença de complemento. A via de ativação de complemento é iniciada pela ligação do primeiro componente do sistema de complemento (C1q) a uma molécula (por exemplo, um anticorpo) em complexo com um antígeno cognato. O grande tamanho de rituximab impede a difusão ótima da molécula em tecidos linfóides que contêm células B malignas, limitando, dessa forma, essas atividades anti-tumorais.

Rituximab, administrado tipicamente em infusões 4 vezes por semana, é usado atualmente para tratar linfoma não Hodgkin de célula B de grau baixo ou folicular [McLaughlin e cols., *Oncology*, 12: 1.763-1.777 (1998); Leget e cols., *Curr. Opin. Oncol.*, 10: 548-551 (1998)] e no linfoma folicular recidivado de estágio III/IV [White e cols., *Pharm. Sei. Technol. Today*, 2: 95-101 (1999)]. Outros distúrbios tratáveis com rituximab incluem linfoma de célula do centro folicular (FCC), linfoma de célula do manto (MCL), linfoma

difuso de célula grande (DLCL) e linfoma linfocítico pequeno (SLL) [Nguyen e cols., Eur. J. Haematol., 62:76-82 (1999)]. Rituximab administrado em infusões semanais também é usado para tratar CLL [Lin e cols., Sem. Oncol., 30:483-92 (2003)].

Anticorpos anti-CD20 também foram usados para tratar pacientes que sofrem de doenças autoimunes associadas à produção de auto-anticorpos por células B. Por exemplo, rituximab demonstrou benefícios clínicos significativos na eliminação de células B CD20+ em pacientes com múltiplas doenças autoimunes/inflamatórias, incluindo Artrite reumatoide (AR) [Edwards, N. Engl. J. Med., 350: 2.546-2.548 (2004); Cambridge e cols., Arthritis Rheum., 48: 2.146-54 (2003)]. Os pacientes com AR receberam doses contínuas de metotrexato (MTX) e um esquema de 4 doses de infusão de rituximab (Edwards, supra). Esses pacientes apresentaram melhora das respostas da "American College of Rheumatology" (ACR) comparados com grupos de controle.

Num ensaio para o tratamento de lúpus eritematoso sistêmico (LES) [Leandro e cols., Arthritis Rheum., 46: 2.673-2.677 (2002)], os pacientes receberam a administração de duas infusões de rituximab em alta dose, e demonstraram redução de células B e melhora do estado da doença. Em um segundo estudo de redução de células B no LES [Looney e cols., Arthritis Rheum., 50: 2.580-2.589 (2004)], os pacientes receberam uma infusão única de 100 mg/m² (dose baixa), uma infusão única de 375 mg/m² (dose intermediária) ou como 4 infusões (com intervalo de 1 semana) de 375 mg/m² (dose alta) de rituximab. Esses pacientes demonstraram redução de células B e melhora das pontuações da doença, mas o

tratamento não alterou o nível de auto-anticorpos. Também foram realizados ensaios de rituximab na macroglobulinemia de Waldenstrom [Treon e cols., *Immunother.*, 24: 272-279 (2000)], nos quais os pacientes apresentaram aumento do hematócrito (HCT) e das contagens de plaquetas (PLT) após 4 infusões de rituximab.

Relatos recentes de tratamento com rituximab em pacientes que sofrem de esclerose múltipla, uma doença autoimune que afeta o sistema nervoso central, indicam que um esquema de tratamento elimina células B periféricas, mas tem pouco efeito sobre células B em líquido cefalorraquidiano. Veja Monson e cols., *Arch. Neurol.*, 62: 258-264 (2005).

Publicações adicionais em relação ao uso de rituximab incluem: Stashi e cols. "Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody treatment for adults with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura" *Blood* 98: 952-957 (2001); Matthews, R. "Medical Heretics" *New Scientist* (7, Abril de 2001); Leandro e cols. "Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion" *Ann. Rheum. Dis.* 61: 833-888 (2002); Leandro e cols. "Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response". *Arthritis and Rheumatism* 44(9): S370 (2001); Leandro e cols. "An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus", *Arthritis Rheum.* 46: 2.673-2.677 (2002); Edwards e cols., "Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes" *Rheumatology* 40: 205-211 (2001); Edwards e cols. "B-lymphocyte depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders"

Biochem. Soc. Trans. 30(4): 824-828 (2002); Edwards e cols. "Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis". Arthritis Rheum. 46: S197 (2002); Levine e cols., "IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using rituximab" Neurology 52: 1.701-1.704 (1999); DeVita e cols. "Efficacy of selective B-cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis" Arthritis Rheum. 46: 2.029-2.033 (2002); Hidashida et al. "Tratamento of DMARD-Refractory rheumatoid arthritis with rituximab", apresentado no "Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology"; 24-29 de outubro; Nova Orleans, La. 2002; Tuscano, J. "Successful treatment of Infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab", apresentado no "Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology"; 24-29 de Outubro, New Orleans, La. 2002.

Ainda persistem problemas associados à terapia com rituximab. Por exemplo, a maioria dos pacientes com cancro tratados com rituximab apresenta recidiva, geralmente em até cerca de 6-12 meses, e foram relatadas reações fatais à infusão em até 24 horas após a infusão de rituximab. Essas reações fatais ocorreram após uma reação à infusão complexa que incluía hipoxia, infiltrados pulmonares, síndrome do sofrimento respiratório agudo, infarto do miocárdio, fibrilação ventricular, ou choque cardiogênico. A insuficiência renal aguda com necessidade de diálise com casos de resultados fatais também foi relatada no quadro de síndrome de lise tumoral após o tratamento com rituximab, bem como reações mucocutâneas graves, algumas com

resultados fatais. Adicionalmente, são necessárias doses altas de rituximab para a injeção intravenosa, pois a molécula é grande, de aproximadamente 150 kDa, e, como observado acima, a difusão nos tecidos linfoides, onde residem muitas células tumorais reside, é limitada.

Como as células B maduras normais também expressam CD37 e CD20, as células B normais são eliminadas pela terapia com anticorpo anti-CD37 (Press e cols., 1989) ou anti-CD20 [Reff e cols., Blood, 83: 435-445 (1994)]. Após o término do tratamento, no entanto, as células B normais podem ser regeneradas a partir de precursores de células B CD37- e CD20-negativos; portanto, os pacientes tratados com terapia anti-CD37 ou anti-CD20 não apresentam imunossupressão significativa.

A tecnologia de anticorpo monoclonal e métodos de engenharia genética levaram ao desenvolvimento de moléculas de imunoglobulina para diagnóstico e tratamento de doenças humanas. Foi feita a criação de proteínas por engenharia genética para aumentar a afinidade de um anticorpo por seu antígeno cognato, para reduzir os problemas relacionados à imunogenicidade, e para alterar as funções efetoras de um anticorpo. A estrutura do domínio de imunoglobulinas é passível de ser submetida à engenharia genética, uma vez que os domínios de ligação de antígeno e os domínios que conferem funções efetoras podem ser trocados entre classes e subclasses de imunoglobulinas. A estrutura e a função das imunoglobulinas são revisadas, por exemplo, em Harlow e cols., Eds., "Antibodies: A Laboratory Manual", Capítulo 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor (1988). Uma introdução extensa, além de informações

detalhadas sobre todos os aspectos da tecnologia de anticorpo recombinante, podem ser encontradas no livro-texto "Recombinant Antibodies" (John Wiley & Sons, NY, 1999). Uma coleção abrangente de protocolos de laboratório detalhados sobre o projeto de anticorpos por engenharia genética pode ser encontrada em R. Kontermann e S. Dübel (eds.), "The Antibody Engineering Lab Manual" (Springer Verlag, Heidelberg/Nova York, 2000).

Recentemente, foram construídas moléculas menores de imunoglobulina para superar problemas associados à terapia com imunoglobulina inteira. Fv de cadeia única (scFv) compreende um domínio variável da cadeia pesada de anticorpo unido através de um peptídeo vinculador curto a um domínio variável da cadeia leve de anticorpo [Huston e COLs., Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 85: 5.879-5.883 (1988)]. Além de regiões variáveis, cada uma das cadeias do anticorpo tem uma ou mais regiões constantes. Cadeias leves possuem um único domínio da região constante. Dessa forma, cadeias leves possuem uma região variável e uma região constante. Cadeias pesadas possuem vários domínios da região constante. As cadeias pesadas nos anticorpos IgG, IgA e IgD possuem três domínios da região constante, que são designados CH1, CH2 e CH3, e as cadeias pesadas nos anticorpos IgM e IgE possuem quatro domínios da região constante, CH1, CH2, CH3 e CH4. Dessa forma, as cadeias pesadas possuem uma região variável e três ou quatro regiões constantes.

As cadeias pesadas de imunoglobulinas também podem ser divididas em três regiões funcionais: a região Fd (um fragmento que compreende V.sub.H e CH1, ou seja, os dois

domínios do terminal N da cadeia pesada), a região de dobradiça, e a região Fc (a região do "fragmento cristalizável", derivada de regiões constantes e formada após digestão com pepsina). A região Fd em combinação com a cadeia leve forma um Fab (o "fragmento de ligação de antígeno"). Como um antígeno reagirá estereoquimicamente com a região de ligação de antígeno no terminal amino de cada Fab, a molécula de IgG é divalente, ou seja, ela pode se ligar a duas moléculas de antígeno. Fc contém os domínios que interagem com recetores de imunoglobulina nas células e com os elementos iniciais da cascata do complemento. Dessa forma, o fragmento Fc é geralmente considerado responsável pelas funções efetoras de uma imunoglobulina, por exemplo, fixação de complemento e ligação aos recetores Fc.

Por causa do pequeno tamanho das moléculas de scFv, elas exibem uma depuração muito rápida do plasma e dos tecidos, e uma penetração mais eficaz em tecidos do que a imunoglobulina inteira. Um scFv anti-tumoral mostrou penetração tumoral mais rápida e uma distribuição mais equilibrada pela massa tumoral do que o anticorpo quimérico correspondente [Yokota e cols., *Cancer Res.*, 52, 3.402-3.408 (1992)]. A fusão de um scFv com outra molécula, por exemplo, uma toxina, se beneficia da atividade específica de ligação de antígeno e do pequeno tamanho de um scFv para liberar a toxina a um tecido-alvo. [Chaudary e cols., *Nature*, 339: 394 (1989); Batra e cols., *Mol. Cell. Biol.*, 11: 2.200 (1991)].

Apesar das vantagens das moléculas de scFv, há várias desvantagens associadas à sua utilização. Embora a

depuração rápida de scFv possa reduzir seus efeitos tóxicos em células normais, essa depuração rápida pode impedir a liberação de uma dose eficaz mínima ao tecido-alvo. A fabricação de quantidades adequadas de scFv para administração a pacientes foi desafiadora, em função das dificuldades na expressão e isolamento de scFv que afetam de forma adversa o rendimento. Durante a expressão, as moléculas de scFv não possuem estabilidade e frequentemente se agregam por causa do pareamento de regiões variáveis de moléculas diferentes. Além disso, os níveis de produção de moléculas de scFv em sistemas de expressão mamíferos são baixos, limitando o potencial para a fabricação eficiente de moléculas de scFv para terapia [Davis e cols., J. Biol. Chem., 265: 10.410-10.418 (1990); Traunecker e cols., EMBO J., 10: 3.655-3.659 (1991)]. Foram exploradas estratégias para aumento da produção, incluindo a adição de sítios de glicosilação nas regiões variáveis [Jost, C. R. Patente U.S. N° 5.888.773, Jost e cols., J. Biol. Chem., 69: 26.267-26.273 (1994)].

Outra desvantagem do uso de scFv para terapia é a ausência de função efetora. Um scFv sem as funções citolíticas, ADCC e citotoxicidade dependente de complemento (CDC) associadas à região constante de uma imunoglobulina pode ser ineficaz para o tratamento de doença. Muito embora o desenvolvimento da tecnologia de scFv tenha começado há mais de 12 anos, atualmente não há produtos de scFv aprovados para terapia.

Alternativamente, foi proposto que a fusão de um scFv a outra molécula, por exemplo, uma toxina, poderia se beneficiar da atividade específica de ligação de antígeno e do pequeno tamanho de um scFv para liberar a toxina a um

tecido-alvo. Chaudary e cols., Nature 339: 394 (1989); Batra e cols., Mol. Cell. Biol. 11: 2.200 (1991). A conjugação ou fusão de toxinas a scFvs foi, desse modo, oferecida como uma estratégia alternativa para fornecer moléculas potentes, com especificidade de antígeno, mas a dosagem com tais conjugados ou quimeras pode ser limitada por toxicidade excessiva e/ou inespecífica em função da porção de toxina de tais preparações. Os efeitos tóxicos podem incluir elevação suprafisiológica das enzimas hepáticas e síndrome de vazamento vascular, e outros efeitos indesejados. Além disso, as próprias imunotoxinas são altamente imunogênicas quando administradas a um hospedeiro, e os anticorpos do hospedeiro, gerados contra a imunotoxina limitam a utilidade potencial para tratamentos terapêuticos repetidos de um indivíduo.

Outras proteínas de fusão projetadas, denominados pequenos produtos imuno-farmacêuticos modulares (SMIP™), são descritas nas Publicações de Patente U.S. de co-propriedade 2003/133939, 2003/0118592 e 2005/0136049, e nas Publicações de Patente Internacional de co-propriedade WO 02/056910, WO 2005/037989 e WO 2005/017148, que são todas aqui incorporadas por referência. Os produtos SMIP são proteínas de fusão de domínio de ligação-imunoglobulina inéditas que apresentam um domínio de ligação para uma estrutura cognata, por exemplo, um antígeno, um contra-recetor ou outros mais; um polipeptídeo da região de dobradiça de IgG1, IGA ou IgE ou um polipeptídeo da região de dobradiça de IgG1 mutante que possui zero, um ou dois resíduos de cisteína; e domínios CH2 e CH3 de imunoglobulina. Os produtos SMIP são capazes de ADCC e/ou CDC.

Embora tenha sido realizada uma pesquisa intensa sobre terapias baseadas em anticorpos, ainda existe a necessidade na técnica de métodos aprimorados para o tratamento de doenças associadas à atividade aberrante de células B. Os métodos da presente invenção aqui descritos e reivindicados fornecem esses métodos aprimorados, além de outras vantagens.

Num primeiro aspeto da presente invenção, é fornecida uma proteína de ligação específica à CD37 humanizados para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune, em que a proteína de ligação específica à CD37 humanizada compreende:

- (a) regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 64 e uma cadeia leve de CDR3 compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 66; e
- (b) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, uma CDR2 da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 e uma cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ou 68 caracterizado em que a CD - 37 humanizado específico a proteína de ligação é para ser utilizado em combinação com uma proteína de ligação específica à CD20.

Num segundo aspeto da presente invenção, é fornecida uma proteína de ligação específica CD20 para uso no tratamento

de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune que se caracteriza pelo facto de a proteína de ligação específica à CD20 é para ser utilizado em combinação com uma proteína de ligação específica à CD37 humanizados para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune, em que a proteína de ligação específica à CD37 humanizado compreende:

- (a) regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 64 e uma cadeia leve de CDR3 compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 66; e
- (b) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, uma CDR2 da cadeia pesada que compreende uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 e uma cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ou 68.

Num terceiro aspeto, é proporcionado um artigo de fabrico que compreende uma proteína de ligação específica à CD20 e um humanizado proteína específica - CD37 de ligação para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune, em que o proteína de ligação específica à CD37 humanizado compreende:

- (a) regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID

NO: 64 e uma cadeia leve de CDR3 compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 66 ; e

(b) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 63, uma cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 e uma cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ou 68.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a cadeia leve CDR1, CDR2, e CDR3 da proteína de ligação específica humanizada CD37 - a consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 61, 64 e 66, respetivamente, e em que a cadeia pesada CDR1, CDR2, e CDR3 consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 63, 65 e 67, respetivamente.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a cadeia leve CDR1, CDR2, e CDR3 da proteína de ligação humanizada CD37 específica consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 61, 64 e 66, respetivamente, e em que a cadeia pesada CDR1, CDR2, e CDR3 consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 63, 65 e 68, respetivamente,

De preferência, em todos os aspetos do invento, a região de estrutura de cadeia leve humana é selecionada a partir de SEQ ID NOS: 170-172, 175, 179,182, 184-188, 191, 194-198, 203 e 205-210, ou

a região de estrutura de cadeia pesada humana é selecionada a partir de SEQ ID NOS: 140, 141, 143-147, 150, 151, 154-163, 168 e 169.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a primeira região de estrutura de cadeia leve humana (FR1) é seleccionada a partir de SEQ ID NOS:170 - 172, 175 e 177-181; FR2 humana da região de estrutura de cadeia leve é seleccionada a partir da SEQ ID NOS: 182, 184-188 e 191, a FR3 humano de cadeia leve é seleccionada a partir de SEQ ID NOS:194 - 198, 203 e 205; e o FR4 humano de cadeia leve é seleccionada a partir de SEQ ID NOS:206 - 210, ou a primeira região de estrutura de cadeia pesada humana (FR1) é seleccionada a partir de SEQ ID NOS: 140, 141 e 143-146; humano FR2 da cadeia pesada é seleccionada a partir de SEQ ID NOS: 147, 150 e 151; FR3 humana da cadeia pesada é seleccionada a partir de SEQ ID NOS: 154-160, e o FR4 humana da cadeia pesada é seleccionada a partir de SEQ ID NOS: 161-163, 168 e 169.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a proteína de ligação é composto por um Fv de cadeia simples (scFv) polipéptido um anticorpo ou um fragmento de ligação daí resultante, ou uma proteína de fusão de imunoglobulina que compreende, a partir de amino para carboxi regiões variáveis terminal, (i) um domínio de ligação de imunoglobulina tendo cadeias leve e pesada, separadas por um ligante péptido, (ii) um polipéptido da região de charneira de imunoglobulina tendo ou zero, um ou dois resíduos de cisteína, e (iii) de imunoglobulina CH2 e CH3. Ainda de preferência, a região de charneira de imunoglobulina pode ser um polipeptídeo IgG1, IgGA ou IgE região de charneira ou de um polipéptido de IgG1 mutante. Vantajosamente, a proteína de ligação é uma imunoglobulina Proteína de fusão de que compreende uma região variável de cadeia leve e uma região variável da cadeia pesada;

a região variável da cadeia leve está ligada à região variável da cadeia pesada de um péptido ligante que compreende $(\text{Gly}_4\text{SER})_n$, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 ; e as cadeias leve e pesada regiões variáveis ligadas estão ligados a um domínio efector de IgG1, através de uma dobradiça constituída por uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 12, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 126, ou 127.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a proteína de ligação específica à CD37 humanizada compreendendo uma sequência aminoácido selecionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 48 e 52.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a proteína de ligação específica à CD20 é um anticorpo monoclonal específico do CD20 anticorpo, de preferência Rituximab.

De forma vantajosa, em todos os aspetos da invenção, a proteína de ligação específica à CD20 é uma fusão de imunoglobulina que é proteína específica CD20 e compreende, a partir de amino para terminal carboxi, (i) um domínio de ligação com a imunoglobulina as regiões variáveis de cadeia leve e pesada separadas por um péptido de ligação, (ii) uma região de charneira de imunoglobulina polipéptido tendo o zero, um ou dois resíduos de cisteína, e (iii) de imunoglobulina CH2 e do domínio CH3. Ainda de preferência, a charneira de imunoglobulina região polipéptido pode ser uma IgG1, IgGA ou IgE região charneira polipéptido ou uma IgG1 mutante.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, o método compreende ainda a utilização de um agente quimioterapêutico, um agente radioterapêutico, uma citocina, uma quimiocina ou um factor de crescimento.

De preferência, em todos os aspetos do invento, o cancro das células B é a doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin, linfomas do sistema nervoso central, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia de células pilosas, leucemia mioblástica crônica, mieloma múltiplo, pequeno linfoma linfocítico, leucemia prolinfocítica de células B, linfoplasmocitário linfoma, linfoma de zona marginal esplênica, mieloma das células plasmáticas, plasmocitoma solitário do osso, extraósseo plasmocitoma, zona extra nodal marginal linfoma de células B do tecido linfóide associado à mucosa, nodal marginal linfoma de células B Linfoma de células B da zona, linfoma folicular, linfoma de células do manto, difuso de grandes, mediastino (timo) linfoma de grandes células B, linfoma de células B intravascular grande, linfoma primário, linfoma/leucemia de Burkitt/, proliferação de células B de potencial maligno incerto, granulomatose linfomatóide ou desordem linfoproliferativa pós-transplante.

De forma vantajosa, em todos os aspetos da invenção, a doença autoimune é artrite reumatoide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistémico, doença de Crohn, síndrome de Sjogren, doença de Grave, diabetes mellitus tipo I, psoríase, púrpura trombocitopénica imunológica, pênfigo, miopatia inflamatória idiopática, myasthenis gravis, ou Waldenstorm de macroglobinemia.

De preferência, em todos os aspetos da invenção, a proteína de ligação específica do CD37 e a proteína de ligação específica CD20 são administrados sequencialmente, dentro de cerca de um período de 24 horas, ou são administrados em simultâneo.

Nalgumas utilizações do invento, o uso de combinações de moléculas de ligação específica - CD37 (um ou mais CD37 - moléculas de ligação específicas) e moléculas de ligação específicas de CD20 (uma ou mais moléculas de ligação específicas de CD20) resulta num aumento da redução das células-B. Nalguns desses métodos, as combinações são sinérgicas. Num aspeto relacionado, a invenção proporciona um método de tratamento de um indivíduo que tem, ou com suspeita de ter, uma doença associada com a atividade de células B aberrante.

A presente invenção também fornece moléculas de ligação humanizadas específicas para CD37 (por exemplo, construções humanizadas de TRU-016) e métodos para a redução de células B com o uso dessas moléculas. Em algumas modalidades dos métodos da invenção, é contemplado o uso de combinações de construções humanizadas de TRU-016 com uma ou mais moléculas de ligação específicas para CD20. Em outro aspeto, a invenção fornece métodos de tratamento de indivíduos que possuem, ou com suspeita de terem, uma doença associada à atividade aberrante de células B. Aspetos relacionados da invenção dizem respeito aos métodos de prevenção de qualquer doença como essa e métodos de atenuação de um sintoma associado a uma doença como essa que compreende a administração de uma dose de uma molécula de ligação humanizada específica para CD37 eficaz para

tratar ou evitar tal doença, ou para atenuar um sintoma de tal doença.

"Atividade aberrante de células B" refere-se à atividade de células B que se devia da evolução normal, adequada ou esperada. Por exemplo, atividade aberrante de células B pode incluir a proliferação inadequada de células cujo ADN ou outros componentes celulares se tornaram danificados ou defeituosos. Atividade aberrante de células B pode incluir a proliferação celular cujas características estão associadas a uma doença causada, mediada ou que resulta em níveis inadequadamente elevados de divisão celular, níveis inadequadamente baixos de apoptose, ou ambos. Tais doenças podem ser caracterizadas, por exemplo, por proliferações anormais locais únicas ou múltiplas de células, grupos de células ou tecido(s), sejam elas cancerosas ou não cancerosas, benignas ou malignas. A atividade aberrante de células B também pode incluir produção de anticorpo aberrante, por exemplo, a produção de auto-anticorpos ou a superprodução de anticorpos tipicamente desejável quando produzida em níveis normais. Contempla-se que a atividade aberrante de células B pode ocorrer em certas subpopulações de células B e não em outras subpopulações. A atividade aberrante de células B também pode incluir estimulação inadequada de células T, por exemplo, por apresentação inadequada de antígeno de célula B às células T ou por outras vias que envolvem células B.

"Tratamento" ou "tratamento de" refere-se a um tratamento terapêutico ou a um tratamento profilático/preventivo. Um tratamento terapêutico pode melhorar pelo menos um sintoma de uma doença em um indivíduo que recebe o tratamento, ou

pode retardar a piora de uma doença progressiva em um indivíduo, ou evitar o surgimento de doenças adicionais associadas.

Uma "dose terapeuticamente eficaz" ou "dose eficaz" de uma molécula de ligação específica para CD20 refere-se àquela quantidade do composto suficiente para resultar na atenuação de um ou mais sintomas da doença tratada. Quando aplicada a um ingrediente ativo individual, administrado isoladamente, uma dose terapeuticamente eficaz refere-se àquele ingrediente isoladamente. Quando aplicada a uma combinação, uma dose terapeuticamente eficaz refere-se às quantidades combinadas dos ingredientes ativos que resultam no efeito terapêutico, sejam elas administradas serial ou simultaneamente. A invenção especificamente contempla que uma ou mais moléculas de ligação específicas podem ser administradas de acordo com métodos da invenção, cada uma em uma dose eficaz.

"Um indivíduo que possui, ou com suspeita de ter, uma doença associada à atividade aberrante de células B" é um indivíduo no qual uma doença ou um sintoma de um distúrbio pode ser causado por atividade aberrante de células B, pode ser exacerbado por atividade aberrante de células B, ou pode ser aliviado por regulação da atividade de células B. Exemplos de tais doenças são um cancro de células B (por exemplo, linfoma de células B, uma leucemia de célula B ou um mieloma de célula B), uma doença caracterizada por produção de auto-anticorpo ou uma doença caracterizada por estimulação inadequada de células T causada por apresentação inadequada de antígeno de célula B às células T ou causada por outras vias que envolvem células B.

Num aspeto exemplar, um indivíduo tratado pelos métodos da invenção demonstra uma resposta ao tratamento que é melhor do que, ou aumentada em relação à resposta ao tratamento com rituximab. Uma resposta que é superior em relação ao tratamento com rituximab refere-se a uma resposta clínica em que o tratamento por um método da invenção resulta em uma resposta clínica em um paciente que é melhor do que uma resposta clínica em um paciente submetido à terapia com rituximab, por exemplo, rituximab. Uma resposta superior é avaliada por comparação de critérios clínicos bem conhecidos na técnica e aqui descritos. Critérios exemplares incluem, sem limitação, duração da eliminação de células B, redução dos números globais de células B, redução dos números de células B em uma amostra biológica, redução do tamanho do tumor, redução do número de tumores, existentes e/ou que surgem após o tratamento, e melhora da resposta global, como avaliada pelos próprios pacientes e pelos médicos, por exemplo, com o uso do índice Prognóstico Internacional. A melhora pode ser em um ou mais de um dos critérios clínicos. Uma resposta superior com o método da invenção pode ser causada por uma resposta inadequada a tratamento prévio ou concomitante com rituximab, por exemplo, por causa da toxicidade e/ou eficácia inadequada do tratamento com rituximab.

Cancros de células B incluem linfomas de célula B [por exemplo, as várias formas de doença de Hodgkin, linfoma não Hodgkin (NHL) ou linfomas do sistema nervoso central], leucemias [por exemplo, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfocítica crônica (CLL), leucemia de célula pilosa e leucemia mioblástica crônica] e mielomas (por

exemplo, mieloma múltiplo). Cancros de células B adicionais incluem linfoma linfocítico pequeno, leucemia prolinfocítica de células B, linfoma linfoplasmocítico, linfoma da zona marginal esplénica, mieloma de células plasmáticas, plasmocitoma solitário dos ossos, plasmocitoma extra-ósseo, linfoma de células B da zona marginal extranodal de tecido linfoide associado à mucosa (MALT), linfoma de células B da zona marginal nodal, linfoma folicular, linfoma de célula do manto, linfoma difuso de células B grandes, linfoma mediastinal (tímico) de células B grandes, linfoma intravascular de células B grandes, linfoma de efusão primária, linfoma/leucemia de Burkitt, proliferações de células B de potencial maligno incerto, granulomatose linfomatóide e distúrbio linfoproliferativo pós-transplante.

Distúrbios caracterizados por produção de auto- anticorpo são frequentemente considerados doenças autoimunes. Doenças autoimunes incluem, sem limitação: artrite, artrite reumatoide, artrite reumatoide juvenil, osteoartrite, policondrite, artrite psoriática, psoríase, dermatite, polimiosite/dermatomiosite, miosite de corpo de inclusão, miosite inflamatória, necrólise epidérmica tóxica, esclerodermia e esclerose sistêmicas, síndrome de CREST, respostas associadas à doença inflamatória do intestino, doença de Crohn, colite ulcerativa, síndrome do sofrimento respiratório, síndrome do sofrimento respiratório do adulto (ARDS), meningite, encefalite, uveíte, colite, glomerulonefrite, condições alérgicas, eczema, asma, condições que envolvem a infiltração de células T e respostas inflamatórias crônicas, aterosclerose, miocardite autoimune, deficiência de adesão de leucócitos, lúpus

eritematoso sistêmico (LES), lúpus eritematoso cutâneo subagudo, lúpus discoide, mielite do lúpus, cerebrite do lúpus, diabetes de surgimento juvenil, esclerose múltipla, encefalomielite alérgica, neuromielite ótica, febre reumática, coreia de Sydenham, respostas imunológicas associadas à hipersensibilidade aguda e retardada mediada por citocinas e linfócitos T, tuberculose, sarcoidose, granulomatose, incluindo granulomatose de Wegener e doença de Churg-Strauss, agranulocitose, vasculite (incluindo vasculite/angeíte por hipersensibilidade, ANCA e vasculite reumatoide), anemia aplásica, anemia de Diamond Blackfan, anemia hemolítica imune, incluindo anemia hemolítica autoimune (AIHA), anemia perniciosa, aplasia pura de células vermelhas (PRCA), deficiência de Fator VIII, hemofilia A, neutropenia autoimune, pancitopenia, leucopenia, doenças que envolvem diapedese leucocitária, distúrbios inflamatórios do sistema nervoso central (SNC), síndrome de lesão de múltiplos órgãos, miastenia grave, doenças mediadas por complexo antígeno-anticorpo, doença da membrana basal antiglomerular, síndrome do anticorpo anti-fosfolipídeo, neurite alérgica, doença de Behcet, síndrome de Castleman, síndrome de Goodpasture, síndrome miasténica de Lambert-Eaton, síndrome de Reynaud, síndrome de Sjörgen, síndrome de Stevens-Johnson, rejeição de transplante de órgão sólido, doença enxerto versus hospedeiro (GVHD), penfigoide bolhoso, pênfigo, poliendocrinopatias autoimunes, espôndilo-artropatias soronegativas, doença de Reiter, síndrome da pessoa rígida (stiff-man), arterite de célula gigante, nefrite por complexo imune, nefropatia por IgA, polineuropatias por IgM ou neuropatia mediada por IgM, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), púrpura trombocitopénica trombótica

(TTP), púrpura de Henoch-Schonlein, trombocitopenia autoimune, doença autoimune do testículo e do ovário, incluindo orquite e ooforite autoimunes, hipotireoidismo primário; doenças endócrinas autoimune, incluindo tireoidite autoimune, tireoidite crônica (tireoidite de Hashimoto), tireoidite subaguda, hipotireoidismo idiopático, doença de Addison, doença de Grave, síndromes poliglandulares autoimunes (ou síndromes de endocrinopatia poliglandular), diabetes do Tipo I, também denominado diabetes melito insulino-dependente (IDDM) e síndrome de Sheehan; hepatite autoimune, pneumonite intersticial linfóide (HIV), bronquiolite obliterante (não-transplante) vs NSIP, síndrome de Guillain-Barré, vasculite de grandes vasos (incluindo polimialgia reumática e arterite de célula gigante (de Takayasu)), vasculite de vasos médios (incluindo doença de Kawasaki e poliartrite nodosa), poliartrite nodosa (PAN) espondilite anquilosante, doença de Berger (nefropatia por IgA), glomerulonefrite rapidamente progressiva, cirrose biliar primária, doença celíaca (enteropatia por glúten), crioglobulinemia, crioglobulinemia associada à hepatite, esclerose lateral amiotrófica (ALS), doença arterial coronariana, febre familiar do Mediterrâneo, poliangeíte microscópica, síndrome de Cogan, síndrome de Whiskott-Aldrich e tromboangeíte obliterante.

A artrite reumatoide (AR) é uma doença crônica caracterizada por inflamação das articulações, causando edema, dor e perda da função. Pacientes que possuem AR por um período prolongado normalmente exibem destruição, deformidade, incapacidade articulares progressivas, e até mesmo morte prematura.

A doença de Crohn e uma doença relacionada, a colite ulcerativa, são as duas principais categorias de doenças que pertencem a um grupo de patologias denominado doença inflamatória do intestino (IBD). A doença de Crohn é um distúrbio crônico que causa inflamação do trato digestivo ou gastrointestinal (GI). Embora possa envolver qualquer área do trato GI, da boca ao ânus, afeta mais comumente o intestino delgado e/ou cólon. Na colite ulcerativa, o envolvimento GI é limitado ao cólon.

A doença de Crohn pode ser caracterizada por anticorpos contra antígenos de neutrófilos, ou seja, o "anticorpo perinuclear anti-neutrófilos" (pANCA), e *Saccharomyces cerevisiae*, ou seja o "anticorpo anti- *Saccharomyces cerevisiae*" (ASCA). Muitos pacientes com colite ulcerativa possuem o anticorpo pANCA no sangue, mas não o anticorpo ASCA, enquanto muitos pacientes com doença de Crohn exibem anticorpos ASCA, e não anticorpos pANCA. Um método de avaliação da doença de Crohn é a utilização do índice da Atividade da Doença de Crohn (CDAI), baseado em 18 pontuações variáveis indicadoras coletadas por médicos. Os valores CDAI de 150 ou menos estão associados à doença quiescente; valores acima daquele indicam doença ativa, e valores acima 450 são observados na doença extremamente grave [Best e cols., "Development of an Crohn's disease activity index", *Gastroenterology* 70: 439-444 (1976)]. No entanto, desde o estudo original, alguns pesquisadores utilizam um "valor subjetivo" de 200 a 250 como uma pontuação saudável.

O lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune causada por lesões recorrentes dos vasos sanguíneos em

vários órgãos, incluindo o rim, a pele e as articulações. Em pacientes com LES, uma interação defeituosa entre células T e células B causa a produção de auto-anticorpos que atacam o núcleo das células. Há uma concordância geral de que os auto-anticorpos são responsáveis pelo LES e, portanto, novas terapias que eliminam a linhagem de células B, permitindo que o sistema imunológico seja reinicializado à medida que são geradas novas células B a partir de precursores, dariam esperança de benefícios duradouros nos pacientes com LES.

A esclerose múltipla (EM) também é uma doença autoimune. Caracteriza-se por inflamação do sistema nervoso central e destruição de mielina, que isola as fibras das células nervosas no cérebro, medula espinhal e no corpo. Embora a causa da EM seja desconhecida, acredita-se amplamente que células T autoimunes sejam os fatores primários para a patogénese da doença. No entanto, estão presentes níveis elevados de anticorpos no líquido cefalorraquidiano de pacientes com EM, e algumas teorias preveem que a resposta de células B que leva à produção de anticorpos é importante para o desenvolvimento da doença.

A doença autoimune da tireoide resulta da produção de auto-anticorpos que tanto estimula a tireoide para causar hipertireoidismo (doença de Graves) quanto destrói a tireoide causando hipotireoidismo (tireoidite de Hashimoto). A estimulação da tireoide é causada por auto-anticorpos que se ligam e ativam o recetor do hormônio estimulante da tireoide (TSH). A destruição da tireoide é causada por auto-anticorpos que reagem com outros antígenos tireoidianos.

A síndrome de Sjögren é uma doença autoimune caracterizada por destruição das glândulas do corpo produtoras de umidade.

A púrpura trombocitopénica imune (PTI) é causada por auto-anticorpos que se ligam às plaquetas sanguíneas e causam sua destruição.

A Miastenia grave (MG) é um distúrbio neuromuscular autoimune crônico caracterizado por auto-anticorpos que se ligam a recetores de acetilcolina expressos nas junções neuromusculares causando fraqueza dos grupos musculares voluntários.

A psoríase é caracterizada por inflamação autoimune na pele e também está associada à artrite em 30% dos casos, esclerodermia, doença inflamatória do intestino, incluindo doença de Crohn e colite ulcerativa.

Também é contemplado o tratamento de miopatia inflamatória idiopática (MII), incluindo dermatomiosite (DM) e poliomiosite (PM). As miopatias inflamatórias foram caracterizadas com o uso de diversos esquemas de classificação. O esquema de classificação de Miller (Miller, Rheum. Dis. Clin. North Am. 20: 811-826, 1994) identifica 2 miopatias inflamatórias idiopáticas (MII), poliomiosite (PM) e dermatomiosite (DM).

A poliomiosite e a dermatomiosite são doenças inflamatórias crônicas, debilitantes, que envolvem os músculos e, no caso de DM, a pele. Esses distúrbios são raros, com uma incidência anual relatada de aproximadamente 5 a 10 casos

por milhão de adultos, e de 0,6 a 3,2 casos por milhão de crianças por ano nos Estados Unidos (Targoff, Curr. Probl. Dermatol. 1991, 3: 131-180). A miopatia inflamatória idiopática está associada a uma morbidade e uma mortalidade significativas, com até metade dos adultos afetados apresentando um grau de invalidez importante (Gottdiener e cols., Am. J. Cardiol. 1978, 41: 1.141-49). Miller (Rheum. Dis. Clin. North Am. 1994, 20: 811-826 e "Arthritis and Allied Conditions", Capítulo 75, Eds. Koopman e Moreland, Lippincott Williams e Wilkins, 2005) definem cinco grupos de critérios usados para o diagnóstico de MII, ou seja, avaliação dos Critérios para Miopatia Inflamatória Idiopática (IIMC), incluindo fraqueza muscular, evidências de degeneração na biópsia, elevação dos níveis séricos de enzimas associadas aos músculos, tríade eletromagnética de miopatia, evidências de erupções na dermatomiosite, e também incluem evidências de auto- anticorpos como critérios secundários.

Fatores associados à MII, incluindo enzimas associadas aos músculos e auto-anticorpos, incluem, sem limitação, creatina quinase (CK), lactato desidrogenase, aldolase, proteína C-reativa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e auto-anticorpo antinuclear (ANA), anticorpos específicos para miosite (MSA), e anticorpo para antígenos nucleares passíveis de extração.

Uma "molécula de ligação" de acordo com a invenção pode ser, por exemplo, uma proteína (uma "proteína" pode ser um polipeptídeo ou um peptídeo), um ácido nucleico, um carboidrato, um lipídeo ou um composto de pequena molécula que se liga a um alvo. Um tipo de molécula de ligação

proteínácea contemplada pela invenção é um anticorpo ou um fragmento de anticorpo que retém a atividade de ligação. Uma molécula de ligação pode ser modificada de acordo com métodos padronizados na técnica para melhorar sua afinidade de ligação, diminuir sua imunogenicidade, alterar suas funções efetoras e/ou aumentar sua disponibilidade no corpo de um indivíduo. Tais modificações podem incluir, por exemplo, modificações da sequência de aminoácidos ou expressão como uma proteína de fusão. Essas proteínas de fusão também são moléculas de ligação de acordo com a invenção. Uma molécula de ligação exemplar da invenção é um pequeno produto imuno-farmacêuticos modular (SMIP™).

Uma molécula de ligação que é "específica" para um alvo se liga àquele alvo com uma afinidade maior do que a qualquer outro alvo. Por exemplo, uma molécula de ligação específica para CD37 se liga a CD37 com uma afinidade maior do que a qualquer outro alvo e uma molécula de ligação específica para CD20 se liga a CD20 com uma afinidade maior do que a qualquer outro alvo. As moléculas de ligação da invenção podem ter afinidades por seus alvos de um K_a maior ou igual a cerca de 10^4 M^{-1} , de preferência, maior ou igual a cerca de 10^5 M^{-1} , mais preferivelmente, maior ou igual a cerca de 10^6 M^{-1} e, ainda mais preferivelmente, maior ou igual a cerca de 10^7 M^{-1} . Afinidades ainda maiores do que cerca de 10^7 M^{-1} são ainda mais preferidas, por exemplo, afinidades iguais ou maiores do que cerca de 10^7 M^{-1} , cerca de 10^8 M^{-1} e cerca de 10^9 M^{-1} , e cerca de 10^{10} M^{-1} . As afinidades das moléculas de ligação de acordo com a presente invenção podem ser facilmente determinadas com o uso de técnicas convencionais, por exemplo, aquelas descritas por Scatchard e cols., Ann. N.Y. Acad. Sei. 51: 660 (1949).

Certas moléculas de ligação específicas para CD37 contempladas pela invenção possuem afinidades por CD37 de cerca de 0,5 a cerca de 10 nM. Certas moléculas de ligação específicas para CD20 contempladas pela invenção possuem afinidades por CD20 de cerca de 1 a cerca de 30 nM.

Outra característica de certas moléculas de ligação a CD37 e moléculas de ligação a CD20 contempladas pela invenção é que elas exibem uma meia-vida na circulação de cerca de 7 a cerca de 30 dias.

Os anticorpos específicos para CD37 que caracterizaram o antígeno CD37 no "Terceiro Seminário de HLDA" foram HD28, G28-1, HH1, BI14, WR17 e F93G6. Veja, Ling e MacLennan, pp. 302-335 em "Leucocyte Typing III. White Cell Differentiation Antigens", Oxford University Press (1987). Outros anticorpos específicos para CD37 que foram descritos incluem RFB-7, Y29/55, MB-1, M-B371, M-B372 e IPO-24. Veja Moldenhaurer, J. Biol., Regul. Homeost. Agents, 14: 281-283 (2000), que estabelece que todos esses anticorpos reconhecem apenas um epitopo de CD37. Schwartz-Albiez e cols., 14: 905-914 (1988) indicam que o epitopo está situado na porção de carboidrato do CD37. Outro anticorpo específico para CD37 é S-B3 (Biosys).

Patentes e publicações de patentes que descrevem anticorpos de CD20 incluem Patentes U.S. N^{os} 5.776.456, 5.736.137, 6.399.061 e 5.843.439, bem como os pedidos de patente U.S. N^{os} US 2002/0197255 A1 e US 2003/0021781 A1 (Anderson e cols.); Patente U.S. N^o 6.455.043 B1 e WO 00/09160 (Grillo-Lopez, A.); WO 00/27428 (Grillo-Lopez e White); WO 00/27433 (Grillo-Lopez e Leonard); WO 00/44788 (Braslawsky e cols.);

WO 01/10462 (Rastetter, W.); WO 01/10461 (Rastetter e White); WO 01/10460 (White e Grillo- Lopez); Pedido U.S. N° US 2002/0006404 e WO 02/04021 (Hanna e Hariharan); pedido U.S. N° US 2002/0012665 A1 e WO 01/74388 (Hanna, N.); pedido U.S. N° US 2002/0009444 A1, e WO 01/80884 (Grillo- Lopez, A.); WO 01/97858 (White, C.); pedido U.S. N° US 2002/0128488 A1 e WO 02/34790 (Reff, M.); WO 02/060955 (Braslawsky e cols.); WO 02/096948 (Braslawsky 30 e cols.); WO 02/079255 (Reff e Davies); Patentes U.S. N°s 6.171.586 B1 e WO 98/56418 (Lam e cols.); WO98/58964 (Raju, S.); WO 99/22764 (Raju, S.); WO 99/51642, Patente U.S. N° 6.194.551 B1, Patente U.S. N° 6.242.195 B1, Patente U.S. N° 6.528.624 B1 e Patente U.S. N° 6.538.124 (Idusogie e cols.); WO 00/42072 (Presta, L.); WO 00/67796 (Curd e cols.); WO 01/03734 (Grillo-Lopez e cols.); pedido U.S. N° US 2002/0004587 A1 e WO 01/77342 (Miller e Presta); pedido U.S. No US 2002/0197256 (Grewal, I.); Patentes U.S. Nos 6.090.365 B1, 6.287.537 B1, 6.015.542, 5.843.398 e 5.595.721, (Kaminski e cols.); Patentes U.S. N°s 5.500.362, 5.677.180, 5.721.108 e 6.120.767 (Robinson e cols.); Patente U.S. N° 6.410.391 B1 (Raubitschek e cols.); Patentes U.S. N°s 6.224.866 B1 e WO 00/20864 (Barbera-Guillem, E.); WO 01/13945 (Barbera-Guillem, E.); WO 00/67795 (Goldenberg) ; WO 00/74718 (Goldenberg e Hansen); WO 00/76542 (Golay e cols.); WO 01/72333 (Wolin e Rosenblatt); Patente U.S. N° 6.368.596 B1 (Ghetie e cols.); Pedido U.S. N° US 2002/0041847 A1, (Goldenberg, D.); Pedido U.S. N° US 2003/0026801 A1 (Weiner e Hartmann); WO 02/102312 (Engleman, E.), cada um deles é expressamente aqui incorporado por referência. Veja também, Patente U.S. N° 5.849.898 e Pedido E.P. N° 330.191 (Seed e cols.);

Patente U.S. N° 4.861.579 e EP 332.865 A2 (Meyer e Weiss); e WO 95/03770 (Bhat et al.).

Rituximab foi aprovado para uso clínico humano como Rituxan®. Rituxan® é considerado como sendo uma molécula de ligação específica para CD20 da invenção.

Produtos imuno-farmacêuticos modulares pequenos (SMIPs) são considerados como sendo um tipo de molécula de ligação da invenção. Métodos para a fabricação de SMIPs foram descritos previamente no pedido U.S. de co-propriedade N° 10/627.556 e nas Publicações de Patente U.S. 20030133939, 20030118592 e 20050136049, que são aqui incorporadas por referência em sua totalidade. SMIPs são proteínas de fusão de domínio de ligação-imunoglobulina inéditas que geralmente apresentam um domínio de ligação para uma estrutura cognata, por exemplo, um antígeno, um contra-recetor ou outros mais, um polipeptídeo da região de dobradiça de IgG1, IGA ou IgE ou um polipeptídeo da região de dobradiça de IgG1 mutante que possui zero, um ou dois resíduos de cisteína, e domínios CH2 e CH3 de imunoglobulina. Em uma modalidade, a molécula do domínio de ligação tem um ou dois resíduos de cisteína (Cys) na região de dobradiça. Em uma modalidade relacionada, quando a molécula do domínio de ligação compreende dois resíduos Cys, o primeiro Cys, que está envolvido na ligação entre a cadeia pesada e a cadeia leve, não é eliminado ou substituído por um aminoácido.

As moléculas do domínio de ligação úteis nos métodos da invenção são contempladas como tendo uma ou mais regiões de ligação, tais como regiões de ligação variáveis da cadeia

leve e regiões de ligação variáveis da cadeia pesada derivadas de um ou mais membros da superfamília das imunoglobulinas, por exemplo, uma imunoglobulina. Além disso, essas regiões estão tipicamente separadas por peptídeos vinculadores, que podem ser qualquer peptídeo vinculador conhecido na técnica para ser compatível com a junção do domínio ou região em uma molécula de ligação. Vinculadores exemplares são vinculadores que se baseiam no motivo vinculador Gly₄Ser, por exemplo, (Gly₄Ser)_n, em que n = 1-5. As moléculas para uso nos métodos da invenção também contêm sequências de aminoácidos suficientes derivadas de uma região constante de uma imunoglobulina para fornecer uma função efetora, de preferência, ADCC e/ou CDC. Dessa forma, as moléculas terão uma sequência derivada de um domínio CH₂ de uma imunoglobulina ou domínios CH₂ e CH₃ derivados de uma ou mais imunoglobulinas. SMIPs são capazes de ADCC e/ou CDC, mas têm sua habilidade para formar multímeros ligados por dissulfeto comprometida.

A invenção inclui polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 que exibem pelo menos 80 por cento de identidade para o polipeptídeo apresentado no ID. DE SEQ. N°: 2, em que o polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 se liga a CD37. Em um aspecto, os polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 compreendem qualquer sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. 48, e 52. Em outro aspecto, os polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 compreendem pelo menos uma modificação de aminoácido em uma região determinante de complementaridade (CDR) selecionada do grupo que consiste em: CDR1 da cadeia leve, CDR1 da

cadeia pesada, CDR2 da cadeia leve, CDR2 da cadeia pesada, CDR3 da cadeia leve e CDR3 da cadeia pesada.

Em uma modalidade, a divulgação inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 61 (RASENVYSYLA). A invenção também inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 62 (RTSENVYSYLA). A invenção ainda inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR1 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 63 (GYMNM).

Em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 64 (FAKTLAE). A invenção também inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 65 (NIDPYYGGTTTYNRKFKG).

Numa modalidade adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 66 (QHHSNPWT). A invenção ainda inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 67 (SVGPFDY). A invenção ainda inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 68 (SVGPFDS). A

invenção também inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 69 (SVGPM DY).

Noutro aspeto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que compreende pelo menos uma, pelo menos duas ou pelo menos três sequências das sequências de aminoácidos da CDR da cadeia leve selecionadas do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 61, 62, 64 e 66. Ainda em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que compreende uma sequência de aminoácidos da CDR1 da cadeia leve dos IDS. DE SEQ. N°s: 61 ou 62, ou uma variante desta, na qual um ou dois aminoácidos dos IDS. DE SEQ. N°s: 61 ou 62 foram alterados; uma sequência de aminoácidos da CDR2 da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 64, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 64 foram alterados; e uma sequência de aminoácidos da CDR3 da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 66, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 66 foram alterados.

Ainda noutro aspeto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que compreende pelo menos uma, pelo menos duas ou pelo menos três sequências de aminoácidos da CDR da cadeia pesada selecionadas do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 63, 65 e 67-69. Em uma modalidade adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que compreende uma sequência de aminoácidos da CDR1, da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 63, ou uma variante desta, em que um ou dois

aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 63 foram alterados; uma sequência de aminoácidos da CDR2 da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 65, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 65 foram alterados; e uma sequência de aminoácidos da CDR3 da cadeia pesada selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 67-69, ou uma variante desta na qual um ou dois aminoácidos de qualquer um dos IDS. DE SEQ. Nos: 67-69 foram alterados.

A divulgação também inclui polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 que compreendem pelo menos uma modificação de aminoácido em uma região estrutural (FR) selecionada do grupo que consiste em: FR1 da cadeia leve, FR1 da cadeia pesada, FR2 da cadeia leve, FR2 da cadeia pesada, FR3 da cadeia leve, FR3 da cadeia pesada, FR4 da cadeia leve e FR4 da cadeia pesada. Em uma modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a primeira região estrutural (FR1) da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 70 (EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC). Em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR1 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 71 (EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT). Ainda em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 72 (WYQQKPGQAPRLLIY). Em uma modalidade adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 73 (WVRQMPGKGLEWMG). Ainda em outra modalidade, a invenção

inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 74 (GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC). Ainda noutra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 75 (QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR). Ainda em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR4 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 76 (FGQGTKVEIK). Ainda em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR4 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 77 (WGQGLTVTVSS). Ainda em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR4 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 78 (WGRGLTVTVSS).

A invenção ainda inclui polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 que compreendem pelo menos uma, pelo menos duas ou pelo menos três sequências das sequências de aminoácidos da FR da cadeia leve selecionadas do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 70, 72, 74 e 76. Em uma modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que compreende uma sequência de aminoácidos da FR1 da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 70, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 70 foram alterados; uma sequência de aminoácidos da FR2 da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 72, ou uma variante desta, em que um ou dois

aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 72 foram alterados; uma sequência de aminoácidos da FR3 da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 74, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 74 foram alterados; e uma sequência de aminoácidos da FR4 da cadeia leve do ID. DE SEQ. N°: 76, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 76 foram alterados.

Além disso, a invenção inclui polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 que compreendem pelo menos uma, pelo menos duas ou pelo menos três sequências das sequências de aminoácidos da FR da cadeia pesada selecionadas do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 71, 73, 75, 77 e 78. Em uma modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que compreende uma sequência de aminoácidos da FR1 da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 71, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 71 foram alterados; uma sequência de aminoácidos da FR2 da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 73, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 73 foram alterados; uma sequência de aminoácidos da FR3 da cadeia pesada do ID. DE SEQ. N°: 75, ou uma variante desta, em que um ou dois aminoácidos do ID. DE SEQ. N°: 75 foram alterados; e uma sequência de aminoácidos da FR4 da cadeia pesada dos IDS. DE SEQ. Nos: 77 ou 78, ou uma variante desta, na qual um ou dois aminoácidos dos IDS. DE SEQ. Nos: 77 ou 78 foram alterados.

A invenção também inclui uma molécula de ácido nucleico isolado que compreende uma sequência de nucleótidos que codifica um polipeptídeo SMIP humanizado específico para

CD37 que exibe pelo menos 80 por cento de identidade para o polipeptídeo apresentado no ID. DE SEQ. N°: 2, em que o polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 se liga a CD37. Uma molécula de ácido nucleico isolado como essa pode compreender uma sequência de nucleótidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 79, 81, 83, 85 e 87. Em uma modalidade, a invenção inclui vetores que compreendem essas moléculas de ácido nucleico e células hospedeiras que compreendem os vetores.

A divulgação também inclui processos de produção dos polipeptídeos aqui descritos, que compreendem o cultivo das células hospedeiras sob condições adequadas para expressar os polipeptídeos e, opcionalmente, o isolamento dos polipeptídeos da cultura.

Ainda em outro aspeto, a invenção inclui composições que compreendem os polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável.

A invenção ainda inclui o uso do SMIP específico para CD37 ou das moléculas de ligação específicas para CD37 aqui descritos em qualquer um dos métodos da invenção. Tais métodos incluem o uso de qualquer SMIP específico para CD37 ou molécula de ligação específica para CD37 que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 80, 82, 84, 86 e 88.

Ainda em outro aspeto, a invenção inclui kits para a redução de células B que compreendem as composições da invenção; e protocolos para a utilização dos kits para reduzir células B. Tais kits podem ainda compreender uma ou 30 mais moléculas de ligação específica para CD20. A invenção contempla que uma molécula de ligação específica para CD20 como essa é TRU-015.

A invenção também inclui polipeptídeos SMIP humanizados específicos para CD37 que compreendem uma CDR1, uma CDR2 e uma CDR3, que exibem pelo menos 80 por cento de identidade para o polipeptídeo apresentado no ID. DE SEQ. N°: 2. Polipeptídeos SMIP específicos para CD37 como esses podem ainda compreender um domínio estrutural humano separando cada uma das CDR1, CDR2 e CDR3.

Em outro aspeto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que exhibe pelo menos 80 por cento de identidade para o polipeptídeo apresentado no ID. DE SEQ. N°: 2, em que o polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 se liga a CD37 e compreende um polipeptídeo da região de dobradiça que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N°s: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108 110, 112, 114, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 126 e 127.

A divulgação também contempla um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 que exhibe pelo menos 80 por cento de identidade para o polipeptídeo apresentado no ID. DE SEQ. N°: 2, em que o polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37 se liga a CD37 e compreende um

vinculador que compreende (Gly4Ser)_n, em que n é 1, 2, 3, 4, 5 ou 6.

Ainda em um aspecto adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 128 (RTSQNVYSYLA), 129 (RTSESVYSYLA), 130 (RASQSVYSYLA), 131 (RASQSVSSYLA) e 132 (RASQSVSYLA). Em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR1 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. NOS: 133 (SYMNM) e 134 (SYWIG). Em uma modalidade adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 135 (AASSLQS), 136 (GASTRAT) e 137 (DASNRAT). Ainda em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 13 8 (IIYPGDS DTRYSPSFQG) e 13 9 (RIDPSDSYTNYSFSFQG).

A divulgação também inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos do ID. DE SEQ. N^o: 220 (QHHSDNPWT). Em outra modalidade, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a CDR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 211 (SVGPM DY), 212 (SVGPF DY), 213 (SVGPM DV), 214 (SVGPF DS), 215

(SVGPFDP), 216 (SVGPFQH), 217 (SVGPFDV), 218 (SVGPFDI) e 219 (SVGPFDL).

Ainda um aspecto adicional, a divulgação inclui polipeptídeos SMIP específicos para CD37 com regiões estruturais alternativas. Em um aspecto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR1 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 170-181. Em outro aspecto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR1 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 140-146. Ainda em um aspecto adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR2 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 182-193. Ainda em outro aspecto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR2 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 147-153. Em um aspecto adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR3 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 194-205. Ainda em outro aspecto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR3 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 154-160. Em um aspecto adicional, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR4 da cadeia leve compreende a sequência de aminoácidos

selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. Nos: 206-210. Ainda em outro aspeto, a invenção inclui um polipeptídeo SMIP humanizado específico para CD37, em que a FR4 da cadeia pesada compreende a sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 161-169.

SMIPs específicos para CD37 exemplares úteis na invenção incluem, sem limitação: G28-1 scFv (SSS-S) H WCH2 WCH3, que consiste em um G28-1 Fv de cadeia única no qual todos os três resíduos de cisteína nas regiões de conexão ou de dobradiça são mutados para resíduos de serina, e domínios CH2 e CH3 do tipo selvagem; G28-1 scFv IgAH WCH2 WCH3, que compreende uma dobradiça de IgA e domínios WT de IgG1; G28-1 scFv VHL11S (SSS-S) H WCH2 CH3, em que todos os três resíduos de cisteína nas regiões de conexão ou de dobradiça são mutados para resíduos de serina, e a leucina na posição 11 da região variável da cadeia pesada é substituída por uma serina; G28-1 scFv VHL11S (CSS-S) H WCH2 CH3, em que os resíduos de cisteína foram substituídos na segunda e na terceira posições por serina; G28-1 scFv VHL11 S (CSC-S) H WCH2 CH3, em que os resíduos de cisteína foram substituídos na segunda posição por serina; G28-1 scFv VH11S (SSC-P) H WCH2 WCH3 (aqui denominado TRU-016), em que o primeiro e o segundo resíduo de cisteína nas regiões de conexão ou de dobradiça são mutados para resíduos de serina, e a leucina na posição 11 da região variável da cadeia pesada é substituída por uma serina; G28-1 scFv VH11S (SCS-S) H WCH2 WCH3, em que o primeiro e o terceiro resíduos de cisteína nas regiões de dobradiça são mutados para resíduos de serina; G28-1 scFv VHL11S (SSC-P) H WCH2 WCH3, em que o terceiro resíduo de cisteína na região de dobradiça é

substituído por uma serina; G28-1 scFv VHL11 S (SCC-P) H WCH2 WCH3, em que a primeira cisteína é substituída por uma serina; G28-1 scFv VHL11S mlgE CH2 CH3 CH4, que compreende regiões CH 2-4 de IgE de camundongo nas quais a leucina na posição 11 da região variável da cadeia pesada é substituída por uma serina; G28-1 scFv VHL11S mlgA WlgACH2 T4CH3, que compreende uma dobradiça de IgA de camundongo com uma CH2 de IgA do tipo selvagem e um domínio CH3 de IgA truncado desprovido dos 4 aminoácidos carboxi GTCY; G28-1 scFv VHL11 S hlgE CH2 CH3 CH4, que compreende regiões CH de IgE nas quais a leucina na posição 11 da região variável da cadeia pesada é substituída por uma serina; e G28-1 scFv VHL11 S hlgAH WlgACH2 TCH3, que compreende uma dobradiça de IgA, uma CH2 de IgA do tipo selvagem e uma CH2 de IgA truncada e um domínio CH3 de IgA truncado desprovido dos 4 aminoácidos carboxi GTCY.

SMIPs exemplares específicos para CD20 úteis na invenção incluem SMIPs derivados do anticorpo monoclonal •anti-CD20 2H7 descrito nas Publicações de Patente U.S. 2003133939 e 20030118592. Os SMIPs incluem 2H7scFv-Ig ou um derivado deste. Derivados incluem CytoxB-MHWTG1C, que tem um domínio Fc de IgG1 humana, e um domínio de dobradiça de IgG1 mutante; CytoxB-MHMG1C, que compreende um domínio Fc mutado; MG1H/MG1C, que compreende um recetor Fc com um resíduo de leucina mutado 234; CytoxB-IgAHWTHG1C, que compreende uma porção da dobradiça de IgA humana fundida ao domínio Fc humano do tipo selvagem; 2H7 scFv-lhama IgG1, que compreende a dobradiça de IgG1 de lhama e regiões CH2CH3, 2H7 scFv-llama IgG2, que compreende as regiões de dobradiça e CH2CH3 de IgG2 de lhama; 2H7 scFv-llama IgG3,

que compreende as regiões de dobradiça e CH2CH3 de IgG3 de llama.

2H7 scFv MTH (SSS) WTCH2CH3, em que todos os três resíduos de cisteína nas regiões de conexão ou de dobradiça são mutados para resíduos de serina, e domínios CH2 e CH3 do tipo selvagem; 2H7 scFv MTH (SSC), em que os dois primeiros resíduos de cisteína foram substituídos por resíduos de serina; 2H7 scFv MTH (SCS), em que a primeira e a terceira cisteínas foram substituídas por resíduos de serina; 2H7 scFv MTH (CSS) WTCH2CH3, em que os resíduos de cisteína foram substituídos na segunda e na terceira posições por serina; 2H7 scFv VH 11 SER IgG MTH (SSS) WTCH2CH3, em que a leucina na posição 11 na região variável da cadeia pesada é substituída por serina; 2H7 scFv IgA hinge-IgG1 CH2-CH3, que compreende uma região de dobradiça de IgA e domínios WT de IgG1; 2H7 scFv IgA hinge-CH2-CH3, que compreende uma dobradiça de IgA, regiões CH2-3; 2H7 IgAWH IgACH2-T4CH3, que compreendem uma dobradiça de IgA, uma CH2 de IgA do tipo selvagem e um domínio CH3 de IgA truncado desprovido dos 4 aminoácidos carboxi GTCY.

Derivados com mutações na região CH3 de IgG incluem 2H7 scFv MTH WTCH2 MTCH3 Y405, no qual o resíduo de fenilalanina na posição 405 (numeração de acordo com Kabat e cols. supra) foi substituído por tirosina; 2H7 scFv MTH WTCH2 MTCH3 A405, em que a fenilalanina na posição 405 foi substituída por uma alanina; scFv MTH WTCH2 MTCH3 A407, em que o resíduo de tirosina na posição 407 foi substituído por uma alanina; scFv MTH WTCH2 MTCH3 Y405A407, que compreende as duas mutações; e scFv MTH WTCH2 MTCH3 A405A407, que compreende duas mutações.

2H7 scFv MTH (CCS) WTCH2CH3 é uma construção com o terceiro resíduo de cisteína na região de dobradiça de IgG1 substituído por um resíduo de serina. SMIP 2H7 scFv IgG MTH (SSS) MTCH2WTCH3 compreende um domínio de dobradiça mutante (MT (SSS)) e um domínio CH2 mutante, em que a prolina no resíduo 238 (de acordo com Ward e cols.) foi substituída por uma serina.

Derivados 2H7scFv-Ig também incluem mutantes 2H7 scFv com mutações pontuais na região variável da cadeia pesada. Todas as construções a seguir compreendem mutações em que a leucina na posição 11 na região variável da cadeia pesada é substituída por serina; 2H7 scFv VHL11SER IgG MTH (SSS-S) WTCH2CH3, 2H7scFv VHL11S (CSS-S) H WCH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada como apresentada acima; 2H7scFv VHL11S (CSC-S) H WCH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada como apresentada acima; 2H7 scFv VHL11S IgAH IgACH2 T4CH3, que compreende a dobradiça de IgA, WT IgA CH2 e CH3 truncada de IgA; 2H7 scFv VHL11S IgECH2 CH3 CH4, que compreende as regiões CH 2-4 de IgE; 2H7 VHL11S scFv (SSS-S) IgECH3CH4, que compreende uma região de dobradiça mutada e regiões CH3 e CH4 de IgE; 2H7 scFv VHL11S mlgE CH2 CH3 CH4, que compreende regiões de IgE de camundongo; 2H7 scFv VHL11S mlgAH WIGACH2 T4CH3, que compreende as mutações descritas acima e uma região constante de IgA de camundongo que consiste em uma região CH2 do tipo selvagem e uma região CH3 mutada; 2H7 scFv VHL11S (SSS-S) H K322S CH2 WCH3, que compreende uma mutação na região CH2 de IgG1 humana no resíduo 322, em que lisina foi trocada por serina; 2H7 scFv VHL11S (CSS-S) H K322S CH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada como descrito acima e uma região CH2 mutada como descrito

previamente; 2H7 scFv VHL11S (SSS-S) H P331S CH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada como descrito acima, e uma região CH2 mutada em que a prolina no resíduo 331 foi trocada por uma serina; 2H7 scFv VHL11S (CSS-S) H P331S CH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada e uma mutação de prolina por serina no resíduo 331 na região CH2; 2H7 SCFv VHL11S (SSS-S) H T256N CH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada e uma mutação de treonina por asparagina no resíduo 256 na região CH2; 2H7 scFv VHL11S (SSS-S) H RTPE/QNAK (255-258) CH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada e uma série de mutações nas quais os resíduos 255-258 foram mutados de arginina, treonina, prolina, ácido glutâmico para glutamina, asparaginas, alanina e lisina, respectivamente; 2H7 scFv VHL11S (SSS-S) H K290Q CH2 WCH3, que compreende regiões de dobradiça mutadas e uma troca de lisina por glutamina na posição 290; 2H7 scFv VHL11S (SSS-S) H A339P CH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada e uma troca de alanina por prolina na posição 339; SMIP 2H7 scFv (SSS-S) H P238SCH2 WCH3, que compreende uma região de dobradiça mutada e uma troca de prolina por serina na posição 238 em CH2, que é a mesma que 2H7 scFv IgG MTH (SSS) MTCH2WTCH3. 2H7 scFv IgAH IGAHCH2 T18CH3, que compreende uma região de dobradiça de IgA do tipo selvagem e uma região CH2 e uma região CH3 com uma truncagem de 18 aminoácidos na extremidade carbóxi.

Uma molécula de ligação da invenção pode compreender um domínio extracelular nativo ou projetado de outra proteína, o que aumenta a atividade da molécula de ligação. Em uma modalidade, o domínio extracelular é selecionado do grupo que consiste em CD154 e CTLA4.

Uma “combinação sinérgica” de moléculas de ligação específicas para CD37 e de moléculas de ligação específicas para CD20 é uma combinação que tem um efeito que é maior do que a soma dos efeitos das moléculas de ligação quando administradas isoladamente.

Num aspeto das utilizações da invenção, as moléculas de ligação são administradas em uma ou mais composições farmacêuticas. Para administrar as moléculas de ligação a um ser humano ou a animais de teste, é preferível formular as moléculas de ligação em uma composição que compreende um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis. A frase “farmacêuticamente ou farmacologicamente aceitável” refere-se às entidades moleculares e composições que não produzem reações alérgicas ou outras reações adversas quando administradas com a utilização de vias bem conhecidas na técnica, como descrito abaixo. “Veículos farmacêuticamente aceitáveis” incluem qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotónicos e de retardo da absorção clinicamente úteis, e semelhantes.

Além disso, os compostos podem formar solvatos com água ou solventes orgânicos comuns. Esses solvatos também são contemplados.

As composições de molécula de ligação podem ser administradas por via oral, tópica, transdérmica, parenteral, por pulverizador de inalação, vaginal, retal ou por injeção intracraniana. O termo parenteral, como aqui usado, inclui injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares, injeção intracisterna ou técnicas de

infusão. A administração por injeção intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamária, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar e/ou implantação cirúrgica em um local específico também é contemplada. Geralmente, as composições são essencialmente livres de pirogênios, além de outras impurezas que podem ser prejudiciais ao paciente. Prefere-se a injeção, especialmente a injeção intravenosa.

As composições farmacêuticas da presente invenção que contêm moléculas de ligação usadas em um método da invenção podem conter veículos ou aditivos farmacêuticamente aceitáveis, dependendo da via de administração. Exemplos desses veículos ou aditivos incluem água, um solvente orgânico farmacêutico aceitável, colagénio, álcool polivinílico, polivinilpirrolidona, um polímero de carboxivinil, carboximetilcelulose sódica, poliacrílico sódico, alginato de sódio, dextrana hidrossolúvel, carboximetil amido sódico, pectina, metil celulose, etil celulose, goma xantana, goma arábica, caseína, gelatina, ágar, diglicerina, glicerina, propileno glicol, polietileno glicol, vaselina, parafina, álcool estearílico, ácido esteárico, albumina sérica humana (HSA), manitol, sorbitol, lactose, um tensioativo farmacêuticamente aceitável, e semelhantes. Os aditivos usados são escolhidos entre, sem limitação, os acima citados, ou combinações destes, como adequado, dependendo da forma de dosagem da presente invenção.

A formulação da composição farmacêutica irá variar de acordo com a via de administração selecionada (por exemplo, solução, emulsão). Uma composição apropriada que compreende

o anticorpo a ser administrado pode ser preparada em um veículo ou transportador fisiologicamente aceitável. Para soluções ou emulsões, veículos adequados incluem, por exemplo, soluções aquosas ou alcoólicas/aquosas, emulsões ou suspensões, incluindo soro fisiológico e meios tamponados. Veículos parenterais podem incluir solução de cloreto de sódio, dextrose de Ringer, dextrose e cloreto de sódio, Ringer lactato ou óleos fixos. Veículos intravenosos podem incluir vários aditivos, conservantes ou renovadores de líquidos, nutrientes ou eletrólitos.

Diversos veículos aquosos, por exemplo, água, água tamponada, soro fisiológico 0,4%, glicina 0,3% ou suspensões aquosas, podem conter o composto ativo misturado com excipientes adequados para a fabricação de suspensões aquosas. Tais excipientes são agentes de suspensão, por exemplo, carboximetilcelulose sódica, metilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, alginato de sódio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto e goma acácia; agentes dispersantes ou humidificantes podem ser uma fosfatida de ocorrência natural, por exemplo, lecitina ou produtos de condensação de um óxido de alquilenos com ácidos graxos, por exemplo, estearato de polioxietileno ou produtos de condensação de óxido de etileno com alcoóis alifáticos de cadeia longa, por exemplo, heptadecaetileneoxietanol, ou produtos de condensação de óxido de etileno com ésteres parciais derivados de ácidos graxos e um hexitol, por exemplo, monooleato de polioxietileno sorbitol, ou produtos de condensação de óxido de etileno com ésteres parciais derivados de ácidos graxos e anidridos de hexitol, por exemplo, monooleato de polietileno sorbitano. As suspensões aquosas também podem conter um ou

mais conservantes, por exemplo, etil, ou n-propil, p-hidroxibenzoato.

As composições de molécula de ligação podem ser liofilizadas para armazenamento, e reconstituídas em um veículo adequado, antes de serem utilizadas. Essa técnica demonstrou ser eficaz com imunoglobulinas convencionais. Qualquer técnica de liofilização e reconstituição adequada pode ser empregada. Será observado por aqueles habilitados na técnica que a liofilização e a reconstituição podem produzir graus variáveis de perda de atividade do anticorpo, e os níveis de uso podem ser ajustados para compensar.

Pós e grânulos dispersíveis adequados para a preparação de uma suspensão aquosa pela adição de água fornecem o composto ativo misturado com um agente dispersante ou humidificante, agente de suspensão e um ou mais conservantes. Agentes dispersantes ou humidificantes e agentes de suspensão adequados são exemplificados por aqueles já mencionados anteriormente.

A concentração de molécula de ligação nessas formulações pode variar amplamente, por exemplo, de menos de cerca de 0,5%, normalmente a ou pelo menos cerca de 1% alcançando até 15 ou 20% por peso, e será selecionada primariamente com base nos volumes de líquido, viscosidades etc., de acordo com o modo de administração em particular selecionado. Dessa forma, uma composição farmacêutica típica para injeção parenteral poderia ser constituída para conter 1 ml de água tamponada estéril e 50 mg de anticorpo. Uma composição típica para infusão intravenosa poderia ser

constituída para conter 250 ml de solução de Ringer estéril e 150 mg de anticorpo. Métodos atuais para a preparação de composições administráveis por via parenteral são conhecidos ou ficarão evidentes para aqueles habilitados na técnica, e são descritos com mais detalhes, por exemplo, em "Remington's Pharmaceutical Science", 15^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Uma dosagem eficaz de anticorpo está dentro da faixa de 0,01 mg a 1.000 mg por kg de peso corporal por administração.

As composições farmacêuticas podem estar na forma de uma suspensão aquosa estéril injetável, suspensão oleaginosa, dispersões ou pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis. A suspensão pode ser formulada de acordo com a técnica conhecida com o uso daqueles agentes dispersantes ou humidificantes e agentes de suspensão adequados que foram mencionados anteriormente. A preparação injetável estéril também pode ser uma solução ou suspensão injetável estéril em um diluente ou solvente atóxico parenteralmente aceitável, por exemplo, como uma solução em 1,3-butanodiol. O veículo pode ser um meio solvente ou de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol e polietileno glicol líquido, e semelhantes), mistura adequadas destes, óleos vegetais, solução de Ringer e solução isotônica de cloreto de sódio. Além disso, óleos fixos estéreis são convencionalmente empregados como um meio solvente ou de suspensão. Para essa finalidade, qualquer óleo fixo brando pode ser empregado, incluindo mono- ou diglicerídeos sintéticos. Além disso, ácidos graxos, por exemplo, ácido oléico, podem ser usados na preparação de injetáveis.

Em todos os casos, a forma deve ser estéril e deve ser fluida a ponto de permitir uma fácil introdução em seringas. A fluidez adequada pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento, por exemplo, lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula necessário, no caso de dispersão, e pelo uso de tensioativos. Ela deve ser estável sob as condições de fabricação e estocagem, e deve ser preservada contra a ação contaminante de microrganismos, tais como bactérias e fungos. A prevenção da ação de microrganismos pode ser produzida por vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, e semelhantes. Em muitos casos, será desejável incluir agentes isotônicos, por exemplo, açúcares ou cloreto de sódio. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser produzida com o uso, nas composições, de agentes que retardam a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Composições úteis para administração podem ser formuladas com intensificadores da captação ou da absorção para aumentar sua eficácia. Esses intensificadores incluem, por exemplo, salicilato, glicocolato/linoleato, glicolato, aprotinina, bacitracina, SDS, caprato e semelhantes. Veja, por exemplo, Fix (J. Pharm. Sei., 85: 1.282-1.285, 1996) e Oliyai e Stella (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 521-544, 1993).

Além disso, as propriedades de hidrofiliicidade e hidrofobicidade das composições contempladas para uso na invenção são bem equilibradas, aumentando, dessa forma, sua utilidade para usos tanto in vitro quanto, especialmente,

in vivo, enquanto outras composições que não possuem esse equilíbrio têm uma utilidade substancialmente menor. Especificamente, as composições contempladas para uso na invenção possuem um grau apropriado de solubilidade em meios aquosos que permite a absorção e biodisponibilidade no corpo, ao mesmo tempo em que também possuem um grau de solubilidade em lipídeos que permite que os compostos atravessem a membrana celular até um suposto local de ação. Dessa forma, as composições de anticorpo contempladas são maximamente eficazes quando podem ser liberadas no local da atividade antigênica-alvo.

Num aspeto, os métodos da invenção incluem uma etapa de administração de uma composição de molécula de ligação.

Os métodos da invenção são realizados com o uso de qualquer meio medicamente aceito para a introdução de uma substância terapêutica direta ou indiretamente em um indivíduo mamífero, incluindo, sem limitação, injeções, ingestão oral, administração intranasal, tópica, transdérmica, parenteral, pulverizador de inalação, administração vaginal ou retal. O termo "parenteral", como aqui usado, inclui injeções subcutâneas, intravenosas, intramusculares e intracisterna, além de cateter ou técnicas de infusão. A administração por injeção intradérmica, intramamária, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar e/ou implantação cirúrgica em um local específico também é contemplada.

Em uma modalidade, a administração é realizada no local de um cancro ou tecido afetado que necessita de tratamento por injeção direta no local ou por meio de liberação sustentada

ou por um mecanismo de liberação sustentada, que pode liberar a formulação internamente. Por exemplo, microesferas ou cápsulas biodegradáveis ou outras configurações de polímero biodegradável capaz de liberação sustentada de uma composição (por exemplo, um polipeptídeo, anticorpo ou pequena molécula solúvel) podem ser incluídas nas formulações da invenção, implantadas próximo ao cancro.

Composições terapêuticas também podem ser liberadas ao paciente em múltiplos locais. As administrações múltiplas podem ser administradas simultaneamente, ou podem ser administradas ao longo de um período de tempo. Em certos casos, é benéfico fornecer um fluxo contínuo da composição terapêutica. A terapia adicional pode ser administrada em um intervalo determinado, por exemplo, de hora em hora, diariamente, semanalmente ou mensalmente.

As composições de molécula de ligação da invenção podem compreender uma, ou podem compreender mais de uma molécula de ligação. Também é contemplada pela presente invenção a administração de composições de molécula de ligação em conjunto com um segundo agente. Os segundos agentes contemplados pela invenção serão listados em parágrafos abaixo.

Um segundo agente pode ser uma molécula associada à célula B. Outras moléculas associadas à célula B contempladas pela invenção incluem moléculas de ligação que se ligam às moléculas de superfície das células B que não sejam CD37 ou CD20. Moléculas associadas às células B incluem, sem limitação, CD19 (antígeno de linfócito B CD19, também denominado antígeno de superfície de linfócito B B4, ou

Leu-12), CD21, CD22 (recetor de célula B CD22, também denominado Leu-14, molécula de adesão celular de linfócito B, ou BL-CAM), CD23, CD40 (antígeno de superfície de célula B CD40, também denominado membro 5 da superfamília do recetor do Fator de Necrose Tumoral, recetor CD40L, ou Bp50), CD80 (antígeno de ativação de linfócito T CD80, também denominado antígeno de ativação B7-1, B7, B7-1, ou BB1), CD86 (antígeno de ativação de linfócito T CD86, também denominado antígeno de ativação B7-2, B70, FUN-1 ou BU63), CD137 (também denominado membro 9 da superfamília do recetor do Fator de Necrose Tumoral), CD152 (também denominado proteína 4 de linfócito T citotóxico ou CTLA-4), L6 (antígeno associado a tumores L6, também denominado membro 1 da superfamília Transmembrana 4, marcador do componente de superfície da membrana 1, ou M3S1), CD30 (antígeno de ativação de linfócitos CD30, também denominado membro 8 da superfamília do recetor do Fator de Necrose Tumoral, recetor CD30L, ou Ki-1), CD50 (também denominado molécula de adesão intercelular-3 (ICAM3) ou ICAM-R), CD54 (também denominado molécula de adesão intercelular-1 (ICAM1), ou recetor de rinovírus do grupo principal), B7-H1 (ligante para um recetor imunoinibidor expresso por células T ativadas, células B e células mielóides, também denominado PD-L1; veja Dong, e cols., "B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion", *Nat. Med.*, 5: 1.365-1.369 (1999)), CD134 (também denominado membro 4 da superfamília do recetor do Fator de Necrose Tumoral, OX40, recetor OX40L, antígeno ACT35, ou recetor 1 de glicoproteína ativada por transcrição por TAX), 4-1BB (recetor de ligante 4-1BB, antígeno de célula T 4-1BB, ou antígeno de célula T ILA), CD153 (também denominado membro 8 da superfamília do

ligante do Fator de Necrose Tumoral, ligante CD30 ou CD30-L), CD154 (também denominado membro 5 da superfamília do ligante do Fator de Necrose Tumoral, proteína de ativação relacionada ao TNF, TRAP ou antígeno de célula T Gp39) e recetores Toll. A lista acima de alvos de construção e/ou antígenos-alvo é apenas exemplar e não é definitiva.

Citocinas e fatores de crescimento são segundos agentes contemplados pela invenção e incluem, sem limitação, um ou mais de TNF, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IFN, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoietina, fator de célula-tronco, eritropoietina. Composições farmacêuticas de acordo com a invenção também podem incluir outras angiopoietinas conhecidas, por exemplo, Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y e/ou o polipeptídeo humano semelhante a angiopoietina e/ou fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). Fatores de crescimento para uso em composições farmacêuticas da invenção incluem angiogenina, proteína óssea morfogênica-1, proteína óssea morfogênica-2, proteína óssea morfogênica-3, proteína óssea morfogênica-4, proteína óssea morfogênica-5, proteína óssea morfogênica-6, proteína óssea morfogênica-7, proteína óssea morfogênica-8, proteína óssea morfogênica-9, proteína óssea morfogênica-10, proteína óssea morfogênica-11, proteína óssea morfogênica-12, proteína óssea morfogênica-13, proteína óssea morfogênica-14, proteína óssea morfogênica-15, recetor IA de proteína óssea morfogênica, recetor IB da proteína óssea morfogênica, fator neurotrófico derivado do cérebro, fator neurotrófico ciliar, recetor A do fator neurotrófico ciliar, fator quimiotático de neutrófilos induzido por citocina 1, fator quimiotático de neutrófilos induzido por

citocina 2 α , fator quimiotático de neutrófilos induzido por citocina 2 β , fator de crescimento de células endoteliais β , endotelina 1, fator de crescimento epidérmico, atrativo de neutrófilos derivado de células epiteliais, fator de crescimento de fibroblastos 4, fator de crescimento de fibroblastos 5, fator de crescimento de fibroblastos 6, fator de crescimento de fibroblastos 7, fator de crescimento de fibroblastos 8, fator de crescimento de fibroblastos 8b, fator de crescimento de fibroblastos 8c, fator de crescimento de fibroblastos 9, fator de crescimento de fibroblastos 10, fator de crescimento de fibroblastos ácido, fator de crescimento de fibroblastos básico, recetor do fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais α 1, recetor do fator neurotrófico derivado de linhagem de células gliais α 2, proteína relacionada ao crescimento, proteína relacionada ao crescimento α proteína relacionada ao crescimento β , proteína relacionada ao crescimento γ , fator de crescimento epidérmico de ligação de heparina, fator de crescimento de hepatócitos, recetor do fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento semelhante a insulina- I, recetor do fator de crescimento semelhante a insulina, fator de fator de crescimento semelhante a insulina II, proteína de ligação do fator de fator de crescimento semelhante a insulina, fator de crescimento de ceratinócitos, fator inibidor de leucemia, recetor do fator inibidor de leucemia α , fator de crescimento de nervos, recetor do fator de crescimento de nervos, neurotrofina-3, neurotrofina-4, fator de crescimento placentário, fator de crescimento placentário 2, fator de crescimento de células endoteliais derivado de plaquetas, fator de crescimento derivado de plaquetas, cadeia de fator de crescimento

derivado de plaquetas A, fator de crescimento derivado de plaquetas AA, fator de crescimento derivado de plaquetas AB, cadeia de fator de crescimento derivado de plaquetas B, fator de crescimento derivado de plaquetas BB, recetor α de fator de crescimento derivado de plaquetas, recetor α de fator de crescimento derivado de plaquetas β , fator estimulante do crescimento de pré-células B, fator de célula-tronco, recetor do fator de célula-tronco, fator de transformação de crescimento α , fator de transformação de crescimento β , fator de transformação de crescimento $\beta 1$, fator de transformação de crescimento $\beta 1,2$, fator de transformação de crescimento $\beta 2$, fator de transformação de crescimento $\beta 3$, fator de transformação de crescimento $\beta 5$, fator de transformação de crescimento latente $\beta 1$, proteína de ligação I do fator de transformação de crescimento β , proteína de ligação II do fator de transformação de crescimento β , proteína de ligação III do fator de transformação de crescimento β , recetor do fator de necrose tumoral do tipo I, recetor do fator de necrose tumoral do tipo II, recetor do ativador de plasminogénio do tipo uroquinase, fator de crescimento vascular endotelial e proteínas quiméricas e fragmentos biológicos ou imunologicamente ativos destes.

Exemplos de agentes quimioterápicos contemplados como segundos agentes incluem, sem limitação, agentes alquilantes, tais como mostardas nitrogenadas (por exemplo, mecloretamina, ciclofosfamida, ifosfamida, melfalan e clorambucil); nitrosouréias (por exemplo, carmustina (BCNU), lomustina (CCNU) e semustina (metil-CCNU)); etilenoiminas e metil-melaminas (por exemplo, trietilenomelamina (TEM), trietileno tiofosforamida

(tiotepa) e hexametilmelamina (HMM, altretamina)); sulfonatos de alquila (por exemplo, bussulfan); e triazinas (por exemplo, dacabazina (DTIC)); antimetabólitos, tais como análogos de ácido fólico (por exemplo, metotrexato, trimetrexato, e pemetrexed (antifolato multidirecionado)); análogos de pirimidina (por exemplo, 5-fluoruracil (5-FU), fluordesoxiuridina, gemcitabina, citosina arabinosida (AraC, citarabina), 5-azacitidina, e 2,2'-difluordesoxicitidina); e análogos de purina (por exemplo, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, azatioprina, 2'-desoxicoformicina (pentostatina), eritrohidroxinoniladenina (EHNA), fosfato de fludarabina, 2-clorodesoxiadenosina (cladribina, 2-CdA)); inibidores da topoisomerase do Tipo I, por exemplo camptotecina (CPT), topotecan e irinotecan; produtos naturais, tais como epipodofilotoxinas (por exemplo, etoposida e teniposida); e alcalóides da vinca (por exemplo, vinblastina, vincristina e vinorelbina), antibióticos anti-tumorais, tais como actinomicina D, doxorubicina e bleomicina; radiosensibilizantes, tais como 5-bromodesoxiuridina, 5-iododesoxiuridina e bromodesoxicitidina; complexos de coordenação de platina, tais como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina; uréias substituídas, por exemplo, hidroxiuréia; e derivados de metilhidrazina como, por exemplo, N-metilhidrazina (MIH) e procarbazona.

Exemplos não limitantes de agentes quimioterápicos, agentes radioterápicos e outros agentes ativos e agentes secundários também são mostrados na Tabela 1.

TABELA 1

Agentes alquilantes	Produtos Naturais
Mostardas nitrogenadas	Medicamentos antimicóticos
mecloretamina	
ciclofosfamida	
ifosfamida	<u>Taxanos</u>
	paclitaxel
melfalan	alcalóides da Vinca
clorambucil	vinblastina (VLB)
	vincristina
<u>Nitrosouréias</u>	
carmustina (BCNU)	vinorelbina
lomustina (CCNU)	Taxotere® (docetaxei)
semustina (metil-CCNU)	estramustina
	fosfato de estramustina
<u>Etileneimina/Metil-melamina</u>	
trietilenomelamina (TEM)	
trietileno tiofosforamida	<u>Epipodofilotoxinas</u>
(tiotepa)	Etoposida
	Teniposida
hexametilmelamina (HMM,	
altretamina)	
	<u>Antibióticos</u>
	actimomicina D
<u>Sulfonatos de alquila</u>	daunomicina (rubido-micina)
Busulfan	doxorrubicina (adria-micina)
	mitoxantroneidarrubicina
<u>Triazinas</u>	bleomicina
dacarbazina (DTIC)	esplicamicina (mitramicina)
	mitomicina
<u>Antimetabólicos</u>	dactinomicina

Análogos de ácido fólico

metotrexato

Trimetrexato

Pemetrexed (antifolato
multidirecionado)

afidicolina

Enzimas

L-asparaginase

L-arginase

Analógos de pirimidina

5-fluorouracil

fluorodeoxiuridina

gemcitabina

citosina-arabinósido (AraC,
citarabina)

5-azacitidina

2,2'- difluorodeoxi-citidina

topotecano

irinotecano

Análogos de purina

6-mercaptopurina

6-tioguanina

azatioprina

2'-desoxicoformicina

(pentostatina)

Radiosensibilizadores

metronidazol

misonidazole

desmetilmisonidazole

pimonidazole

etanidazole

nimorazole

RSU 1069

EO9

mitoxantrona

RB 6145

SR4233

nicotinamida

5-bromodeozyuridine

5-iododesoxiuridina

bromodesoxicitidina

eritrohidroxinonil-adenina

(EHNA) fosfato de fludarabina

2-clorodesoxiadenosina

(cladribina, 2-CdA)

Agentes variados

Complexos de coordenação de

	<u>platina</u>
	cisplatina
	Carboplatina
<u>Inibidores da topoisomerase</u>	oxaliplatina
<u>Tipo I</u>	
camptotecina	Antracenedione
	<u>Ureia substituída</u>
<u>Modificadores da resposta</u>	Hidroxiureia
<u>biológica</u>	
G-CSF	
GM-CSF	Derivados de metilhidrazina
	N-metilhidrazina (MIH)
<u>Agentes de diferenciação</u>	procarbazona
	Supressores adrenocorticais
Derivados do ácido retinóico	
	supressor adrenocortical
<u>Hormónios e antagonistas</u>	mitotano (o, p'-DDD)
<u>Adrenocorticóides/antagonistas</u>	aminoglutetimida
prednisona e equivalentes	
dexametasona	<u>Citocinas</u>
aminoglutetimida	interferon (α , β , γ)
	interleucina-2
<u>Progestinas</u>	
Caproato de Hidroxiprogesterona	<u>Fotosensibilizantes</u>
Acetato medroxiprogesterona	Derivados de hematoporfirina
acetato de megestrol	Photofrin®
	derivados de benzoporfirina
<u>Estrógenos</u>	Npe6
Dietilestilbestrol	estanho de etioporfirina (SnET2)
Etinil estradiol/equivalentes	feoborid-a

	bacterioclorofila-a
<u>Antiestrôgenios</u>	naftalocianinas
Tamoxifen	ftalocianinas
	ftalocianinas de zinco
<u>Androgênios</u>	
propionato de testosterona	<u>Radiação</u>
fluoximesterona/equivalentes	Raios X
	Luz ultravioleta
<u>Antiandrogênios</u>	Radiação gama
flutamida	Luz visível
libertadora de gonadotropina	radiação infravermelha
análogos da hormona	radiação de micro-ondas
leuprolide	
<u>Antiandrogênicos não esteroides</u>	
flutamida	

Os segundos agentes contemplados pela invenção para o tratamento de doenças autoimunes são denominados agentes imunossuppressores, que atuam para suprimir ou mascarar o sistema imunológico do indivíduo tratado. Agentes imunossuppressores incluem, por exemplo, fármacos anti-inflamatórios não esteroides (NSAIDs), analgésicos, glucocorticoides, fármacos antirreumáticos modificadores de doença (DMARDs) para o tratamento de artrite ou modificadores da resposta biológica. Composições na descrição de DMARD também são úteis no tratamento de várias outras doenças autoimunes além de AR.

NSAIDs exemplares são escolhidos do grupo que consiste em ibuprofeno, naproxeno, naproxeno sódico, inibidores da Cox-2, tais como Vioxx e Celebrex e sialilatos. Analgésicos

exemplares são escolhidos do grupo que consiste em acetaminofeno, oxicodona, tramadol de cloridrato de propoxifeno. Glicocorticóides exemplares são escolhidos do grupo que consiste em cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona ou prednisona. Modificadores da resposta biológica exemplares incluem, sem limitação, moléculas dirigidas contra marcadores da superfície celular (por exemplo, CD4, CD5 etc.), inibidores de citocina, tais como os antagonistas do TNF (por exemplo, etanercept (Enbrel), adalimumab (Humira) e infliximab (Remicade)), inibidores de quimiocina e inibidores de moléculas de adesão. Os modificadores da resposta biológica incluem anticorpos monoclonais, bem como formas recombinantes de moléculas. DMARDs exemplares incluem, sem limitação, azatioprina, ciclofosfamida, ciclosporina, metotrexato, penicilamina, leflunomida, sulfasalazina, hidroxiclороquina, Ouro [oral (auranofin) e intramuscular] e minociclina.

Contempla-se que a composição de molécula de ligação e do segundo agente pode ser dada simultaneamente na mesma formulação. Alternativamente, os agentes são administrados em uma formulação separada, mas concomitantemente, com concomitantemente referindo-se aos agentes dados com um intervalo de até 30 minutos entre eles.

Em outro aspeto, o segundo agente é administrado antes da administração da composição de molécula de ligação. Antes da administração refere-se à administração do segundo agente em um intervalo de até uma semana antes do tratamento com o anticorpo, até 30 minutos antes da administração do anticorpo. Contempla-se ainda que o

segundo agente é administrado subsequente à administração da composição de molécula de ligação. Administração subsequente visa a descrever a administração de 30 minutos após o tratamento com anticorpo até uma semana após a administração do anticorpo.

Contempla-se ainda que, quando a molécula de ligação for administrada em combinação com um segundo agente, em que o segundo agente é uma citocina ou um fator de crescimento, ou um agente quimioterápico, a administração também poderá incluir o uso de um agente radioterápico ou radioterapia. A radioterapia administrada em combinação com um anticorpo composição é administrada da forma determinada pelo médico responsável, e nas doses tipicamente administradas a pacientes em tratamento de cancro.

As quantidades de molécula de ligação em certa dose irão variar de acordo com o tamanho do indivíduo que recebe a administração da terapia, bem como com as características do distúrbio tratado. Em tratamentos exemplares, pode ser necessário administrar cerca de 1 mg/dia, cerca de 5 mg/dia, cerca de 10 mg/dia, cerca de 20 mg/dia, cerca de 50 mg/dia, cerca de 75 mg/dia, cerca de 100 mg/dia, cerca de 150 mg/dia, cerca de 200 mg/dia, cerca de 250 mg/dia, cerca de 500 mg/dia ou cerca de 1.000 mg/dia. As doses também podem ser administradas com base no peso paciente, em uma dose de cerca de 0,01 a cerca de 50 mg/kg. Em uma modalidade relacionada, a molécula de ligação pode ser administrada em uma faixa de dose de cerca de 0,015 a cerca de 30 mg/kg. Em uma modalidade adicional, a molécula de ligação é administrada em uma dose de cerca de 0,015, cerca

de 0,05, cerca de 0,15, cerca de 0,5, cerca de 1,5, cerca de 5, cerca de 15 ou cerca de 30 mg/kg.

Essas composições podem ser administradas em uma dose única ou em várias doses. Estudos padronizados de dose-resposta, inicialmente em modelos animais e depois em; testes clínicos, revelam dosagens ótimas para estados de doença e populações de pacientes específicos.

A administração da composição de molécula de ligação diminui a população de células B em pelo menos 20% após a dose única de tratamento. Em uma modalidade, a população de células B é diminuída em pelo menos cerca de 20, cerca de 30, cerca de 40, cerca de 50, cerca de 60, cerca de 70, cerca de 80, cerca de 90 ou cerca de 100%. A redução de células B é definida como uma diminuição na contagem absoluta de células B abaixo do limite inferior da faixa normal. A recuperação de células B é definida como o retorno da contagem absoluta de células B a um dos seguintes: 70% do valor basal ou faixa normal do indivíduo.

A administração de moléculas de ligação específicas para CD20 também resulta em aumento da apoptose em subconjuntos específicos de células B. Apoptose refere-se à introdução da morte celular programada de uma célula, manifestada e avaliada por fragmentação de ADN, encolhimento da célula, fragmentação celular, formação de vesículas na membrana ou alteração da composição lipídica da membrana, avaliada por coloração com anexina V.

Além disso, a administração de composições de molécula de ligação da invenção resulta na produção de efeitos clínicos

desejados na doença ou distúrbio tratado. Por exemplo, em pacientes que possuem artrite reumatoide, em um aspecto, a administração melhora a condição do paciente em uma quantidade clinicamente significativa [por exemplo, alcança a "American College of Rheumatology Preliminary Detection of Improvement" (ACR20)] e/ou em uma melhora de 20% da sensibilidade e do edemas articulares e uma melhora de 20% nos 3/5 das medidas ACR restantes (Felson e cols., *Arthritis Rheum.* 1995, 38: 727-35). Medidas biológicas para melhora em um paciente com AR após a administração de moléculas de ligação específicas para CD37 e específicas para CD20 incluem a medida das alterações dos níveis de citocina, medidos através dos níveis de proteína ou ARN. Citocinas de interesse incluem, sem limitação, TNF- α , IL-1, interferons, Blys e APRIL. Alterações da citocina podem ser causadas por números reduzidos de células B ou diminuição de células T ativadas. Em pacientes com AR, marcadores relevantes para o turnover ósseo (reabsorção ou erosão ósseas) são medidos antes e depois da administração de moléculas de ligação específicas para CD20. Marcadores relevantes incluem, sem limitação, fosfatase alcalina, osteocalcina, fragmentos da degradação de colagénio, hidroxiprolina, fosfatase ácida resistente a tartarato e ligante de RANK (RANKL). Outros indicadores relevantes para a melhora da AR incluem a medida dos níveis de proteína C-reativa (CRP), velocidade de hemossedimentação (VHS), fator reumatoide, anticorpos CCP (peptídeo cíclico citrulinado) e avaliação dos níveis sistêmicos de células B e contagem de linfócitos através de citometria de fluxo. Fatores específicos também podem ser medidos a partir da sinóvia de pacientes com AR, incluindo avaliação dos níveis de células

B na sinóvia de biópsia sinovial, níveis de RANKL e outros fatores e citocinas ósseos apresentados acima.

Em um aspeto relacionado, os efeitos da administração da combinação sobre outras doenças são medidos de acordo com padrões conhecidos na técnica. Por exemplo, contempla-se que pacientes com doença de Crohn tratados de acordo com a invenção obtêm uma melhora no índice de Atividade da Doença de Crohn (CDAI) na faixa de cerca de 50 a cerca de 70 unidades, em que a remissão se situa em 150 unidades (Simonis e cols., Scand. J Gastroent. 1998, 33: 283-8). Uma pontuação de 150 ou 200 é considerada normal, enquanto uma pontuação de 450 é considerada uma pontuação da doença grave. Deseja-se ainda que a administração das moléculas de ligação específicas para CD37 e específicas para CD20 resulte em uma redução em anticorpo perinuclear anti-neutrófilos (pANCA) e anticorpo anti-Saccharomyces cervisiae (ASCA) em indivíduos que sofrem de doença inflamatória do intestino.

Contempla-se ainda que pacientes adultos e jovens com miosite tratados de acordo com a invenção obtêm uma melhora no conjunto central de avaliações, por exemplo, 3 de 6 dos indicadores do conjunto central medido melhoraram em aproximadamente 20%, com piora de no máximo 2 dessas medidas de indicadores centrais em aproximadamente 25% (veja Rider e cols., Arthritis Rheum. 2004, 50: 2.281-90).

Contempla-se ainda que pacientes com LES tratados de acordo com a invenção obtêm uma melhora na pontuação pela Medida de Atividade do Lúpus Sistêmico (SLAM) ou pelo índice de Atividade de Doença por LES (SLEDAI) de pelo menos 1 ponto

(Gladman e cols., J. Rheumatol. 1994, 21: 1.468-71) (Tan e cols., Arthritis Rheum. 1982, 25: 1.271-7). Uma pontuação SLAM >5, ou pontuação SLEDAI >2, é considerada doença clinicamente ativa. Uma resposta ao tratamento pode ser definida como melhora ou estabilização pelas 2 medidas de atividade da doença (o índice de Atividade de Doença por LES [SLEDAI] e a Medida de Atividade do Lúpus Sistêmico) e 2 medidas da qualidade de vida (avaliação global do paciente e a Escala de Gravidade de Fadiga de Krupp) (Petri e cols., Arthritis Rheum. 2004, 50: 2.858-68). Contempla-se ainda que a administração da molécula de ligação a pacientes com LES resulte em uma redução em anticorpos anti-ADN de fita dupla. Alternativamente, a melhora pode ser estimada com a utilização dos Critérios do Grupo de Avaliação do Lúpus das Ilhas Britânicas (BILAG).

Contempla-se ainda que pacientes com esclerose múltipla tratados de acordo com a invenção obtêm uma melhora da pontuação clínica na escala do estado de Incapacidade Expandida de Kurtzke (EDSS) (Kurtzke, F., Neurology 1983, 33: 1.444-52) de pelo menos 0,5, ou um retardo na piora da doença clínica de pelo menos 1,0 na escala de Kurtzke (Rudick e cols., Neurology 1997, 49: 358- 63).

Contempla-se ainda que pacientes que sofrem de MII que recebem moléculas de ligação específicas para CD37 e específicas para CD20 obtêm uma redução em pelo menos um de cinco critérios apresentados na avaliação dos Critérios para Miopatia Inflamatória Idiopática (IIMC) (Miller, F., supra). Contempla-se ainda que a administração a pacientes com MII resulte em uma redução dos fatores associados à MII selecionados do grupo que consiste em creatina quinase

(CK), lactato desidrogenase, aldolase, proteína C-reativa, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), e auto-anticorpo antinuclear (ANA), anticorpos específicos para miosite (MSA), e anticorpo para antígenos nucleares passíveis de extração. Alternativamente, os pacientes atingem 3 de 6 dos critérios apresentados em Rider e cols., *Arthritis Rheum.*, 50(7):2.281-2.290 (2004), com piora em no máximo 2 critérios.

Em algumas modalidades, pacientes que sofrem de um cancro de células B recebem tratamento de acordo com a invenção, e demonstram uma resposta benéfica global ao tratamento, com base em critérios clínicos bem conhecidos e comumente usados na técnica, e como descrito abaixo, por exemplo, uma diminuição do tamanho do tumor, diminuição do número de tumores e/ou uma melhora dos sintomas da doença.

Critérios clínicos exemplares são fornecidos pelo "U.S. National Cancer Institute" (NCI), que dividiu algumas das classes de cancros nas categorias clínicas de linfomas "indolentes" e "agressivos". Linfomas indolentes incluem linfomas de célula folicular, separados em "graus" citológicos, linfoma linfocítico difuso pequeno/leucemia linfocítica crônica (CLL), macroglobulinemia linfoplasmocitóide/de Waldenstrom, linfoma de zona marginal e leucemia de célula pilosa. Linfomas agressivos incluem linfoma difuso de células mistas e grandes, linfoma de Burkitt/linfoma difuso de célula pequena não clivada, linfoma linfoblástico, linfoma de célula do manto e linfoma relacionado à AIDS. Em alguns casos, o índice Prognóstico Internacional (IPI) é usado nos casos de linfoma agressivo e folicular. Fatores que devem ser considerados no IPI

incluem a idade (<60 anos de idade versus >60 anos de idade), lactato desidrogenase sérica (níveis normais versus elevados), estado do desempenho (0 ou 1 versus 2-4) (veja definição abaixo), estágio da doença (I ou II versus III ou IV) e o envolvimento de local extranodal (0 ou 1 versus 2-4). Pacientes com 2 ou mais fatores de risco possuem uma probabilidade menor do que 50% de Sobrevida sem recidivas e global em 5 anos.

O estado do desempenho no IPI agressivo é definido da seguinte forma: Descrição do Grau: 0 Totalmente ativo, capaz de realizar todo o desempenho pré-doença, restrições; 1 Restrito em atividades fisicamente extenuantes, mas ambulatorio e capaz de realizar trabalho de natureza leve ou sedentária, por exemplo, trabalho doméstico leve, trabalho de escritório; 2 Ambulatorio e capaz de realizar os cuidados pessoais, mas incapaz de realizar quaisquer atividades de trabalho, até e em torno de 50% das horas de vigília; 3 Capaz apenas de efetuar ou cuidados pessoais, confinado ao leito ou à cadeira em mais de 50% das horas de vigília; 4 Completamente incapaz, incapaz de realizar os cuidados pessoais, totalmente confinado ao leito ou à cadeira; 5e, Morto (veja, "The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project. A predictive model for aggressive Non-Hodgkin's Lymphoma". N. Engl. J. Med. 329: 987-94, 1993).

Tipicamente, o grau de linfoma é avaliado clinicamente com o uso do critério de que linfoma de grau baixo normalmente se apresenta como uma doença nodal, e é frequentemente indolente ou de crescimento lento. A doença de grau intermediário e elevado normalmente se apresenta como uma

doença bem mais agressiva, com grandes tumores volumosos extranodais.

O sistema de classificação de Ann Arbor também é usado para medir a progressão de tumores, especialmente do linfoma não Hodgkins. Nesse sistema, os estágios I, II, III e IV do adulto NHL pode ser classificado nas categorias A e B, dependendo de se o paciente tem sintomas generalizados bem definidos (B) ou não (A). A designação B é dada a pacientes com os seguintes sintomas: perda inexplicada de mais de 10% do peso corporal nos 6 meses antes do diagnóstico, febre inexplicada com temperaturas acima de 38°C e suores noturnos abundantes. As definições dos estágios são as seguintes: Estágio I-envolvimento da região de um único linfonodo, ou envolvimento localizado de um único órgão ou local extralinfático. Estágio II- envolvimento de duas ou mais regiões de linfonodo do mesmo lado do diafragma, ou envolvimento localizado de um único órgão ou local extralinfático associado e de seus linfonodos regionais, com ou sem outras regiões de linfonodos do mesmo lado do diafragma. Estágio III- envolvimento de regiões de linfonodos em ambos os lados do diafragma, possivelmente envolvimento localizado associado de um órgão ou local extralinfático, envolvimento do baço, ou ambos. Estágio IV envolvimento disseminado (multifocal) de um ou mais locais extralinfáticos, com ou sem envolvimento associado de linfonodos ou envolvimento isolado de órgão extralinfático, com envolvimento nodal distante (não regional). Para mais detalhes, veja "The International Non- Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project: A predictive model for aggressive non-Hodgkin's lymphoma", New England J. Med. (1993) 329: 987-994.

Em um aspeto, um efeito terapêutico dos métodos de acordo com a invenção é determinado pelo nível de resposta, por exemplo, uma resposta parcial é definida como redução tumoral a menos da metade de seu tamanho original. Uma resposta completa é definida como a eliminação total da doença, confirmada por avaliação clínica ou radiológica. Em uma modalidade, o indivíduo que recebe o tratamento de acordo com a invenção demonstra pelo menos uma resposta parcial ao tratamento.

De acordo com os critérios de Cheson para avaliação de linfoma não Hodgkin desenvolvidos em colaboração com o "National Cancer Institute" (Cheson e cols., J. Clin. Oncol. 1999, 17: 1.244; Grillo-Lopez e cols., Ann. Oncol. 2000, 11: 399-408), uma resposta completa é obtida quando há um desaparecimento completo de todas as evidências clínicas e radiográficas detectáveis de doença e de sintomas relacionados à doença, todos linfonodos retornaram ao tamanho normal, o baço regrediu de tamanho e a medula óssea não possui linfoma.

Uma resposta completa não confirmada é obtida quando um paciente exibe desaparecimento completo da doença e o baço regride de tamanho, mas os linfonodos regridem mais de 75% e a medula óssea é indeterminada. Uma resposta completa não confirmada preenche e excede os critérios para resposta parcial. Uma resposta global é definida como uma redução de pelo menos 50 por cento na carga tumoral global.

Critérios similares foram desenvolvidos para várias outras formas de cancros ou doenças hiperproliferativas, e são facilmente disponíveis por aqueles habilitados na técnica.

Veja, por exemplo, Cheson e cols., Clin. Adv. Hematol. Oncol. 2006, 4:4-5, que descreve critérios para avaliação de CLL; Cheson e cols., J. Clin. Oncol. 2003, 21: 4.642-9, que descreve critérios para AML; Cheson e cols., Blood 2000, 96: 3.671-4, que descreve critérios para síndromes mielodisplásicas.

Em outro aspeto, uma resposta terapêutica em pacientes que apresentam um cancro de células B manifesta-se como uma progressão mais lenta da doença, comparada com a de pacientes que não recebem a terapia. A medida da progressão mais lenta da doença ou de qualquer um dos fatores acima pode ser realizada com o uso de metodologias bem conhecidas na técnica, incluindo varredura óssea, varredura por TC, varredura com gálio, linfangiograma, MRI, varreduras PET, ultrassom, e semelhantes.

Também ficará evidente que a dosagem pode ser modificada caso sejam administradas substâncias terapêuticas tradicionais em combinação com as substâncias terapêuticas da invenção.

Como um aspeto adicional, a invenção inclui kits que compreendem um ou mais compostos ou composições úteis nos métodos da invenção, embalados de uma forma que facilite seu uso para a prática dos métodos da invenção. Na modalidade mais simples, um kit como esse inclui um composto ou uma composição aqui descrita como útil para a prática de um método da invenção embalada em um recipiente, por exemplo, uma garrafa ou um vaso lacrado, com um rótulo afixado no recipiente ou incluído na embalagem que descreve o uso do composto ou da composição para a prática do método

da invenção. De preferência, o composto ou a composição é embalado em uma forma de dosagem unitária. O kit pode ainda incluir um dispositivo adequado para a administração da composição de acordo com uma via de administração preferida, ou para a realização de um ensaio de rastreamento. O kit pode incluir um rótulo que descreve o uso da composição de molécula(s) de ligação em um método da invenção.

A presente divulgação também compreende produtos de fabrico.

Esses artigos compreendem moléculas de ligação específicas para CD37 ou moléculas de ligação específicas para CD37 e específicas para CD20, opcionalmente junto com um veículo ou diluente farmacêutico, e pelo menos um rótulo que descreve um método de uso das moléculas de ligação de acordo com a invenção. Esses produtos manufaturados também podem opcionalmente compreender pelo menos um segundo agente para administração em conexão com as moléculas de ligação.

A presente invenção também reivindica o uso de uma composição que compreende uma molécula de ligação específica para CD37 ou moléculas de ligação específicas para CD37 e específicas para CD20 na fabricação de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de uma doença que envolve atividade aberrante de células B.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1A representa a estrutura da molécula de TRU-016; a Figura 1B mostra os resultados da análise SDS-PAGE, demonstrando que a proteína expressa migra em um Mr de aproximadamente 110 kDa sob condições não redutoras, e de aproximadamente 52 kDa quando submetida às condições redutoras; e a Figura 1C mostra que a molécula de TRU-016 demonstra ligação específica de nível elevado para linfócitos B do sangue periférico humano, e um nível de ligação bem menor para outras subpopulações de células na população diferente de linfócitos B (população CD19-negativa) quando analisada por citometria de fluxo.

A Figura 2A-E mostra inibição da ligação por diferentes reagentes dirigidos a CD37.

A Figura 3A demonstra a ligação de FITC Clq às formas moleculares de TRU-016 incubadas com células B Ramos no soro humano normal, com e sem fator de veneno de cobra (CVF); a Figura 3B mostra a atividade de CDC de formas moleculares de TRU-016 incubadas com células B Ramos no soro humano normal, com e sem CVF; e a Figura 3C mostra a atividade de CDC de formas moleculares de TRU-016 incubadas com células B Ramos e complemento humano ou de coelho.

A Figura 4 mostra os traços de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) HPLC obtidos da purificação de GPC do TRU-016, colocando em um gráfico a absorbância versus o tempo de retenção para as diferentes frações coletadas.

A Figura 5A mostra as propriedades de ligação de frações de SEC; a Figura 5B mostra a atividade de CDC de frações de

SEC; e a Figura 5C mostra a atividade de ADCC de frações de SEC.

A Figura 6 mostra a atividade de CDC de TRU-015, rituxan, TRU-016, ou uma combinação destes, em células B Ramos.

A Figura 7 mostra o efeito de TRU-016 sobre a atividade de CDC de TRU-015 em células B DHL-4.

A Figura 8 mostra o efeito de TRU-016 sobre a atividade de CDC de TRU-015 e rituxan.

A Figura 9 mostra o efeito de TRU-016 em TRU-015 em um ensaio da CDC.

A Figura 10 mostra o efeito de TRU-016 em rituxan em um ensaio da CDC.

A Figura 11 mostra a interação de TRU-015 e TRU-016 em um ensaio da ADCC usando células BJAB.

A Figura 12 mostra a interação de TRU-015 e TRU-016 em um ensaio da ADCC usando células Daudi.

A Figura 13 mostra a interação de TRU-015 e TRU-016 em um ensaio da ADCC usando células Ramos.

A Figura 14 mostra o efeito de rituxan, TRU-016, e uma combinação destes, sobre a morte específica de células BJAB.

A Figura 15 mostra o efeito de rituxan, TRU-016, e uma combinação destes, sobre a morte específica de células BJAB.

A Figura 16 mostra o efeito de TRU-015, TRU-016, e uma combinação destes, sobre a morte específica de células BJAB.

A Figura 17 mostra o efeito de TRU-015, TRU-016, e uma combinação destes, sobre a morte específica de células BJAB.

A Figura 18A-D mostra que formas diméricas de TRU-016 não medeiam CDC isoladamente, mas potencializam a atividade de CDC de Rituximab in vitro.

A Figura 19A-B demonstra que TRU-016 purificado por proteína A induz apoptose de células Ramos e Daudi, enquanto as formas diméricas necessitam de reticulação.

A Figura 20 mostra que TRU-016 preferencialmente elimina células B normais de culturas de PBMC.

A Figura 21 demonstra a eficácia de TRU-016 comparado com hulgG, rituxan e o tratamento combinado de TRU-016 e rituxan sobre o volume tumoral em animais.

As Figuras 22A e B mostram que formas diméricas de TRU-016 exibem atividade anti-tumoral significativa, medida pelo efeito sobre o volume tumoral e percentual de Sobrevivência em um modelo de autoenxerto tumoral em camundongo.

A Figura 23 demonstra que dímeros de TRU-016 não aumentam a atividade de CDC resultante do tratamento com reagentes específicos para MHCII, CD19, CD80/86 ou CD45.

A Figura 24 mostra o percentual de Sobrevivência de camundongos com tumores Ramos (até 90 dias) após tratamento com TRU-016, rituximab ou uma combinação destes.

As Figuras 25 e 26 mostram o percentual de Sobrevivência de camundongos com tumores Daudi (até 90 dias) após tratamento com TRU-016 ou rituximab.

A Figura 27 mostra que TRU-016 reduziu eficazmente a viabilidade celular relativa em células tratadas com fludarabina potencializando, dessa forma, o efeito citotóxico de fludarabina isoladamente.

A Figura 28 mostra que TRU-016 induziu toxicidade celular maior do que herceptina ou rituximab em linhagens celulares resistentes a rituximab.

A Figura 29 mostra que TRU-016 induziu fosforilação de tirosina em células B CD19+ primariamente CLL.

A Figura 30A mostra a sequência de aminoácidos de consenso da construção humanizada de TRU-016 nº 019001 (ID. DE SEQ. Nº: 6) e TRU-016 (ID. DE SEQ. Nº: 2) com numeração de Kabat; a Figura 30B mostra os alinhamentos de sequências de aminoácidos de três construções humanizadas de TRU-16 (019001, 019008 e 109009).

A Figura 31 mostra o ADN e alinhamentos de sequências de aminoácidos de três construções humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 e 019044).

A Figura 32 mostra os alinhamentos de sequências formatados por FASTA das mesmas três construções humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 e 019044).

EXEMPLOS

Aspetos e detalhes adicionais da invenção ficarão evidentes a partir dos exemplos seguintes, os quais visam a ilustrá-la, e não limitá-la. O Exemplo 1 descreve a produção de uma molécula de ligação específica para CD37; O Exemplo 2 demonstra que TRU-016 e vários anticorpos específicos para CD37 reconhecem os mesmos epitopos ou epitopos superpostos; o Exemplo 3 mostra que TRU-016 é deficiente na ligação de C1q e na ativação da via clássica de ativação de complemento; o Exemplo 4 demonstra a atividade e a ligação de multímeros de TRU-016; o Exemplo 5 descreve a produção de uma molécula de ligação específica para CD20; o Exemplo 6 mostra que combinações de TRU-016 com TRU-015 ou rituxan aumentam sinergicamente a apoptose em células B; o Exemplo 7 mostra que combinações de TRU-016 com anticorpos específicos para CD20 ou SMIPs aumentam sinergicamente a

CDC; o Exemplo 8 demonstra que TRU-016 aumenta a atividade de ADCC e CDC de anticorpos específicos para CD20 e SMIPs; o Exemplo 9 demonstra que TRU-016 induz apoptose em células B; o Exemplo 10 mostra que combinações de um SMIP específico para CD37 com um anticorpo específico para CD20 reduzem sinergicamente o volume tumoral em um modelo de xenoenxerto tumoral murídeo; o Exemplo 11 mostra que um SMIP específico para CD37 isoladamente também reduz o volume tumoral em um modelo de xenoenxerto tumoral murídeo; o Exemplo 12 demonstra que TRU-016 não afeta a atividade de CDC de outros recetores de superfície de células B; o Exemplo 13 demonstra que TRU-016 não aumenta a atividade de CDC de vários recetores-alvo, incluindo MHCII, CD19, CD80/86 e CD40; o Exemplo 14 fornece dados adicionais que mostram que TRU-016 aumenta a Sobrevivência in vivo em camundongos com tumores; o Exemplo 15 demonstra que TRU-016 potencializa a morte celular induzida por fludarabina em células CLL in vitro; o Exemplo 16 mostra que TRU-016 induz citotoxicidade direta em células resistentes ao rituximab; o Exemplo 17 mostra que TRU-016 induz fosforilação de tirosina em células B CD19+ primariamente CLL; e o Exemplo 18 fornece moléculas humanizadas de TRU-016.

Exemplo 1

Produção de uma molécula de ligação específica para CD37

SMIPs específicos para CD37 são descritos no Pedido U.S. de co-propriedade N° 10/627.556 e nas Publicações de Patente U.S. N°s 2003/133939, 2003/0118592 e 2005/0136049. Um SMIP exemplar, TRU-016, é produzido como descrito abaixo.

TRU-016 [G28-1 ScFv VH11S (SSC-P) H WCH2 WCH3] é uma proteína recombinante de cadeia única que se liga ao antígeno CD37. O domínio de ligação era baseado na sequência do anticorpo G28-1 revelada previamente nas publicações de patentes listadas no parágrafo precedente, cuja revelação é aqui incorporada por referência. O domínio de ligação está conectado ao domínio efetor, os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana, através de uma região de dobradiça modificada. TRU-016 existe como um dímero em solução, e o dímero tem um peso molecular teórico de aproximadamente 106.000 daltons.

O ARN total do hibridoma de G28-1 foi isolado com o uso de reagente de ARN Trizol (Gibco) de acordo com as instruções do fabricante. O cADN foi preparado com o uso de 5 µg ARN, iniciadores aleatórios e Transcriptase Reversa Superscript II (GIBCO BRL). Os domínios variáveis foram clonados usando pools de iniciadores degenerados para diferentes famílias de gene de VK ou VH murídeo. Os domínios variáveis do hibridoma de G28-1 foram clonados em PCR 2.1 TOPO vetores de clonagem (Invitrogen), e o ADN dos transformantes com insertos de tamanho correto foi sequenciado. Regiões variáveis de cadeia pesada e leve de clones corretos foram então usadas como modelos para a realização de amplificação por PCR de um G28-1 scFv unido na orientação VL-VH com um vinculador 15 aa (gly4ser)₃. O scFv anti-CD37 foi anexado a uma dobradiça de IgG1 humana modificada, domínios de CH2 e CH3 (veja Figura 1A). A fim de assegurar a expressão adequada por células mamíferas, foram selecionadas modificações das regiões variáveis que permitissem aumentos significativos na expressão por células mamíferas. Especificamente, uma leucina foi trocada por uma serina na

posição 11 do scFV. O peptídeo maduro previsto tem comprimento de 473 aminoácidos.

A sequência de polinucleotídeos que codifica TRU-016 e a sequência de aminoácidos de TRU-016 são apresentadas, respectivamente, nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 1 e 2.

TRU-016 foi produzido por tecnologia de ADN recombinante em um sistema de expressão de células mamíferas de ovário de hamster chinês (CHO). As células CHO transfectadas que produzem o SMIP foram cultivadas em um biorreator com o uso de meios proprietários.

SMIPs de TRU-016 foram purificados dos sobrenadantes da cultura de CHO por cromatografia de afinidade por Proteína A. Com o uso de dPBS, uma coluna de sefarose rProteína A FF de 50 ml (GE Healthcare rProtein A Sepharose FF, N° de Catálogo 17-0974-04) foi equilibrada a 5,0 ml/min (150 cm/h) para 1,5 volume de coluna (CV). O sobrenadante da cultura foi carregado à coluna rProteína A Sefarose FF em uma taxa de fluxo de 1,7 ml/min usando o AKTA Explorer 100 Air (GE healthcare AKTA Explorer 100 Air, N° de Catálogo 18-1403-00), que captura o TRU-016 recombinante. A coluna foi lavada com dPBS por 5 volumes de coluna (CV), e depois 1,0 M de NaCl, 20 mM de fosfato de sódio, pH 6,0, e depois com 25mM de NaCl, 25 mM de NaOAc, pH 5,0. Essas etapas de lavagem removeram as proteínas da célula CHO hospedeira ligadas inespecificamente da coluna de rProteína A que contribuem para a precipitação de produto após eluição.

O TRU-016 recombinante foi eluído da coluna com 1000 mM de glicina, pH 3,5. Frações de 10 ml do produto eluído foram

recuperadas, e o produto eluído foi então levado até o pH 5,0 com 20% do volume eluído de 0,5 M de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfônico (MES) pH 6,0. Esse produto eluído foi preparado para purificação de GPC por concentração da amostra até aproximadamente 25 mg/ml de TRU-016, e depois esterilizado por filtração na preparação para a purificação de GPC.

A proteína purificada foi então submetida à, cromatografia por exclusão de tamanho GPC (SEC) para se obter uma purificação adicional da molécula de TRU-016 (dímero) de agregados de maior peso molecular. Com o uso de dPBS, uma coluna XK 50/100 (GE healthcare XK 50/100 cromatografia em coluna vazia, N° de Catálogo 18-8753-01) contendo 1 l de Superdex 200 FF sefarose foi equilibrada a 12,6 ml/min (38 cm/h) para 1,5 volume de coluna (CV). Um volume máximo de 54 ml (3% CV) de amostra foi aplicado à coluna. A coluna continuou a ser executada a 12,6 ml/min, e a proteína eluída foi fracionada em frações de 40 ml. Cada fração foi analisada quanto à qualidade do produto com o uso de uma HPLC analítica, e as frações eluídas foram reunidas em pool para TRU-016 com >95% POI (não agregado). Esse pool resultante foi esterilizado por filtração a 0,22 µm. O material foi então concentrado e formulado com 20 mM de fosfato de sódio e 240 mM de sacarose, com um pH resultante de 6,0. A composição é filtrada antes de ser preenchida em ampolas de vidro em uma concentração de 10 mg/ml. Cada ampola de vidro contém 5 mL de TRU-016 (50 mg/ampola).

A proteína de TRU-016 também foi submetida à análise SDS-PAGE em géis Tris-glicina Novex 4-20% (Invitrogen, San

Diego, CA). As amostras foram carregadas usando tampão de amostra Tris-glicina SDS Novex (2X) sob condições redutoras (adição de 1/10 volume de agente redutor de amostra NuPAGE) ou não redutoras após aquecimento a 95°C por 3 minutos, seguindo por eletroforese a 150 V por 90 minutos. A eletroforese foi realizada com o uso de tampão de execução Tris-glicina SDS Novex 1X (Invitrogen). Os géis foram corados após eletroforese em coloração Coomassie SDS PAGE R-250 por 30 minutos com agitação, e descorados por pelo menos uma hora. O peso molecular previsto do peptídeo maduro é de 51,5 kDa. Sob condições redutoras, a proteína de fusão migra no peso molecular esperado. Sob condições não redutoras, a molécula migra em aproximadamente 150 kDa (Figura 1B).

Também foram realizados ensaios para determinar se a especificidade de ligação do anticorpo original ao recetor de superfície celular de CD37 está preservada em TRU-016. PBMCs humanas foram isoladas sobre gradientes de densidade LSM, e incubadas com TRU-016 não conjugado e CD19 anti-humano conjugado a PE. As células foram lavadas e incubadas com IgG GAH 1:100 FITC (específica para Fc) por 45 minutos no gelo. As células foram lavadas e analisadas por citometria de fluxo bicolor em um instrumento FACsCalibur usando o programa de computador Cell Quest. As células foram agrupadas em linfócitos B ou não linfócitos B por coloração de CD19.

Com concentrações crescentes de TRU-016, o sinal de FITC nos linfócito B (agrupamento CD19-positivo) aumentou rapidamente de 0,01-1,0 µg/ml, até ter alcançado a saturação em aproximadamente 1 µg/ml ou uma intensidade

média de fluorescência (MFI) de 1.000. Em contraste, a coloração da população de não linfócitos B é detetável, mas muito baixa, e aumenta lentamente com concentração crescente de scFvlg. Dessa forma, o padrão de coloração do anticorpo monoclonal G28-1 murídeo é preservado com TRU-016 (Figura 1C).

As moléculas de ligação a CD37 de acordo com a invenção descrevem estruturas (domínios de ligação derivados de anticorpos, variantes de dobradiça, regiões.CH2CH3 iguais ou diferentes, e vários isótopos).

Exemplo 2

TRU-016 e Vários Anticorpos Específicos para CD37 Ligam-se aos Mesmos Epitopos ou a Epitopos Superpostos em CD37

Foram realizados ensaios para identificar o epitopo de CD37 ligado por TRU-016 e por outros anticorpos descritos previamente específicos para CD37.

MB371 não conjugado (n° 555457) e MB371 conjugado a FITC (n° 555456) foram obtidos de BD Pharmingen (San Jose, CA), BL14 conjugado a FITC (n° 0457) de Immunotech/Beckman Coulter (Fullerton, CA), NMN46 conjugado a FITC (n° RDI-CBL 136FT) e NMN46 não conjugado (n° RDI-CBL 136) de RDI (Flanders, NJ), IPO24 conjugado a FITC (n° 186-040) e IPO24 não conjugado (n° 186-020) de Ancell Corporation (Bayport, MN), HHI conjugado a FITC (n° 3 081) e HH1 não conjugado (n° 3080) de Diatec.com (Oslo, Noruega) e WR17 conjugado a FITC (YSRTMCA4 83F) e WR17 não conjugado (YSRTMCA4 8 3 S) de Accurate Chemical & Scientific (Westbury, NY). A

proteína de TRU-016 foi produzida como descrito no Exemplo 1.

TRU-016 foi conjugado a FITC em Trubion com o uso de um Kit "Molecular Probes Fluororeporter FITC Labeling" (F6434) de acordo com as instruções do fabricante da seguinte forma: o pico de interesse da proteína de TRU-016 (POI) a 13,5 mg/ml foi ajustado até 5 mg/ml com PBS. Um mg (200 ul) foi adicionado aos tubos do kit com uma barra de agitação, e 1 M de NaHCO₃ (ajustado até o pH 8,5 com 6 N de NaOH) foi adicionado até uma concentração final de 0,1 M. Foram adicionados 50 ul de DMSO a 370 ug de FITC, e foram adicionados aos tubos em proporções molares de 15, 20, 30 e 40 de FITC: proteína com o uso da fórmula seguinte para determinar os ul de FITC a serem adicionados: [ul de solução de FITC a serem adicionados = 5 mg/ml de proteína x 0,2 ml x 389 x 100 x proporção molar/peso molecular desejado de TRU-016 (110.000)].

As reações eram protegidas da luz e agitadas continuamente por 75 minutos em temperatura ambiente. As reações foram adicionadas às colunas giratórias preparadas como descrito no kit, e giradas a 1.100 g por 5 minutos para troca de tampão em PBS com azida e remoção do FITC não conjugado. OD a 280 nM e 494 nM foi determinada com gotas de 2 ul no Nanodrop; o coeficiente de extinção para TRU-016 foi determinado experimentalmente para esse instrumento por leitura de diluições do SMIP não conjugado de partida, a concentração de cada um dos conjugados foi de 4,25 mg/ml, e foram determinadas as seguintes proporções FITC: proteína: 2,7 FITC/TRU-016 em uma proporção de 15; 3,7 FITC/TRU-016

em uma proporção de 20; 4,4 FITC/TRU-016 em uma proporção de 30; e 5,1 FITC/TRU-016 em uma proporção de 40.

Foi adicionado BSA até 3 mg/ml para ajudar a estabilizar a proteína. A ligação de cada fração foi avaliada em diluições que variam de 100-24.300 x em PBMC Ramos e 3.200-25.600 em PBMC humana. Todas se ligaram, mas a proporção MR3 0 foi escolhida para uso posterior, uma vez que gerou uma MFI elevada que foi mantida ao longo do intervalo de titulação usado, indicando que a avidéz de ligação era menos afetada nessa reação.

Os conjugados de anticorpo marcado por FITC foram titulados de 10 ng/ml a 10 µg/ml em um estudo de ligação inicial para determinar as quantidades ótimas para serem usadas nos estudos de bloqueio. O nível escolhido era imediatamente abaixo das quantidades de saturação, e foi mantido constante nos ensaios subsequentes, enquanto os níveis de anticorpo de bloqueio foram aumentados em um intervalo de 10 vezes. Os dados foram colocados em um gráfico como percentual de ligação máxima versus concentração de anticorpo de bloqueio, de forma que níveis maiores indicam bloqueio menos eficiente, enquanto níveis menores indicam atividade de bloqueio mais eficiente. Todos os anticorpos testados mostraram atividade de bloqueio da ligação máxima observada sem reagentes não marcados (Figura 2).

As células BJAB, uma linhagem de célula B de linfoblastóide B (cortesia de Ed Clark, Universidade de Washington), foram então coradas com um painel de vários clones de MAbs anti-CD37, incluindo MB371, BL14, NMN4 6, IPO24, HH1, WR17 e o SMIP de TRU-016.

Para ensaios de ligação competitiva, $2,5 \times 10^5$ células BJAB foram incubadas em placas de 96 poços com fundo em "V" em meio de coloração (PBS com soros de camundongo 2%) com os MAbs anti-CD37 conjugados a FITC a 1,25 µg/ml na presença de MAb anti-CD37 não conjugado nas concentrações indicadas (2,5, 1,25, 0,6 ou 0,3 µg/ml) ou meio de coloração por 45 minutos no gelo no escuro. Anticorpos de bloqueio e conjugados de anticorpo marcado por FITC foram adicionados às reações, antes da adição de células. As células foram então lavadas 2½ vezes com PBS, e fixadas com paraformaldeído 1% (n° 19943, USB, Cleveland, Ohio). As células foram analisadas por citometria de fluxo com o uso de um instrumento FACsCalibur e o programa de computador Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Para o ensaio de bloqueio cruzado de FACs, $2,5 \times 10^5$ células BJAB foram incubadas em placas de 96 poços com fundo em "V" em meio de coloração (PBS com soros de camundongo 2%) na presença de MAb anti-CD37 não conjugado a 5 µg/ml de meio de coloração por 45 minutos em temperatura ambiente no escuro. MAbs anti-CD37 conjugados a FITC foram então adicionados até uma concentração final de 2 µg/ml, resultando em uma diluição dos reagentes não rotulados até 3,3 µg/ml. As reações foram então adicionalmente incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente no escuro. As reações foram lavadas 2,5 vezes com PBS, e fixadas em paraformaldeído 1% em PBS (n° 19943, USB, Cleveland, Ohio). As células foram analisadas por citometria de fluxo em um instrumento FACsCalibur com o uso do programa de computador Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Para ensaios de ligação celular, as células foram suspensas em PBS (n° 14040-133, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) contendo FBS 2% (n°16140-071, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) (meio de coloração) em uma concentração de aproximadamente 4×10^6 células/ml. As células foram então plaqueadas, e amostras de teste, diluídas em meio de coloração, foram então adicionadas 1:1 até as concentrações finais designadas. As reações foram incubadas por 45 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas e lavadas 2 vezes com PBS. IgG anti-humana de cabra com FITC (n° H10501, CalTag, Burlingame CA) foi adicionada em uma diluição final de 1:50, e incubada 45 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas, lavadas em PBS, e depois fixadas em 200 µl paraformaldeído 1% em PBS (n° 19943, USB, Cleveland, Ohio). As células foram analisadas por citometria de fluxo em um instrumento FACs Calibur com o uso do programa de computador Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA).

Cada anticorpo mostrou inibição dose-dependente da ligação, indicando que todas as moléculas testadas se ligaram a um epítipo idêntico ou intimamente relacionado. Uma potência diferente para inibição da ligação foi observada para cada anticorpo. SMIP de TRU-016 teve o maior nível de atividade de bloqueio de todas as moléculas testadas, enquanto HH1 gerou um nível intermediário de atividade de bloqueio, e WR17 e IPO24 bloquearam melhor do que MB371, mas mostraram bloqueio menos eficaz do que as outras duas moléculas não marcadas (Figura 2).

Além da análise da atividade de bloqueio, uma série similar de ensaios foi realizada, nos quais vários anticorpos

dirigidos a CD37 foram testados quanto à sua habilidade para competir uns com os outros pela ligação ao recetor CD37. Os resultados desses ensaios, como os resultados obtidos nos estudos de bloqueio para todas as moléculas testadas, indicaram que os vários anticorpos dirigidos a CD37 e TRU-016 possuem os mesmos epitopos ou epitopos intimamente superpostos.

Exemplo 3

TRU-016 é Deficiente na Ligação de Clq e Ativação da Via Clássica de Ativação de Complemento

Foram realizados ensaios para explorar por que o pico de dímero de TRU-016 não medeia níveis significativos de morte dependente de complemento de células B-alvo. Uma possibilidade era que o dímero de TRU-016 mostra ligação reduzida aos componentes da cascata do complemento em relação ao anticorpo normal de IgG1 humana. Dessa forma, foram feitos ensaios para determinar se TRU-016 ativa a via clássica de ativação de complemento verificando-se a ligação de TRU-016 a Clq. Clq é uma subunidade do complexo enzimático C1 que ativa o sistema de complemento sérico, e é o componente de reconhecimento da via clássica de ativação de complemento.

Os estudos de ligação de Clq foram realizados como descrito previamente (Cragg e cols., Blood 2004, 103: 2.738-2.743). Resumidamente, células B Ramos em meio Iscoves (nº 12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) sem soro foram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo em "V" a 5×10^5 células/poço em 100 µl. As células foram incubadas com

reagentes por 15 minutos a 37 °C, e soro humano normal (NHS, nº A113, Quidel Corp., San Diego, CA) diluído em Iscoves foi então adicionado em um volume de 50 µl a cada poço para uma concentração final de 10, 5, 2,5, ou 1,25% de soro humano. Cinquenta µl de meio foram adicionados ao poço de controle. Para ensaios com fator de veneno de cobra (CVF), CVF foi adicionado a amostras de complemento de soro humano a 20 Unidades CVF/ml de soro por 90 minutos a 37°C, antes da adição de soro aos ensaios de complemento, e a diluição de soro por CVF ocorria quando se faziam as diluições da amostra.

A fonte de células mais complemento foi incubada por mais 5 minutos a 37°C, e lavada 2 vezes com PBS gelado (nº 14040-133, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) através de centrifugação, e ressuspensa em 100 µl de PBS. Cinquenta µl de cada poço foram transferidos para uma segunda placa para uma segunda coloração de controle. Ambas as placas foram coradas por 15 minutos no escuro no gelo, com anti-Clq HU de carneiro com FITC (nº C7850-06A, US Biological, Swampscott, Mass) ou IgG de carneiro com FITC (nº 11904-56P, US Biological, Swampscott, Mass). As amostras foram lavadas, ressuspensas em PBS gelado, e lidas imediatamente em um citômetro de fluxo FACScalibur e analisadas com o programa de computador Cell Quest (Becton Dickinson, San Jose, CA).

FITC Clq não se liga bem a quaisquer subfrações de TRU-016 purificado por SEC, embora a fração agregada de maior peso molecular (HMW) ou A2 exiba mais ligação do que as outras formas (Figura 3A). Em contraste, Rituxan mostrou um nível significativo de ligação de Clq, particularmente em níveis

menores de NHS. A presença de CVF não bloqueou completamente essa ligação, embora os níveis de MFI estejam significativamente reduzidos comparados com meio isoladamente.

Foram então efetuados ensaios da CDC para comparar a habilidade das diferentes subfrações das formas purificadas de TRU-016 e Rituxan para mediar a morte celular na presença ou ausência de CVF e complemento de soro humano (Figura 3B). Os ensaios da CDC foram realizados com o uso de coloração com iodeto de propídio para discriminar entre células vivas e mortas após incubações de células-alvo com anticorpo, proteínas de fusão, líquido ascítico, formas moleculares de TRU-016 ou meio, e uma fonte de complemento, por exemplo, soro humano. Resumidamente, 3×10^5 células B Ramos foram pré-incubadas com reagentes de teste por 30-45 minutos a 37 °C, antes da adição de complemento. As amostras pré-ligadas foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em Iscoves com soro humano (n° A113, Quidel, San Diego, CA) nas concentrações indicadas, e depois incubadas por 90 minutos a 37°C. As amostras foram lavadas e foi adicionado iodeto de propídio (n° P-16063, Molecular Probes, Eugene, OR) até uma concentração final de 0,5 µg/ml em PBS. As células foram incubadas com o iodeto de propídio por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, e depois analisadas por citometria de fluxo em um instrumento FACsCalibur com o programa de computador Cell Quest (Becton Dickinson).

A morte celular mediada tanto por fração A2 de TRU-016 quanto por Rituxan foi significativamente reduzida na

presença de CVF, apesar de seu fracasso em bloquear completamente a ligação de C1q (Figura 3B).

Complemento humano e de coelho foram então comparados quanto à sua atividade de CDC na presença do TRU-016. A atividade de CDC de formas moleculares de TRU-016 incubadas com células B Ramos e complemento humano ou de coelho foi medida (Figura 3C). Células B Ramos foram adicionadas aos poços em meio sem soro. Rituxan ou o dímero, HMW A2, ou as frações pA de TRU-016, foram adicionados às células para gerar uma concentração final de 10 µg/ml, e incubados por 15 minutos a 37°C, antes da lavagem com meio sem soro 1,5X e adição de soro humano normal (NHS) ou complemento de coelho (Pelfreez) a 10, 5 ou 2,5%. A fonte de células mais complemento foi incubada por 90 minutos a 37°C. As células foram lavadas uma vez com PBS gelado, e foi adicionado iodeto de propídio (Molecular Probes n°P3566) até uma concentração final de 0,5 µg/ml em PBS gelado. As células com PI foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos, e analisadas por citometria de fluxo.

A origem da fração do complemento afeta os resultados de CDC obtidos (Figura 3C). O complemento de coelho mediou níveis de CDC maiores do que o complemento humano na presença de formas moleculares de TRU-016. Curiosamente, a forma dimérica do TRU-016 mediou boa CDC com o uso de complemento de coelho, mas atividade de CDC muito baixa na presença de complemento humano.

Exemplo 4

Atividade e ligação de multímeros de TRU-016

Foram realizados ensaios para examinar a atividade biológica de formas multiméricas de TRU-016 (multímeros de TRU-016) em solução. Inicialmente, para determinar o tamanho de proteína de fusão de TRU-016 em solução, o material purificado por proteína A foi analisado por SEC HPLC e revelou que TRU-016 existe em múltiplas formas em solução (Figura 4).

Foram obtidos traços de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) HPLC de purificação de GPC de TRU-016, formando-se um gráfico de absorbância versus tempo de retenção para as diferentes frações coletadas (Figura 4). TRU-016 foi purificado a partir de sobrenadantes de cultura de células inicialmente por cromatografia de afinidade com o uso de Sefarose Proteína A. A molécula recombinante foi eluída da coluna com 100 mM de glicina, pH 3,5. Frações de 10 ml do produto eluído foram recuperadas, e o produto eluído foi levado até o pH 5,0 com 20% do volume eluído de 0,5 M de ácido 2-(N-Morfolino)etanossulfônico (MES), pH 6,0. O eluído foi preparado para purificação de GPC por concentração da amostra até aproximadamente 25 mg/ml de TRU-016, e depois esterilizado por filtração na preparação para a purificação de GPC. A cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada em um aparelho GE Healthcare AKTA Explorer 100 Air, usando uma coluna GE healthcare XK e Superdex 200 de grau preparatório (GE Healthcare).

Os poços de HMW ou A2 exibiram um tempo de retenção de aproximadamente 6,23 minutos, enquanto a forma mais proeminente exibiu um tempo de retenção de 8,38 minutos. O padrão de referência utilizado aqui (padrão pA ou std) é o material purificado por proteína A contendo tanto as formas

diméricas quanto multiméricas HMW, como mostrado no primeiro painel da Figura 4. A forma mais proeminente, que migra em um tempo de retenção de 8,38 minutos, mais provavelmente corresponde à molécula dimérica observada em SDS-PAGE não reduzida, e várias formas menores mais provavelmente correspondem aos multímeros que se associam através de interações não covalentes, na medida em que são menos evidentes em SDS-PAGE não redutora. Para separar essas formas diferentes de TRU-016, o material obtido da cromatografia de afinidade com proteína A sefarose dos sobrenadantes da cultura foi adicionalmente purificado por GPC e fracionamento por HPLC para isolar a forma dimérica (identificada como "dímeros" ou "pico de dímeros") dos multímeros de peso molecular mais elevado (identificados como HMW ou fração A2 agg). Cada uma dessas três subfrações foi então analisada separadamente quanto à atividade funcional in vitro com o uso de ensaios de ligação, da ADCC e da CDC.

Para explorar se as frações isoladas de SEC exibiam diferentes propriedades de ligação, cada fração de TRU-016 SEC foi testada quanto à ligação a células Ramos. Para determinar as propriedades de ligação de frações de SEC, as células foram suspensas em meio de coloração em uma concentração de aproximadamente 4×10^6 células/ml, e depois plaqueadas a 50 µl/poço (2×10^5 células/poço) em meio de coloração. Diluições seriadas de frações de SEC foram então adicionadas aos poços sequenciais, incubadas por 45 minutos, lavadas, e a atividade de ligação foi detectada com a utilização de IgG anti-humana de cabra com FITC. As amostras foram fixadas em 200 µl 1% de paraformaldeído em PBS. As células foram analisadas por

citometria de fluxo em um instrumento FACsCalibur com o uso do programa de computador Cell Quest (BD Biosciences, San Jose, CA) (Figura 5A).

Para determinar a atividade de CDC de frações de SEC, as células foram suspensas a 5×10^5 células/poço em 75 µl de IMDM. As frações de SEC de TRU-016 (75 µl) foram adicionadas às células no dobro das concentrações indicadas. Foi permitido que as reações de ligação prosseguissem por 45 minutos, antes da centrifugação e lavagem em Iscoves sem soro. As células foram ressuspensas em Iscoves com soro humano (n° A113, Quidel, San Diego, CA) nas concentrações indicadas. As células foram incubadas por 60 minutos a 37°C, lavadas e ressuspensas em meio de coloração com 0,5 µg/ml de iodeto de propídio (PI, n° P-16063, Molecular Probes, Eugene OR). As amostras foram incubadas 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, antes da análise por citometria de fluxo com o uso de um instrumento FACsCalibur e do programa de computador Cell Quest (Becton Dickinson) (Figura 5B).

Para determinar a atividade de ADCC de frações de SEC, células BJAB, Ramos e linfoblastóides B Daudi (10^7) foram marcadas com 500 µCi/ml de ^{51}Cr cromato de sódio por 2 horas a 37°C em IMDM/FBS 10%. PBMCs foram isoladas de 20 sangue humano total heparinizado por fracionamento sobre Meio de Separação de Linfócitos (LSM, ICN Biomedical) gradientes. Foram adicionadas amostras de reagente ao meio RPMI com FBS 10%, e foram preparadas cinco diluições seriais para cada reagente. Para combinações, os reagentes foram pré-misturados e diluídos, antes da adição aos poços. As BJAB marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas a (2×10^4

células/poço). As PBMCs foram então adicionados a (5×10^5 células/poço) para uma proporção final de 25:1 de efetores (PBMC):alvos (BJAB). As reações foram preparadas em poços em quadruplicado de uma placa de 96 poços. As frações de SEC de TRU-016 foram adicionadas aos poços em uma concentração final que varia de 10 ng/ml a 20 µg/ml, como indicado nos gráficos. Cada série de dados mostra uma fração de SEC diferente nas faixas de titulação descritas. Foi permitido que as reações prosseguissem por 6 horas a 37°C em CO₂ 5%, antes da coleta e contagem. A CPM liberada foi medida em um Packard TopCounNXT de 50 µl de sobrenadante de cultura seco. O percentual de morte específica foi calculado subtraindo-se (cpm [média de amostras em quadruplicado] da amostra-cpm liberação espontânea)/(cpm liberação máxima-cpm liberação espontânea) x 100 (Figura 5C).

A Figura 5A mostra as curvas de titulação da ligação de diferentes frações de SEC às células Ramos. Todas as moléculas fracionadas ligaram-se a CD37 com curvas de ligação similares, exceto nas maiores concentrações-testadas, em que o material HMW exibiu melhor ligação (maior intensidade de fluorescência) do que o padrão pA e as formas de pico de dímero.

Também foram realizados ensaios para determinar se as frações de SEC de TRU-016 exibiam níveis diferentes de atividade funcional, por exemplo, morte de célula-alvo mediada por CDC e ADCC. O gráfico mostrado na Figura 5B indica que apenas a fração purificada de multímero HMW mediou níveis significativos de atividade de CDC contra células B Ramos com o uso de complemento humano. O padrão

pA exibiu alguma atividade de CDC em concentrações maiores, enquanto a forma de pico de dímero mostrou muito pouca ou nenhuma atividade de CDC em todas as concentrações testadas.

Foram realizados ensaios da ADCC em diluições seriadas de frações de TRU-016 de vários tamanhos usando células B BJAB marcadas como alvos e PBMC humana como células efectoras. As frações de SEC de TRU-016 estavam presentes nos poços em uma concentração final que varia de 10 ng/ml a 20 µg/ml, como indicado no gráfico mostrado na Figura 5C. Cada série de dados mostrava uma fração de SEC diferente nas faixas de titulação descritas. Os dados foram colocados em um gráfico com a % de morte específica versus concentração de proteína. Todas as subfrações de SEC, incluindo o padrão pA, fração HMW ou A2 e o pico de dímero, mediaram ADCC potente, dose-dependente, contra células BJAB-alvo. Resultados similares também foram obtidos com o uso de células Ramos como alvos marcados (dados não mostrados).

Exemplo 5

Produção de uma molécula de ligação específica para CD20

SMIPs específicos para CD20 são descritos nas Publicações de Patente U.S. de co-propriedade 2003/133939, 2003/0118592 e 2005/0136049. A produção de um SMIP específico para CD20 exemplar, TRU-015, é descrita abaixo.

TRU-015 é uma proteína de cadeia única recombinante (muridea/humana) que se liga ao antígeno CD20. O domínio de ligação foi baseado em uma sequência de anticorpo CD20

humano disponível publicamente. O domínio de ligação está conectado ao domínio efetor, os domínios CH2 e CH3 de IgG1 humana, através de uma região de dobradiça CSS modificada. TRU-015 existe como um dímero em solução, e o dímero tem um peso molecular teórico de aproximadamente 106.000 dáltons. A sequência de nucleotídeos que codifica TRU-015 e a sequência de aminoácidos de TRU-015 são apresentadas, respectivamente, nos IDS. DE SEQ. N^{os}: 3 e 4.

Em relação à sequência de aminoácidos apresentada no ID. DE SEQ. N^o: 4, TRU-015 compreende a sequência de clonagem do peptídeo-líder 2el2 dos aminoácidos 1-23; a 2H7 região variável da cadeia leve de CD20 murídea anti-humana com uma substituição aminoácidos de lisina para serina (VHL11S) no resíduo 11 na região variável, que é refletida na posição 34; um vinculador asp-gly3-ser-(gly4ser)2 que começa no resíduo 129, com o vinculador tendo uma serina adicional na extremidade para incorporar o sítio de restrição SacI para embaralhamento do cassete; a região variável da cadeia pesada de CD20 murídea anti-humana 2H7, que não possui um resíduo de serina na extremidade da região da cadeia pesada, ou seja, alterada de VTVSS para VTVS; um domínio de Fc de IgG1 humana, incluindo uma região de dobradiça modificada que compreende uma sequência (CSS), e domínios CH2 e CH3 do tipo selvagem.

As células CHO que produzem TRU-015 foram cultivadas em um biorreator com o uso de meios proprietários. TRU-015 foi purificado com o uso de uma série de etapas de cromatografia e filtração, incluindo um filtro de redução de vírus. O material foi então concentrado e formulado com 20 mM de fosfato de sódio e 240 mM de sacarose, com um pH

resultante de 6,0. A composição é filtrada antes de ser preenchida em ampolas de vidro em uma concentração de 10 mg/ml. Cada ampola de vidro continha 5 ml de TRU-015 (50 mg/ampola).

Exemplo 6

Combinações de TRU-016 com TRU-015 ou Rituxan

Aumentam sinergicamente a apoptose em células B

Foram efetuados ensaios que examinam o efeito de SMIPS dirigidos às células B sobre a apoptose da linhagem de células B. Cada SMIP foi testado individualmente, e depois em combinação. As amostras foram analisadas 24 e 48 horas após o início das reações de incubação. A análise de anexina/PI foi realizada da seguinte forma: células BJAB (cortesia de Ed Clark, Universidade de Washington), células Ramos (ATCC n° CRL-1596) e células Daudi foram incubadas 24 ou 48 horas a 37°C em 5% CO₂ em meio Iscoves completo (Gibco) com FBS 10% a 3 X 10⁵ células/ml e 20 µg/ml de proteína de SMIP. Além disso, 20 µg/ml IgG de cabra anti-humana foram adicionados às reações a fim de entrecruzar os reagentes na superfície celular. As células foram então coradas com anexina V-FITC e iodeto de propídio usando o "BD Pharmigen Apoptose Detection Kit I" (n° 556547), e processadas de acordo com as instruções do kit. Resumidamente, as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado, e ressuspensas em "tampão de ligação" a 1 X 10⁶ células/ml. Cem microlitros das células em tampão de ligação foram então corados com 5 µL de Anexina V-FITC e 5 µL de iodeto de propídio. As células foram gentilmente

turbilhonadas e incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos. Quatrocentos microlitros do tampão de ligação foram então adicionados a cada amostra. Elas foram então lidas e analisadas em um instrumento FACsCalibur (Becton Dickinson) com o uso do programa de computador Cell Quest (Becton Dickinson).

A Tabela 2 abaixo mostra que, na presença de reticulação, o tratamento com TRU-016 teve um efeito mais significativo sobre a apoptose de linhagens celulares do que TRU-015 isoladamente, embora ambas as moléculas, quando usadas isoladamente, induzem alguma apoptose. O aumento varia, dependendo da linhagem celular.

TABELA 2

Bjab	Anexina V-positivas	
Sem SMIP	17,5	
SMIP CD20	27	
SHIP CD37	30,6	
SHIP CD19	29,1	
SMIP CD20+CD37	41	
SMIP CD20+CD19	37,1	
SMIP CD37+CD19	35,3	
		Mais GAM
Ramos	Anexina V-positivas	Anexina V-positivas
Somente células	3	3,3

MAb CD2 0	1,4	3,1
Mab CD37	18,3	8,7
MAb CD19	3,7	3,1
MAb CD4 0	3,9	8,3
CD2 0+CD37	32,3	35,7
CD20+CD19	5	10,5
CD20+CD4 0	5,7	19,4
CD19+CD37	26,9	50
CD19+CD4 0	8,2	18,4

Exemplo 7

Combinações de TRU-016 com anticorpos ou SMIPs específicos para CD20 aumentam sinergicamente a CDC

Foram realizados ensaios para determinar a atividade de CDC de combinações de TRU-016 com anticorpos específicos para CD20 ou SMIPS contra células B. A quantidade de reagentes escolhida para os ensaios de combinação foi de 0,5 µg/ml de TRU-016, enquanto a de TRU-015 também foi de 0,5 µg/ml. A concentração de rituxan foi normalmente de 0,04-0,06 µg/ml, por causa de sua maior atividade em ensaios de CDC de reagente único. Em alguns ensaios, a concentração de reagente CD20 foi mantida constante em uma concentração subótima, enquanto a concentração de TRU-016 era variada para explorar os níveis mínimos de reagente dirigido a CD37 necessários para observar o aumento dos efeitos sobre a CDC.

As células foram suspensas em Iscoves (n° 12440-053, Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY) a 5×10^5 células/poço em 75 µl. TRU-016 (75 µl), TRU-015, rituxan ou combinações desses reagentes foram adicionadas às células no dobro das concentrações indicadas. Foi permitido que as reações de ligação prosseguissem por 45 minutos, antes da centrifugação e lavagem em Iscoves sem soro. As células foram ressuspensas em Iscoves com soro humano (n° A113, Quidel, San Diego, CA) nas concentrações indicadas. As células foram incubadas por 60 minutos a 37°C. As células foram lavadas por centrifugação e ressuspensas em 125 µl de PBS com FBS 2% (n° 16140-071, Gibco, Invitrogen, Grand Island, NY), meio de coloração. As células foram transferidas para tubos agrupados de FACS (n° 4410, CoStar, Corning, NY) e 125 µl de meio de coloração com 5 µl de iodeto de propídio (PI, n°P-16063, Molecular Probes, Eugene OR) foram adicionados. As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, antes da análise por citometria de fluxo com o uso de um instrumento FACsCalibur e do programa de computador CellQuest (Becton Dickinson).

A Figura 6 mostra que, em concentrações subótimas para a morte como agente único, TRU-015 e rituxan exibiram níveis maiores de atividade de CDC quando combinados com TRU-016. TRU-016 isoladamente não mediou CDC, a menos que estejam presentes agregados. A eliminação de Clq das reações causa a eliminação de toda a atividade de CDC observada.

A Figura 7 mostra um ensaio de combinação realizado em células B DHL-4. A adição de TRU-016 às reações de CDC produz uma mudança para baixo na curva de morte por TRU-

015, demonstrando morte mais eficaz em cada concentração testada, embora TRU-016 exiba pouca ou nenhuma atividade isoladamente.

A Figura 8 mostra outro ensaio de CDC no qual os reagentes da amostra foram misturados nas seguintes proporções: 0,5 µ/ml de TRU-015, 0,5 µg/ml de TRU-016 e 0,06 µg/ml de rituxan. Novamente, os agentes únicos são usados em concentrações subótimas a fim de observar os feitos de aumento na presença de TRU-016. Tanto para TRU-015 quanto para rituxan, TRU-016 aumenta o nível de morte por CDC quando adicionado aos ensaios.

As Figuras 9 e 10 mostram representações gráficas dos dados para os ensaios da CDC nos quais a concentração de TRU-015 ou rituxan foi mantida constante, e a concentração de TRU-016 foi aumentada. Novamente, a atividade de CDC foi maior quando TRU-016 foi adicionado às reações, mas o aumento da concentração de TRU-016 até 2,5 µg/ml a partir de 0,5 µg/ml não aumenta significativamente a morte mediada por CDC nesses ensaios.

Exemplo 8

TRU-016 aumenta a atividade de ADCC e CDC de anticorpos e SMIPs específicos para CD20

Foram realizados ensaios para determinar se combinações de TRU-016 SMIP com anticorpos específicos para CD20 ou SMIPs poderiam aumentar a atividade de ADCC e de CDC contra células B-alvo.

Células BJAB Ramos e células linfoblastóides B Daudi ($10E7$) foram marcadas com $500\text{ }\mu\text{Ci/ml}$ de ^{51}Cr cromato de sódio por 2 horas a 37°C em IMDM/FBS 10%. As células BJAB marcadas foram lavadas três vezes em RPMI/FBS 10% e ressuspensas a $4 \times 10E5$ células/ml em RPMI. Sangue humano total heparinizado foi obtido de doadores internados anônimos e as PBMCs isoladas por fracionamento sobre gradientes de Meio de Separação de Linfócitos (LSM, ICN Biomedical). As camadas de células brancas foram coletadas e lavadas duas vezes em RPMI/FBS 10%, antes da ressuspensão em RPMI/FBS 10% em uma concentração final de $3 \times 10E6$ células/ml. As células foram contadas por exclusão de azul tripiano usando um hemocitómetro antes de serem utilizadas em ensaios subsequentes. Foram adicionadas amostras de reagente ao meio RPMI com FBS 10% a 4 vezes a concentração final, e foram preparadas cinco diluições seriadas para cada reagente. Para as combinações, os reagentes foram pré-misturados e diluídos, antes da adição aos poços. Esses reagentes foram então adicionados a placas de 96 poços com fundo em U a $50\text{ }\mu\text{l/poço}$ para as concentrações finais indicadas. As células BJAB marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas às placas a $50\text{ }\mu\text{l/poço}$ ($2 \times 10E4$ células/poço). As PBMCs foram então adicionadas às placas a $100\text{ }\mu\text{l/poço}$ ($3 \times 10E5$ células/poço) para uma proporção final de 15:1 de efetores (PBMC): alvo (BJAB).

Os efetores e os alvos foram adicionados ao meio isoladamente para medir a morte de fundo. As células BJAB marcadas com ^{51}Cr foram adicionadas ao meio isoladamente para medir a liberação espontânea de ^{51}Cr e ao meio com NP40 5% (n° 28324, Pierce, Rockford, IL) para medir a liberação máxima de ^{51}Cr . As reações foram preparadas em

poços em quadruplicado em uma placa de 96 poços. SMIPs foram adicionadas aos poços em uma concentração final que varia de 12 ng/ml a 10 µg/ml, como indicado nos gráficos. Para combinações de SMIP, os reagentes foram misturados antes da adição aos poços. Cada série de dados representa um único SMIP diferente ou a combinação nas faixas de titulação descritas. Foi permitido que as reações prosseguissem por 6 horas a 37°C em CO₂ 5%, antes da coleta e contagem. Cinquenta µl do sobrenadante de cada poço foram então transferidos para uma Placa Luma 96 (n° 6006633, Perkin Elmer, Boston, Mass) e secos de um dia para o outro em temperatura ambiente. A CPM liberada foi medida em um Packard TopCounNXT. O percentual de morte específica foi calculado subtraindo-se (cpm {média de amostras em quadruplicado) da amostra - cpm liberação espontânea) /(cpm liberação máxima-cpm liberação espontânea) x 100.

Os dados foram colocados em um gráfico coma % de morte específica versus concentração de SMIP. A proporção de efetor para alvo é indicada em cada figura, e a linhagem de célula-alvo também foi indicada. As Figuras 11, 12 e 13 mostram dados para ensaios em diferentes linhagens celulares (BJAB, Daudi e Ramos) nos quais foi utilizado o mesmo doador.

Nas Figuras 14 e 15 (rituxan + TRU-016) e nas Figuras 16 e 17 (TRU-015 + TRU-016), são apresentados os dados para ensaios nos quais a linhagem de célula-alvo usada foi BJAB. A morte específica observada para cada combinação foi maior do que com um reagente único isoladamente na mesma concentração, indicando que os SMIPs dirigidos a CD20 e

CD37 aumentam a morte mediada pelo outro, embora o efeito de aumento não seja completamente aditivo.

Dessa forma, TRU-016 pode aumentar a morte por ADCC de células B mediada por SMIP específico para CD20 ou anticorpo específico para CD20.

Foram projetados ensaios iniciais para explorar os efeitos de combinações de TRU-016 com anticorpos dirigidos a CD20 para determinar as quantidades relativas de cada reagente a serem usadas de forma que a sinergia de CDC possa ser detetável. Células Ramos foram suspensas em IMDM, e TRU-016, Rituxan ou combinações desses reagentes foram adicionadas às células até as concentrações finais indicadas na Figura 18. Foi permitido que as reações de ligação prosseguissem por 45 minutos, antes da centrifugação e lavagem em Iscoves sem soro. As células foram ressuspensas em Iscoves com 10% NHS. As células foram incubadas por 60 minutos a 37°C. Nos ensaios mostrados na Figura 18A-C, as células foram lavadas por centrifugação, e ressuspensas em meio de coloração contendo 0,5 µg/ml de iodeto de propídio (PI, n°P-16063, Molecular Probes, Eugene OR). As amostras foram incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, antes da análise por citometria de fluxo com o uso de um instrumento FACsCalibur e do programa de computador Cell Quest (Becton Dickinson).

O pico de dímero de TRU-016 mais altamente purificado é um mediador pobre da CDC quando usado isoladamente, como mostrado na Figura 18A pela curva de dose-resposta plana, até mesmo em concentrações elevadas. Como os reagentes dirigidos a CD20 foram indutores eficientes da atividade de

CDC, eram desejáveis quantidades não saturantes dos reagentes dirigidos a CD20 em ensaios de combinação, de tal forma que a sinergia entre os reagentes pudesse ser detectada. A partir desses estudos iniciais, a quantidade normal de reagente escolhida para os ensaios de combinação foi de 0,5 µg/ml ou 2 µg/ml de TRU-016. A concentração de Rituxan foi normalmente de 0,04-0,06 µg/ml, por causa de sua atividade maior em ensaios de CDC de reagente único. Em alguns ensaios, a concentração de reagente CD20 foi mantida constante em uma concentração subótima, enquanto a concentração de TRU-016 foi variada para explorar os níveis mínimos de reagente dirigido a CD37 necessários para observar efeitos de aumento sobre a CDC. Dessa forma, TRU-016 isoladamente não medeia CDC, a menos que estejam presentes agregados.

A Figura 18B mostra um gráfico da percentagem de células vivas (PI-negativas) observada ao longo da faixa de titulação indicada (0,06-0,5 µg/ml) quando Rituxan é usado isoladamente ou em combinação com TRU-016 a 2,5 µg/ml. Rituxan, quando usado em uma faixa de doses subótimas para morte como agente único, exibe níveis maiores de atividade de CDC EM cada concentração quando combinado com TRU-016 (Figura 18B). A eliminação de Clq das reações causa a eliminação de toda a atividade de CDC observada (Figura 3B).

Na Figura 18C, as amostras também foram incubadas com FITC anti-Clq por 45 minutos no gelo, antes da análise por citometria de fluxo. A separação de linfócitos ocorreu em células comprometidas. A percentagem de células nessa separação aumentava com concentrações crescentes de

Rituxan, e a MFI relativa para essa população de células foi colocada em um gráfico. A Figura 18C mostra os resultados de um ensaio de CDC em que os reagentes da amostra foram misturados nas seguintes proporções: 0,5 µg/ml para TRU-016, e concentrações de Rituxan que variam de 0,06 µg/ml a 0,5 µg/ml, e as células foram coradas com PI antes da citometria de fluxo. Os resultados mostram um aumento dose-dependente da MFI com doses crescentes de Rituxan. A adição de formas diméricas de TRU-016 resultou em um aumento adicional da MFI em cada concentração de Rituxan. Uma série similar de ensaios da CDC foi realizada, mantendo a concentração de Rituxan constante e aumentando a concentração de TRU-016. Novamente, a atividade de CDC foi maior quando TRU-016 foi adicionada às reações de Rituxan, mas o aumento da concentração de TRU-016 até 2,5 µg/ml a partir de 0,5 µg/ml não aumentou significativamente a morte mediada por CDC nesses ensaios (dados não mostrados).

Rituxan e as proteínas de TRU-016 usados isoladamente e em combinação entre eles foram comparados quanto à sua atividade de ADCC in vitro com o uso de uma faixa de concentração similar à usada para os ensaios da CDC. A Figura 18D mostra os resultados de um ensaio da ADCC com células Ramos marcadas como alvo e células PBMC humanas como efetoras em uma proporção efetor: alvo de 25:1, usando TRU-016 ou Rituxan, isoladamente e em combinação entre si ao longo das faixas de concentração indicadas. Foram obtidos dados similares em uma proporção efetor: alvo de 12,5:1. Tanto a forma dimérica de TRU-016 quanto Rituxan medeiam níveis significativos de ADCC contra células Ramos que expressam os antígenos-alvo CD20 e CD37; no entanto, a

combinação dos dois reagentes não resulta em aumento significativo do nível de morte.

Exemplo 9

TRU-016 induz apoptose em células B

Foram feitos ensaios que examinam o efeito de TRU-016 sobre a apoptose da linhagem de células B. Os ensaios iniciais dos efeitos sobre a apoptose de moléculas de TRU-016 dirigidas a diferentes recetores de célula B foram realizados com o uso de material purificado por proteína A que ainda continham agregados de ordem superior. Após tratamento de 24 horas com anticorpos CD37 ou moléculas projetadas de TRU-016, foram observados padrões similares de apoptose aumentada em vários ensaios com o uso de percentagens de células positivas para anexina V como uma medida da atividade aptotótica, e tanto células Ramos quanto células BJAB como alvos de ligação (dados não mostrados).

A Figura 19A demonstra que a apoptose é significativamente aumentada após incubação de linhagens de células B com TRU-016 não fracionado. A Figura 19A mostra um dot plot de coloração com anexina V-PI de células Ramos após incubação por 24 horas com o TRU-016 (10 µg/ml). A % de células anexina V-PI duplamente positivas aumentou de 11,3% da população total para 32,8%, e a % de células anexina V positive-PI-negativas aumentou de 8,5% para 19,7%, indicando que a apoptose é induzida após exposição a TRU-016. Foram obtidos dados similares com o uso células de Ramos ou BJAB como alvos de ligação nesses ensaios.

Foram realizados ensaios adicionais que examinam o efeito de TRU-016 sobre a apoptose da linhagem de células B com o uso da forma dimérica mais altamente purificada de TRU-016 (Figura 19B). As amostras foram analisadas tanto em 24 e 48 horas após o início das reações de incubação. A análise de anexina/PI foi efetuada em vários tipos de células com a utilização de 20 µg/ml de proteína de TRU-016. Como a apoptose era reduzida com o uso da forma dimérica de TRU-016, 20 µg/ml de IgG anti-humana de cabra foram adicionados às reações a fim de entrecruzar os reagentes na superfície celular. As células foram então coradas com anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os dados mostrados na Figura 19B demonstram que o pico de dímero de TRU-016 induz apoptose de células Daudi após 24-48 horas, mas que a presença de um agente de reticulação, por exemplo, IgG anti-humana, resulta num aumento significativo do nível de apoptose dirigida a CD37.

Também foram realizados ensaios para determinar o efeito de TRU-016 sobre células B humanas normais em cultura com o uso de PBMCs humanas. As Figuras 20A e 20B mostram resultados de um desses ensaios, com gráficos de coluna da percentagem de linfócitos CD19- ou CD40- positivos (células B) presente em culturas de PBMCs tratadas por 48-72 horas somente com meio, TRU-016 ou Rituxan.

As PBMCs humanas foram isoladas de sangue total por centrifugação de densidade LSM. As células foram incubadas por 48 ou 72 horas com 1 µg/ml de Rituxan ou TRU-016. Uma porção da reação de incubação foi coletada em 48 horas e novamente em 72 horas após início do ensaio. As PBMCs foram lavadas e incubadas com FITC anti-CD19, FITC anti- CD40 ou

FITC anti-CD3 por 45 minutos no gelo. A percentagem total de linfócitos que coram com esses reagentes foi então tabulada e comparada com amostras de PBMCs incubadas sob condições similares, mas sem reagentes de teste, e coradas como as amostras tratadas. As Figuras 20A e B mostram gráficos de colunas da fração da população total de linfócitos (%) que gerou um sinal FACS positivo após 48 e 72 horas com os reagentes indicados. A Figura 20C mostra um gráfico composto de um ensaio similar, que mostra a redução percentual a partir do número original de linfócitos que expressam o antígeno CD indicado (ou seja, CD19, CD40 ou CD3-positivos) após incubação de PBMCs com TRU-016 (a 1 µg/ml) por 24 e 72 horas.

Na presença de reticulação, o tratamento com a forma dimérica de TRU-016 ou Rituxan resultou em uma redução na percentagem de linfócitos B em culturas de PBMCs medida por coloração positiva para CD19 e CD40. Embora a percentagem de linfócitos B em cultura fosse baixa no início do ensaio, a co-cultura com Rituxan ou TRU-016 diminuiu o número de linfócitos CD19 e CD40-positivos na cultura de PBMCs em aproximadamente 1,5-2 vezes após 48 horas, e em mais de 3 vezes após 72 horas. Esse padrão geral de eliminação de células B após 48-72 horas era reprodutível em todas as culturas de PBMCs normais testadas, independentemente da percentagem de partida inicial de linfócitos B nessas culturas, que variou de aproximadamente 3% alcançando até 7% dos linfócitos totais, dependendo da amostra.

A Figura 20C mostra um gráfico de colunas da percentagem de eliminação de linfócitos B, comparada com linfócitos T em culturas de PBMCs de curto prazo incubadas com TRU-016 por

24 a 72 horas. Esses dados indicam que o TRU-016 é capaz de eliminação específica de linfócitos B CD37-positivos de culturas do sangue periférico normal, e que o nível baixo de ligação por TRU-016 a não linfócitos B (Figura 1C) é insuficiente para mediar eliminação significativa desses linfócitos da população de células.

Exemplo 10

Combinações De Tru-016 E Rituximab Reduzem Significativamente O Volume Tumoral Em Um Modelo Murídeo De Xenoenxerto Tumerais

Foram realizados estudos de xenoenxerto tumoral em camundongo que exploram terapias de combinação com o uso de camundongos atímicos (nude) (Harlan) e linhagens tumorais humanas Ramos ou Daudi. Células tumorais Ramos ou Daudi cresceram em ampolas T150 em IMDM/FBS 10% até que alcançassem 80% de confluência. Foram usados cinco milhões (5×10^6) de células como inóculo tumoral por camundongo. As células foram injetadas subcutaneamente no flanco direito usando PBS em um volume total de 0,1 ml ou $5,0 \times 10^7$ /ml. Foi permitido que os camundongos atímicos desenvolvessem os tumores, e eles foram divididos em grupos com base no tamanho/volume do tumor. Para cada grupo de tratamento, foram usados 12 camundongos com um volume tumoral médio de aproximadamente 222 mm³ (variação = 152-296 mm³). Alguns volumes tumorais médios que variam de 237-251 mm³ também foram utilizados. Os animais foram injetados por via intravenosa (IV) nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 com um dos seguintes reagentes: TRU-016 GPC POI (pico de interesse), 200 µg/camundongo; rituxan, 200 µg/camundongo ou IgG humana

(controle) a 200 ou 400 µg/camundongo como reagentes únicos, ou como as seguintes combinações de reagentes: Rituxan + TRU-016 a 100 µg de cada por camundongo; ou Rituxan + TRU-016 a 200 µg de cada por camundongo. O volume tumoral foi medido diariamente com compassos até o término do ensaio (sacrifício ou regressão). Foi feito um gráfico do volume tumoral em função do tempo de tratamento para cada animal, e também foram calculados os resultados médios dentro de cada grupo.

Também foram feitos estudos similares com a utilização de tumores menores, com os camundongos divididos em grupos com volume tumoral médio menor que varia entre 153-158 mm³, e com tumores maiores, mas com o uso de células Daudi ao invés de células Ramos. Esses estudos foram realizados nas instalações para animais aprovada pela AAALAC e o programa de uso dos animais de acordo com as diretrizes de um "Institutional Animal Care and Use Committee" (IACUC).

A Figura 21 mostra gráficos da eficácia de TRU-016 comparado com hulgG, rituxan e as combinações a 100 µg e 200 µg de cada média em cada grupo de 12 animais. Foi feito um gráfico do volume tumoral em função do tempo após tratamento com a(s) injeção (injeções) IV. O volume tumoral médio após tratamento com TRU-016 foi menor do que aquele observado com o uso do controle negativo (hulgG). Quando se colocou em um gráfico a % de Sobrevivência ou a % de animais sem tumor, a terapia de combinação de dose maior exibiu a maior atividade anti-tumoral nesse modelo de tumor in vivo. No entanto, na dose menor (100 µg de cada), a terapia de combinação não foi tão eficaz quanto cada reagente único em uma dose maior.

Esses dados indicam que a terapia com TRU-016, quando usada em combinação com rituxan nas doses apropriadas, terá maior eficácia no tratamento dos tumores do paciente do que a terapia de rituxan isoladamente.

Exemplo 11

Tru-016 Reduz O Volume Tumoral E Aumenta A Sobrevida Em Um Modelo De Xenoinxerto Tumoral Murídeo

Foram realizados estudos de xenoinxerto tumoral de camundongo com o uso de camundongos atímicos (Harlan) e linhagens tumorais humanas Ramos ou Daudi. Foram feitos três estudos diferentes com base no tipo de tumor e tamanho do tumor no momento do tratamento com o TRU-016 ou com outro reagente de teste. Células tumorais Ramos ou Daudi cresceram até 5×10^6 células, e foram injetadas subcutaneamente no flanco direito para inocular cada camundongo tratado com o tumor. Foi permitido que os camundongos atímicos desenvolvessem os tumores, e eles foram divididos em grupos com base no tamanho/volume do tumor. No primeiro estudo, para cada grupo de tratamento, foram utilizados 12 camundongos com um volume tumoral médio de 155-237 mm³. Os animais foram injetados por via intravenosa (IV) nos dias 0, 2, 4, 6, e 8 com um dos seguintes reagentes: Rituximab, 200 µg/camundongo; pico de dímero de TRU-016 GPC, 200 µg/camundongo; ou IgG humana (controle), 400 µg/camundongo. O volume tumoral foi medido diariamente com compassos até o término do ensaio (sacrifício ou regressão). Foi feito um gráfico do volume tumoral em função do tempo de tratamento para cada animal, e também foram calculados os resultados médios dentro de

cada grupo. As médias dos grupos são mostradas na Figura 22A, enquanto a Figura 22B mostra uma comparação dos dados de percentual de Sobrevivência para cada grupo de camundongos em função do tempo.

A Figura 22A mostra a eficácia de TRU-016 comparado com hulgG e Rituxan no modelo tumoral Ramos, com média ao longo de cada grupo de 12 animais. Foi feito um gráfico do volume tumoral em função do tempo após tratamento com a(s) injeção (injeções) IV. O volume tumoral médio após tratamento com o TRU-016 foi menor do que aquele observado com o uso do controlo negativo (hulgG). A Figura 22B mostra um gráfico das curvas de Sobrevivência para os diferentes grupos de tratamento, comparando hulgG, Rituxan e TRU-016. A administração de TRU-016, utilizando o modelo tumoral Ramos mais exigente com volume tumoral de base aumentado, resultou em uma inibição da taxa de crescimento tumoral em relação à IgG humana (dados não mostrados). A administração de TRU-016 aos camundongos com os tumores Ramos menores resultou tanto na inibição do crescimento tumoral quanto nos aumento dos tempos médios de sobrevivência.

Exemplo 12

TRU-016 não Afeta a Atividade e CDC de Outros Recetores de Superfície de Células B

Para determinar se a molécula de TRU-016 aumenta o nível de atividade de CDC que resulta do tratamento com anticorpos para outros recetores de superfície de células B, além de CD20, por exemplo, MHCII, CD19, CD80/86 e CD40, foi feito

um painel de ensaios similar àquele descrito para combinações dirigidas a CD20-CD37.

Células Ramos foram adicionadas aos poços em meio Iscoves completo com FBS 10%. Os MAb's (reagente B: HD37- anti-CD19, reagente C: 9.4-anti-CD45), proteína de fusão (reagente D: CTLA-4 mulg-IgG2a, Ancell nº 501-820) e líquido ascítico (reagente A: HB10a-anti-MHCII), foram adicionadas nas diluições indicadas (veja Figura 23), e foram preparadas reações em duplicata com e sem a adição de Rituximab (a 0,05 µg/ml) ou TRU-016 (a 2 µg/ml). As reações foram incubadas por 30 minutos a 37°C. As células foram lavadas, e foi adicionado NHS até uma concentração final de 10% em meio sem soro. As células foram incubadas por 90 minutos a 37°C com a fonte de complemento. As células foram lavadas, foi adicionado iodeto de propídio até uma concentração final de 0,5 µg/ml em PBS; as células foram incubadas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos; e depois as células foram testadas por citometria de fluxo. Cada gráfico nos painéis A-D da Figura 23 tabula a % de células PI-positivas ao longo das faixas de titulação indicadas.

Em geral, os dados indicam que não houve uma diferença significativa no nível de atividade de CDC quando anticorpos dirigidos a esses recetores foram usados isoladamente ou em combinação com o TRU-016 (Figura 23A-D). Pode haver um ligeiro aumento nos níveis de CDC para os reagentes dirigidos a CD19 e CD45 quando usados com TRU-016 em concentrações subótimas. No entanto, as diferenças nos níveis de CDC não são tão significativas quanto aquelas observadas para a combinação CD20-CD37. Além do aumento da CDC quando reagentes dirigidos a CD20 e CD37 são usados em

combinação, parece haver um aumento no nível de morte observado com o uso de combinações de anti-classe II (HB10a), anti-CD19, anti-CD45 (9.4) ou CTLA4lg com Rituxan na dose subótima.

Exemplo 13

TRU-016 não aumenta a atividade de CDC de outros recetores-alvo, incluindo MHCII, CD19, CD80/86 e CD40

Para determinar se a molécula de TRU-016 aumenta o nível de atividade de CDC que resulta do tratamento com anticorpos para outros recetores de superfície de células B, além de CD20, foi feito um painel de ensaios similar àquele descrito para combinações dirigidas a CD20- CD37 (veja Exemplo 8). Os resultados desses ensaios são mostrados na Figura 23. Em geral, não houve uma diferença significativa no nível de atividade de CDC quando anticorpos dirigidos a esses recetores foram usados isoladamente ou em combinação com o TRU-016. Os níveis de CDC aumentaram ligeiramente em resposta aos reagentes dirigidos a CD19 e CD45 quando usados com TRU-016 em concentrações subótimas. No entanto, as diferenças nos níveis de CDC não foram tão significativas quanto aquelas observadas para a combinação CD20-CD37 (veja Exemplo 8). Além do aumento da CDC quando reagentes dirigidos a CD20 e CD37 são usados em combinação, parece haver um aumento no nível de morte observado com o uso de combinações de anti- MHCII (HB10a), anti-CD19, anti-CD45 (9.4) ou CTLA4Ig com Rituxan na dose subótima.

Exemplo 14

TRU-016 aumenta a Sobrevivência em um modelo de xenoenxerto tumoral murídeo

Foram realizados estudos de xenoenxerto tumoral de camundongo além daqueles descritos no Exemplo 11 para examinar a eficácia de TRU-016 no aumento da Sobrevivência de longo prazo com o uso de camundongos atímicos (Harlan) e linhagens de células tumorais humanas Ramos ou Daudi.

Células tumorais Ramos e Daudi cresceram separadamente, e 5×10^6 células foram injetadas subcutaneamente no flanco direito de camundongos para iniciar a formação de camundongo xenoenxertos tumorais. Após o desenvolvimento do tumor, os camundongos foram divididos em grupos com base no tamanho/volume do tumor (dia 0). Os animais foram injetados por via intravenosa (IV) nos dias 0, 2, 4, 6 e 8 com um dos seguintes reagentes: rituximab, 200 µg/camundongo; TRU-016, 200 µg/camundongo; rituximab + TRU-016 a 100 ou 200 µg/camundongo; ou IgG humana (controle), 400 µg/camundongo. O volume tumoral foi medido às cegas três vezes por semana com compassos até o término do ensaio (sacrifício ou regressão). Foi feito um gráfico do volume tumoral em função do tempo de tratamento para cada animal, e também foram calculados os resultados médios dentro de cada grupo. A Figura 24 mostra o percentual de Sobrevivência de camundongos com tumores Ramos (até 90 dias) após tratamento com TRU-016, rituximab ou uma combinação destes. O tratamento combinado com TRU-016 + rituximab aumentou significativamente tempo médio de Sobrevivência versus tratamento com terapia com agente único isoladamente. As Figuras 25 e 26 mostram o percentual de Sobrevivência de camundongos com tumores Daudi (até 90 dias) após tratamento

com TRU-016 ou rituximab. O tratamento com TRU-016 aumentou o tempo médio de Sobrevivência em tumores Daudi estabelecidos (Figura 25). TRU-016 foi mais eficaz do que rituximab na manutenção da Sobrevivência em camundongos com tumores Daudi (Figura 26).

A administração de TRU-016 como agente único em camundongos com tumores Ramos estabelecidos demonstrou uma inibição do crescimento tumoral e aumento dos tempos de Sobrevivência equivalentes ao rituximab administrado como agente único, e foi superior aos camundongos de controlo tratados com HulgG. Os dados reunidos de 3 ensaios demonstraram que a terapia de combinação com TRU-016 e rituximab resultou em uma melhora estatisticamente significativa do tempo de Sobrevivência comparado com monoterapias com TRU-016 ($p = 0,028$) ou rituximab ($p = 0,045$). As regressões tumorais completas também aumentaram para os grupos de combinação de TRU-016 e rituximab. Quarenta e dois por cento do grupo de combinação de TRU-016 + rituximab 2 00 µg foram capazes de obter regressão completa de longo prazo de seus tumores, comparados com uma taxa de regressão tumoral de 20% em camundongos tratados com TRU-016 ou rituximab isoladamente (veja a Tabela 3 e a Figura 24).

TABELA 3. Sobrevivência após tratamento em tumores Ramos estabelecidos

	Percentagem de camundongos sem tumor em 90 dias	Tempo médio de Sobrevivência (Dias)

TRU-016 + rituximab (200 µg)	42	31
TRU-016 + rituximab (100 µg)	25	24
TRU-016 (200 µg)	20	16
Rituximab (200 µg)	20	17
HulgG	0	10

Foram constatados redução do crescimento tumoral e aumento do tempo de Sobrevivência após tratamento com TRU-016 no modelo de xenoenxerto tumoral Daudi (veja Tabela 4 e Figuras 25 e 26). A administração de TRU-016 aumentou significativamente o tempo de Sobrevivência comparado com o grupo de controle. Também foi observado um aumento da percentagem de camundongos sem tumor com o tratamento com SMIP-016 nesse modelo, comparado tanto com os grupos de controle quanto com os grupos de rituximab.

TABELA 4. Sobrevivência após tratamento em tumores Daudi estabelecidos

	Percentagem de camundongos sem tumor em 90 dias	Tempo médio de Sobrevivência (Dias)
TRU-016 (100 µg)	25	24
Rituximab (100 µg)	0	17
HulgG	0	15

O tratamento com um SMIP dirigido a CD37 (TRU-016) é tão eficaz quanto a monoterapia com rituximab na redução do volume tumoral e no aumento do tempo de Sobrevivência no modelo de xenoenxerto tumoral Ramos. A terapia de combinação de TRU-016 + rituximab demonstrou um benefício aumentado na redução do volume tumoral e no aumento significativo do tempo de Sobrevivência, comparado com monoterapia de rituximab ou TRU-016 no modelo de xenoenxerto tumoral Ramos. No modelo de xenoenxerto Daudi, camundongos tratados com TRU-016 demonstraram um aumento estatisticamente significativo no tempo médio de Sobrevivência, comparado com os controlos de HulgG. O tratamento com rituximab não prolongou os tempos de Sobrevivência, comparado com camundongos de controlo. Esses dados reforçam a eficácia de uma terapia dirigida a CD37 nesses modelos de xenoenxerto de linfoma não Hodgkin.

Exemplo 15

TRU-016 potencializa a morte celular induzida por fludarabina em células CLL in vitro

A fludarabina é um fármaco quimioterápico usado no tratamento de malignidades hematológicas. Fludarabina é um análogo de purina que inibe a síntese de ADN por interferência na ribonucleotídeo redutase e ADN polimerase. Fludarabina é ativa tanto contra células em divisão quanto células em repouso. Ela é altamente eficaz no tratamento de leucemia linfocítica crônica (CLL), produzindo taxas de resposta mais elevadas do que os agentes alquilantes, por exemplo, clorambucil isoladamente (Rai e cols. N. Engl. J. Med. 343: 1.750-1.757, 2000). Fludarabina é usada em várias

combinações com ciclofosfamida, mitoxantrona, dexametasona e rituximab no tratamento de linfoma e linfoma não Hodgkin indolentes. No entanto, também foi observada resistência à fludarabina no tratamento. A fludarabina induz apoptose dependente de caspase em células CLL, e a apoptose mediada por TRU-016 parece ser independente da ativação de caspase. O presente estudo examinou o efeito de TRU-016 com fludarabina em células CLL.

As células foram tratadas com TRU-016 em dosagens que variam de 0,1-100 µg/ml, e com fludarabina em dosagens que variam de 0-20 µM (veja Figura 27). TRU-016 foi fornecido por Trubion Pharmaceuticals (Seattle, WA). Fludarabina (F-araA) foi adquirida de SIGMA (St. Louis, MO). RPMI 1640 media foi adquirido de Invitrogen (Carlsbad, CA). Anexina V marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC e iodeto de propídio (PI) foram adquiridos de BD Pharmingen, San Diego, CA. Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2, 5-difeniltetrazólio (MTT) foi adquirido de Sigma (St. Louis, MO). As células B-CLL foram isoladas imediatamente após a doação usando centrifugação por gradiente de densidade de ficoll (Ficoll-Paque Plus, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). As células mononucleares isoladas foram incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino inativado por aquecimento 10% (FBS, Hyclone Laboratories, Logan, UT), 2 mM de L-glutamina (Invitrogen, Carlsbad, CA) e penicilina (1.00U/ml)/estreptomicina (100 µg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis) a 37°C em uma atmosfera de CO₂ 5%. Células B-CLL recém isoladas foram usadas em todos os ensaios aqui descritos, exceto para a coloração de superfície. Para as amostras com menos de 90% de células B, foi aplicada seleção negativa para eliminar células não B

com o uso do "B Cell Isolation Kit II" (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) ou pelo kit "Rosette-Sep" de Stem Cell Technologies (Vancouver, Columbia Britânica, Canadá) de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante. A linhagem celular Raji (linhagem celular de linfoma de Burkitt humano) foi adquirida de ATCC, e mantida em meio RPMI 1640 contendo FBS 10%, suplementado com penicilina, estreptomicina e glutamina. As células foram divididas 1:3 quando a densidade celular alcançava $1 \times 10^6/\text{ml}$. O meio foi trocado na noite anterior de cada estudo para assegurar que estavam sendo usadas células frescas.

As células foram tratadas in vitro como aqui descrito. Foi preparada uma diluição serial 1:4 de fludarabina (44, 11, 2,8, 0,7, 0,17 e 0,04 μM) em uma placa de 6 poços por transferência de 2 ml de meio contendo fármaco para o poço seguinte contendo 6 ml de meio puro. Em uma placa de 6 poços separada, foi preparada uma diluição serial 1:4 de TRU-016 (44, 11, 2,8, 0,7, 0,17 e 0,04 $\mu\text{g/ml}$) em meio usando o mesmo método de diluição. De cada uma das placas, 0,45 ml de meio foi transferido para um poço designado em uma placa de 48 poços para formar uma solução mista de fármaco em meio (0,9 ml no total em cada poço). As células CLL suspensas em meio em uma densidade de 1×10^7 células/ml (0,1 ml) foram então adicionadas ao 0,9 ml de meio em cada poço para formar uma densidade final de 1×10^6 células/ml. Para células Raji, a densidade celular final foi de 5×10^4 células/ml. Dessa forma, a suspensão de células usada foi de 5×10^5 células/ml. Para os ensaios de MTT, foram preparadas diluições seriais de fármaco em placa de 96 poços, e transferidas para outra placa de 96 poços para incubação com células. O volume total para

incubação é de 200 µl (90 µl de solução de fludarabina, 90 µl de solução de TRU-016 e 20 µl suspensão de células). A viabilidade celular foi avaliada com o uso dos ensaios de MTT em 48 horas, e a apoptose foi medida com o uso de anexina V/PI em 24 horas.

Foram feitos ensaios de MTT para medir a viabilidade celular como aqui descrito. Resumidamente, 10^6 células CLL foram semeadas na placa de 96 poços. As células foram incubadas por 48 horas. Cinquenta 50µl de solução de trabalho de MTT (2 mg/ml, preparados a partir de 5 mg/ml de reagente MTT misturado com RPMI 1640 2:3 v/v), foram adicionados a cada poço, e as células foram incubadas por 8 horas. As placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido e dissolvido em 100 µl de solução de lise. As amostras foram medidas com uma leitora de placas em O.D. 540. A viabilidade celular foi expressa como a percentagem de viabilidade comparada com controlo de meio.

A apoptose de células CLL após incubação com anticorpos foi medida com o uso de coloração de anexina V- FITC/iodeto de propídio (PI) com análise FACS. Foram coradas 5×10^5 células em 200 µl de tampão de ligação 1 x (BD Pharmingen) com 5 µl de anexina V (BD Pharmingen) e 5 µl de PI (BD Pharmingen), e mantidas no escuro em temperatura ambiente por 15 minutos, antes da suspensão com 3 00 µl de tampão 1 x, e analisadas por citometria de fluxo. Foram preparadas células sem coloração, células coradas apenas com anexina V e células coradas apenas com PI. Para todos os ensaios de citometria de fluxo, foi feita a análise FACS com o uso de um citômetro Beckman-Coulter EPICS XL (Beckman-Coulter, Miami, FL). Os fluoróforos foram excitados a 488 nm. A

fluorescência de FITC foi medida com FL1, enquanto a fluorescência de PI e PE foi medida com FL3. O pacote de programas de computador System II (Beckman-Coulter) foi aplicado para analisar os dados. O número de células contadas foi ajustado em 10.000 para cada amostra.

Um efeito sinérgico foi determinado pelo uso do método do isobolograma. Para identificar sinergia, o efeito de uma combinação de fármacos foi comparado com o efeito de cada fármaco isoladamente. Isso se baseia na equação: $C_a/C_{a,b} + C_b/C_{b,a} = C_l$, em que C_a e C_b são a concentração de fármaco A e fármaco B isoladamente, respectivamente, para produzir um efeito desejado (por exemplo, 50% de morte celular). $C_{a,b}$ e $C_{b,a}$ são as concentrações de fármaco A e de fármaco B em uma combinação, respectivamente, para produzir o mesmo efeito. C_l é o índice de combinação. As concentrações de fludarabina e TRU-016, que despertam 50% de morte (IC₅₀), foram determinadas e são mostradas na Figura 27C [IC₅₀ de Fludarabina (I) e IC₅₀ de TRU-016 (II)]. A linha reta entre esses dois pontos nos eixos é a linha de efeito aditivo. Subsequentemente, combinações diferentes de fludarabina e TRU-016 que obtêm 50% de morte celular também foram determinadas a partir do estudo de viabilidade e tabuladas no mesmo gráfico. Quando os pontos caem abaixo da linha de aditividade, a sinergia é indicada. Quando surgem pontos acima da linha, o antagonismo é indicado. Quando os pontos estão sobre a linha, a aditividade é indicada.

A Figura 27 mostra que TRU-016 reduziu eficazmente a viabilidade celular relativa em células tratadas com fludarabina potencializando, dessa forma, o efeito citotóxico de fludarabina isoladamente. Dessa forma, esse

estudo fornece evidências de que TRU-016 pode ser co-administrado com fludarabina, resultando em aumento da eficácia (ou seja, redução sinérgica de células CLL) no tratamento de malignidades hematológicas.

Exemplo 16

TRU-016 induz Citotoxicidade Direta em Células Resistentes ao Rituximab

Como aqui revelado, rituximab é um anticorpo monoclonal usado no tratamento de linfoma não Hodgkin (NHL), FCC, MCL, DLCL, SLL e CLL. O presente estudo foi realizado para determinar a eficácia de TRU-016 na indução de citotoxicidade direta em células resistentes ao rituximab.

Células resistentes ao rituximab (1×10^6 células) (Raji 4RH e RL 4RH, fornecidas por Dr. Myron S. Czuczman, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY) foram tratadas com herceptina (10 µg/ml), rituximab (10 µg/ml) ou TRU-016 (5 µg/ml) na presença de um excesso de cinco vezes de IgG anti-humana de cabra por 24 horas. A citotoxicidade direta foi medida por coloração com anexina/PI, e a viabilidade celular (percentual) foi calculada em relação às células de controlo (células tratadas com herceptina).

TRU-016 induziu maior toxicidade celular do que rituximab em linhagens celulares resistentes ao rituximab (veja Figura 28). Dessa forma, TRU-016 é um agente eficaz para a indução de citotoxicidade em células resistentes ao rituximab, o que o torna útil como agente terapêutico em

doenças caracterizadas ou que envolvem células resistentes ao rituximab, por exemplo, algumas células B.

Exemplo 17

TRU-016 induz fosforilação de tirosina em células B CLL primariamente CD19+

Para determinar como TRU-016 induz transdução de sinal em células B foram feitos ensaios para examinar o efeito de TRU-016 sobre a fosforilação de tirosina.

Células CD19+ recém isoladas (~50-100 x 06) de pacientes com CLL foram suspensas em uma concentração de 5×10^6 /ml de PBS. As células foram então incubadas por 10 minutos a 37°C, CO₂ 5%, com controle, trastuzumab (herceptina) ou TRU-016 em uma concentração final de 5 ug/ml. As células foram então precipitadas por centrifugação, o sobrenadante foi removido, e as células foram ressuspensas em PBS fresco do volume inicial. Vinculador cruzado específico para fragmento Fc anti-humano de cabra (25 ug/ml) foi adicionado, e as células foram incubadas por mais 5 minutos. As células foram novamente precipitadas por centrifugação, o sobrenadante foi removido, e as células foram lisadas em 1 ml de tampão de lise RIPA com inibidores de protease e fosfatase (10 mM de Tris, ph 7,4, 150 mM de NaCl, Triton X-100 1%, ácido desoxicólico, SDS 0,1% e 5 mM de EDTA em todas as concentrações finais. Coquetel de inibidores de protease Sigma cat n° P-8340; coquetel de inibidores de fosfatase Sigma: coquetel de inibidores de serina/treonina fosfatase Catn° P-2850; e inibidor de tirosina fosfatase cat n° P-5726; PMSF (100 mM) foram

usados. Os inibidores foram adicionados ao tampão de lise, imediatamente antes do uso, em uma diluição 1:100. A concentração de proteína nos lisados foi quantificada pelo método do ácido bicina conínico (BCA) (Pierce, Rockford, IL). O controle e as amostras tratadas de proteína (50 ug de proteína total) foram separados por eletroforese bidimensional em gel (faixa de pH: 3-10) (1ª Dimensão) e SDS 10%SDS-PAGE (2ª Dimensão). A proteína foi transferida para membranas de nitrocelulose de 0,2 Nm (Schleicher & Schuell, Keene, NH) e submetida à análise imunoblot usando clone de anticorpo anti-fosfotirosina 4G10 (Upstate Biotechnology), com a utilização do protocolo-padrão. IgG de cabra anti-coelho conjugada a peroxidase de raiz forte (HRP) foi usada como anticorpo secundário. A detecção da fosfoproteína foi feita com substrato quimioluminescente (SuperSignal, Pierce Inc. Rockford, IL).

TRU-016 induziu fosforilação de tirosina em células B CD19+ primariamente CLL, como mostrado por análise de gel bidimensional (veja Figura 29). Dessa forma, esses ensaios mostram que uma forma pela qual TRU-016 atua é através de uma via de fosforilação de tirosina.

Exemplo 18

Moléculas humanizadas de TRU-016

Como apresentado no Exemplo 1, SMIPs específicos para CD37 (por exemplo, TRU-016) são descritos no Pedido U.S. de co-propriedade N° 10/627.556 e nas Publicações de Pedido Patente U.S. N°s 2003/133939, 2003/0118592 e 2005/0136049. Aquelas descrições são aqui incorporadas por

referência. Um SMIP exemplar específico para CD37, o polipeptídeo TRU-016 (ID. DE SEQ. Nº: 2), foi nelas produzido e descrito. O presente exemplo fornece SMIPs humanizado de TRU-016.

Anticorpos humanizados são conhecidos na técnica e são discutidos na Publicação de Pedido de Patente U.S. Nº 2006/0153837. O presente pedido usa as técnicas envolvidas na humanização de anticorpos (discutidas abaixo) para humanizar SMIPs e, particularmente, para humanizar TRU-016.

Espera-se que a "humanização" resulte em um anticorpo que seja menos imunogénico, com retenção completa das propriedades de ligação de antígeno da molécula original. A fim de reter todas as propriedades de ligação de antígeno do anticorpo original, a estrutura de seu sítio de ligação de antígeno deve ser reproduzida na versão "humanizada". Isso pode ser obtido enxertando-se apenas as CDRs não humanas em domínios variáveis estruturais e regiões constantes humanas, com ou sem retenção de resíduos estruturais críticos (Jones e cols., Nature 321: 522 (1986); Verhoeven e cols., Science 239: 1.539 (1988)) ou por recombinação dos domínios variáveis não humanos inteiros (para preservar as propriedades de ligação de ligante), mas "ocultando-os" com uma superfície humana-like através da substituição criteriosa de resíduos expostos (para reduzir a antigenicidade) (Padlan, Molec. Immunol. 28: 489 (1991)).

Essencialmente, a humanização por enxerto de CDR envolve a recombinação apenas das CDRs de um anticorpo não humano em uma estrutura central de uma região variável humana e uma

região constante humana. Teoricamente, isso deve reduzir substancialmente ou eliminar a imunogenicidade (exceto se existirem diferenças alotípicas ou idiotípicas). No entanto, foi relatado que alguns resíduos estruturais do anticorpo original também podem ter que ser preservados (Reichmann e cols., *Nature*, 332: 323 (1988); Queen e cols., *Proc. Natl. Acad. Sei. USA*, 86: 10, 029 (1989)).

Os resíduos estruturais que precisam ser preservados são passíveis de identificação através de modelagem por computador. Alternativamente, resíduos estruturais críticos podem potencialmente ser identificados comparando-se estruturas conhecidas de sítio de ligação de antígeno (Padlan, *Molec. Immun.*, 31(3): 169-217 (1994)).

Os resíduos que potencialmente afetam a ligação de antígeno se enquadram em vários grupos. O primeiro grupo compreende resíduos que são contíguos com a superfície do sítio de antígeno, e que poderiam, portanto, fazer contato direto com antígenos. Esses resíduos incluem os resíduos do terminal amino e aqueles adjacentes às CDRs. O segundo grupo inclui resíduos que poderiam alterar a estrutura ou o alinhamento relativo das CDRs, tanto por contato das CDRs quanto por outra cadeia peptídica no anticorpo. O terceiro grupo compreende aminoácidos com cadeias laterais sepultadas que poderiam influenciar a integridade estrutural dos domínios variáveis. Os resíduos nesses grupos são normalmente encontrados nas mesmas posições (Padlan, 1994, *supra*), embora suas posições identificadas possam diferir, dependendo do sistema de numeração (veja Kabat e cols., "Sequences of proteins of immunological

interest", 5^a ed., Pub. No. 91-3.242, U.S. Dept. Health & Human Services, NIH, Bethesda, Md., 1991).

Embora a presente invenção seja dirigida à humanização de SMIPs e não de anticorpos, o conhecimento de anticorpos humanizados na técnica é aplicável aos SMIPs de acordo com a invenção. Alguns exemplos de moléculas humanizadas de TRU-016 são apresentados na Tabela 5 abaixo.

Para a produção de construções humanizadas de TRU-016 da invenção, as regiões estruturais de TRU-016 de camundongo foram alinhadas aos resíduos estruturais VH1 e VH5 humanos para a cadeia pesada e VK1 e VK3 para a cadeia leve. As melhores combinações foram analisadas quanto à compatibilidade estrutural com as CDRs das regiões variáveis de camundongo. Embora houvesse várias combinações igualmente compatíveis para serem escolhidas, tivemos sucesso anteriormente com o uso da combinação VK3 (X01668), VH5-51(Z12373) e, portanto, os SMIPs humanizados anti-CD37 foram designados com o uso dessas estruturas centrais humanas unidas por um vinculador Gly₄Ser ((g4s)₃) scFv de 15 aa. A construção VK3 foi construída com JK1 como uma combinação FR4 preferida e a VH5 foi construída com JH2 codificando FR4, como as construções descritas previamente. Os SMIPs foram construídos de novo usando PCR por superposição de oligonucleotídeos. Produtos de comprimento total foram clonados no vetor de expressão SMIP alinhado com a dobradiça de IgG1 humana, CH2 e CH3. Esses clones tiveram suas sequências verificadas, foram transfectados em células COS-7, e o meio condicionado de 3 dias foi testado quanto à ligação à linhagem de linfoma de células B, Ramos. A fim de aumentar a humanização, foram incorporadas

alterações na CDR1 da cadeia leve nas posições L25, L27 e L28, e todas foram bem toleradas, mostrando igual atividade de ligação com a molécula humanizada original 019001. Foram feitas construções de ADN adicionais de modo similar para alterar a CDR3 da região VH por incorporação de aminoácidos da linhagem germinativa, H100-H102, codificados por várias regiões JH humanas. As construções foram examinadas quanto ao nível de expressão e ao grau de ligação a CD37 em células Ramos.

TABELA 5. Construções humanizadas de TRU-016

Const. N°	Descrição	Vinculador	Dobrad iça	ID. DE SEQ. DE ADN N°:	ID. DE AA SEQ. N°:
019001	Vk3:VH5-51	15aagly4ser	SSC-P	5	6
019002	Vk3:VH5-51 Linker (TG-SS)	15aagly4ser	SSC-P	7	8
019003	Vk3:VH5-51 VH V11 S	15aagly4ser	SSC-P	9	10
019004	Vk3:VH5-51 VK3, Cdr1 (E->Q)	15aagly4ser	SSC-P	11	12
019005	Vk3:VH5-51 VK3, cdr1 (N->S)	15aagly4ser	SSC-P	13	14
019006	Vk3:VH5-51 VK3, Cdr1 (T->A)	15aagly4ser	SSC-P	15	16
019010	mVk:VH5-5a	15aagly4ser	SSC-P	17	18

019011	Vk3:mVH (mutação vinculador G- S)	15aagly4ser	SSC-P	19	20
019017	Vk3:VH5 VH3 FW1	15aagly4ser	SSC-P	21	22
019018	mVH:Vk3	15aagly4ser	SSC-P	23	24
019019	Vk3:mVH (019011 com Líder 2H7)	15aagly4ser	SSC-P	25	26

019021	mVH:Vk3	15aagly4ser	SSC-P	27	28
019023	Vk3:mVH (019011 fixo mutação GS4)	15aagly4ser	SSC-P	29	30
019024	Vk3:mVH (019011 fixo mutação GS4)	15aagly4ser	SSC-P	31	32
019025	Vk3:VH5 VH3 FW1	15aagly4ser	SSC-P	33	34
019026	Vk3:VH5 VH3 FW1	15aagly4ser	SSC-P	35	36
019032	Vk3:VH5 VH3-13 FW1	15aagly4ser	SSC-P	37	38
019033	Vk3:VH5 VH3- 13 FW1	15aagly4ser	SSC-P	39	40
019034	Vk3:VH5 VH3- 13 L11S FW1	15aagly4ser	SSC-P	41	42
019035	Vk3:VH5 VH3- 13 L11S FW1	15aagly4ser	SSC-P	43	44
019037	Vk3(alterações CDR-L1) :VH5	15aagly4ser	SSC-P	45	46
019041	019006-CDR-H3 JH4	15aagly4ser	SSC-P	47	48

019043	019006-CDR-H3 JH6	15aagly4ser	SSC-P	49	50
019044	019006-CDR-H3 JH5a	15aagly4ser	SSC-P	51	52

019045	019006-CDR-H3 JH5b	15aagly4ser	SSC-P	53	54
019046	019006-CDR-H3 JH1	15aagly4ser	SSC-P	55	56
019047	019006-CDR-H3 JH3a	15aagly4ser	SSC-P	57	58
019048	019006-CDR-H3 JH3b	15aagly4ser	SSC-P	59	60
019049	019006-CDR-H3 JH2	15aagly4ser	SSC-P	79	80
019050	019006-CDR- alterações H2	15aagly4ser	SSC-P	81	82
019051	019044	20aagly4ser	CPPCP	83	84
019008				85	86
019009				87	88

A sequência de aminoácidos de consenso da construção humanizada de TRU-016 N° 019001 (ID. DE SEQ. N°: 6; H016-019001) e TRU-016 não humanizado (ID. DE SEQ. N°: 2; 016-G28-1) é mostrada com numeração de Kabat na Figura 3 0A. a Figura 3 0 B mostra os alinhamentos de sequências de aminoácidos das construções humanizadas de TRU-016 N°s 019001 (ID. DE SEQ. N°: 6), 019008 (ID. DE SEQ. N°: 86) e 019009 (ID. DE SEQ. N°: 88).

ADN e alinhamentos de sequências de aminoácidos de três construções humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 e

019044), que demonstram ligação específica para CD37 elevada às células B Ramos são mostrados na Figura 31.

ADN formatado por FASTA e alinhamentos de sequências de aminoácidos das mesmas três construções humanizadas de TRU-016 (019001, 019041 e 019044) são mostrados na Figura 32.

Regiões de dobradiça adicionais (Tabela 6) e regiões estruturais (Tabela 7) que podem ser usadas nas moléculas humanizadas de TRU-016 da invenção são apresentadas abaixo.

TABELA 6. Regiões de dobradiça para SMIPs humanizados de TRU-016

Dobradiça Descrição	Sequência de ADN ou de aminoácidos	ID. DE SEQ. Nº:
ccc(p)-hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttgtagacaaaactcacacatgt ccaccgtgccca	89
ccc(p)- hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTCPPCP	90
scc(p)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttctgacaaaactcacacatgt ccaccgtgccca	91
scc(p)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPCP	92
scc(s)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttctgacaaaactcacacatgt ccaccgtgctca	93

scc(s)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPCS	94
scs(s)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttgtgacaaaactcacacatgt ccaccgagctca	95
scs (s)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPPSS	96
sss(p)-	gagcccaaactcttctgacaaaactcacacatct ccaccg	97

hlgG1 (ADN)	agccca	
sss(p)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPSP	98
sss (s)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttctgacaaaactcacacatct ccaccgagetea	99
sss (s)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPSS	100
csc(p)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttgtgacaaaactcacacatct ccaccgtgccca	101
csc(p)- hlgG 1 (AA)	EPKSCDKTHTSPPCP	102
csc(s)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttgtgacaaaactcacacatct ccaccgtgetea	103
csc(s)- hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPPCS	104
ssc(p)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaactcttctgacaaaactcacacatct ccaccgtgccca	105
ssc(p)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPCP	106

ses (s)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaattcttctgacaaaactcacacatct ccaccgtgetea	107
ses(s)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTSPPCS	108
css(p)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaattcttgtagacaaaactcacacatct ccaccgagccca	109
css(p)- hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPSP	110
css (s)- hlgG1 (ADN)	Sagcccaaattcttgtagacaaaactcacacatct ccaccgagetea	111

css(s)- hlgG1 (AA)	EPKSCDKTHTSPSS	112
scs(s)- hlgG1 (ADN)	gagcccaaattcttgtagacaaaactcacacatgtc caccgagctca	113
scs(s)- hlgG1 (AA)	EPKSSDKTHTCPSS	114
hlgA1	VPSTPPTPSPSTPPTSPS	115
hIgA2	VPPPPP	116
hIgG3 (ADN)	gagctcaaaactcctctcggggatacgaccata cgtgtccccgctgtcctgaaccgaagtctgcga tacgcctccgccatgtccacggtgcccagagccc aatcatgcgatacgccccaccgtgtccccgct gtcctgaaccaaagtcatgcgataccccaccacc atgtccaagatgccca	117
hIgG3 (AA)	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEP KSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP	118
IgG315hsc (ADN)	Gagcccaaattcttctgacacacctccccatgcc cacggtgcccc	119

IgG315hsc (AA)	EPKSSDTPPPCPRCP	120
I gG315hcss (ADN)	gagcccaaattcttgtgacacacctcccccatccc cacggtcccca	121
IgG315hcss (AA)	EPKSCDTPPPSPRSP	122
IgG315hsss (ADN)	gagcccaaattcttctgacacacctcccccatccc cacggtcccca	123
IgG315hsss (AA)	EPKSSDTPPPSPRSP	124
IgG3h15csc (ADN)	gagcccaaattcttgtgacacacctcccccatccc cacggtgccca	125
IgG3h15csc (AA)	EPKSCDTPPPSPRCP	126
hlgD	ES PKAQAS SVPTAQPQAEGSLAKATTAPATTR NTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP	127

TABELA 7. Regiões estruturais para SMIPs humanizados de TRU-016

Região V	Regiões estruturais de VH humana para humanização anti-CD37	ID. DE SEQ. N°:
	FR1	
VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT	140
VH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	141
VH1	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS	142
VH1	EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFT	143
VH5	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	144

VH5	EVQLVQSGAEVKKPGES LRIS CKGSGYSFT	145
VH7	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFT	146
	FR2	
VH1	WVRQAPGQGLEWMG	147
VH1	WVRQAPGQGLEWMG	148
VH1	WVRQAPGQGLEWMG	149
VH1	WVQQAPGKGLEWMG	150
VH5	WVRQMPGKGLEWMG	151
VH5	WVRQM PGKGLEWMG	152
VH7	WVRQAPGQGLEWMG	153
	FR3	
VH1	RVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCAR	154
VH1	RVTITADESTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	155
VH1	RVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR	156
VH1	RVTITADTSTDVAVYYCAT	157
VH5	QVTI SADKS I STAYLQWS SLKAS DTAMYYCAR	158
VH5	HVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	159
VH7	RFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCAR	160
	FR4	
	WGQGTLLVTVSS	161
	WGRGTLVTVSS	162
	WGQGTMTVTVSS	163
	WGQGTMTVTVSS	164
	WGQGTLLVTVSS	165
	WGQGTLLVTVSS	166
	WGQGTLLVTVSS	167
	WGQGTTVTVSS	168

	WGKGTTVTVSS	169
	Regiões estruturais de VK humana para humanização anti-CD37	
	FR1	
VK3	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC	170
VK3	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	171
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	172
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	173
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	174
VK1	NIQMTQSPSAMSASVGDRVITITC	175
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	176
VK1	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC	177
VK1	DIQLTQSPS FLSASVGDRVITITC	178
VK1	MRMTQSPFSLASVGDRVITITC	179
VK1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC	180
VK1	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITC	181
	FR2	

VK3	WYQQKPGQAPRLLIY	182
VK3	WYQQKPGQAPRLLIY	183
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	184
VK1	WYQQKPGKVPKLLIY	185
VK1	WYQQKPGKAPKRLIY	186
VK1	WFQQKPGKVPKHLLIY	187
VK1	WFQQKPGKAPKSLIY	188
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	189
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	190

VK1	WYQQKPAKAPKLFIY	191
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	192
VK1	WYQQKPGKAPKLLIY	193
	FR3	
VK3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISSLQSEDFAVYYC	194
VK3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAVYYC	195
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	196
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDVATYYC	197
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	198
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	199
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	200
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	201
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYC	202
VK1	GVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYC	203
VK1	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	204
VK1	GVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDEFATYYC	205
	FR4	
	FGQGTKVEIK	206
	FGQGTKLEIK	207
	FGPGTKVDIK	208

	FGGGTKVEIK	209
	FGQGTRLEIK	210

São esperadas várias modificações e variações na invenção apresentada nos exemplos ilustrativos acima por aqueles habilitados na técnica. Conseqüentemente, somente as

limitações apresentadas nas reivindicações em anexo devem ser consideradas na invenção.

Sequências de DNA e de aminoácidos para os IDS. DE SEQ. N^{os} 79-88

Construção N ^o	ID. DE SEQ. N ^o	Sequência de ADN ou de Aminoácidos
019049	79	aagcttgcggccatggaagcccccagcgcagcttctctctcctgctactctggctccag ataccaccgggagaaatgtgttgacacagctctccagccaccctgtcttggctccaggcga aagagccacccctctcctgcccagcaagtgaatgtttacagctccttagccctggaccga acagaaacccctggccaggctccctaggctcctcactatcttggcaaaaaccttagcagaagg aatccagccagggtcagtgccagtgatccgggacagactcactctcaccatcagca gcctagagccctgaagatttgcagtttattactgtcaacatcattccgataatccgiggacat tcggccaagggaaccaagggtggaatcaaaaggaggcggtggcctggcggtgtgtgat ctggaggagggtgggaccgggtgagggtgcagctgggtgcagctggagcagaggtgaaaa agcccgagagctctgaagatttctgtaagggaatccgggtactcattcactggctacaa tatgaactgggtgcgcagatgcccggaaggccctcagtggtgggaatattgatc cttattatgtgtgactacctacaaccgggaagtcaagggtccagggtcactatctccgccga caagtcacacagcacccctacctgcattggagcagccgaaggccctgggacacccgc catttatctgtgcacgctcagtcggcccttgcacctctggggcagagggaacccctggc actgtctctctgatcaggagcccaaatctctgacaaaactcacacatccaccgtgcc cagcacctgaactccgggtggacogtcagcttctctctcccccacaaacccaaggac acctcattgaatctccggacccttgagggtacatgcgggtgggtggagctgagccacga agaccttgaggtaagttcaactgtgtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccaa acaaagccgcgggaggagcagtaaacagcagctaccgtgtgttcagcgtctcacc gtctgcacacaggactggctgaatggcaaggagtaacagtgcaagggtctccaacaaa ggcctccagcccccacagagaaaaccatctccaagccaaagggtcagcccgaga accacaggtgtacacctgcccccatccgggagtgagctgaccaagaaccagggtcag cctgacctgacctgggtcaaaggcttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagga atgggcagccggagaaacacacacagaccacgcctccctgtgtgagctccgacggct ccttctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgt cttctcatgtcctgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctc cctgtctccgggtaaatgatctaga

019049	80	MEAPAQLFLLLLWLPTDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASENVSYLAWYQQKPGQAPRLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS. GTDFTLTISSELPEDFAVYYCOHHSDNPWTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGTGEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTGYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPHYGGTTYNRKFKGQ VTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPFDLWGRGT LVTVSSDQEPKSSDKHTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
019050	81	aagcttgcggccatggaagcccagctcagcttctctcctcctgctactctggctcccag ataccaccggagaaatgltgacacagctccagccaccctgcttctgctccaggcga aagagccaccctcctcctgagcaagtgaatglttacagctacttagcctggtagcca acagaaaccctggccaggctcctaggctcctcatctatctgcaaaaaaccctagcagaagg aattccagccagggtcagtggtcagtggtatccgggacagactcactctcaccatcagca gcttagagcctgaagatttgcagtttattactgcaacatcatccgataatccgtggacat tccggccaagggaaccaagggtggaatcaaaagggtggcgggtggcctgggctgggtgat ctggaggagggtgggcttagcagggtgcagctgggtgcagctggagcagagggtgaaaa agcccgagagctctgaagatttctgaagggaiccggttactcacttagctacaa tatgaactgggtgcgccagatgcccggaaggccctggagtggtgggaatattgat ccttattatggtgtactaactacgccagaaagttccaggggcagggtcactatctccgccg acaagtcctcagcacgcctaccctgaatggagcagcctgaaggcctcgggacaccg ccatgtattactgtgcacgcctcagctggccctatggactactggggccggcggcaccctgg tcactgtctcctctgacaggagcccaaatctctgacaaaactcacacatctccaccgtg ccagcacctgaactcctgggtggaccgtcagctctctctctcccccaccccaagg acacccctcatgactcctccggaccctcagggtcacatgcgtgggtgggtgacgtgagccac gaagccctgagggtcaagtcaactgggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgcc agacaaagccggcgggaggagcagtagacaacagcagctaccgtgtggtcagcgtctc accgtcctgcaccagggtcgtggaatggcaaggagtacaagtgcagggtctccaac aaagccctccagcccccacatcgagaaaaccatctccaaaggcacaagggtcagcccg agaaccacagggtgtacacccctcccccatccgggaigagctgaccaagaaccagggt cagcctgacctgctgggtcaaaggctctatccaagcgacatccgtggagtggtggaga gcaatgggtcagccggagacaactacaagaccagccctccgtgctggactccgac ggctctctctctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcagcagggga acgtctctcatgctcctgtagcagtagggtctgcacaaaccactacacgcagaagagc ctctccgtctccgggtaaatga

019050	82	MEAPAQLFLLLLWLPD TTGEIMLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASENVYSYLA WYQQKPGQAPRLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQHHS DNPWTFGGG TKVEIKGGG GSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTSYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTNYAQKFQGG VTISADKSISTAYLQWSS LKASDTAMY YCARSVGPM DYWGRG TLVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
019051	83	aagctgcccgc atggaagccc agcgcagctctctctccctgctactctggctccag ataccaccggaga aatgtgtgacacagctccagccaccctgtttgtctccaggcga aagagccacccctctctgcgagca agtgagaatgtttacagctacttagcctggtacca acagaaacctggccaggctcctaggctcctcatctatttgcaaaaaccttagcagaagg gattccagccagatc agtggcagtggttccgggacagactcactctaccalcagcag cctagagcctga agatttgcagtttactctgcaacatcattccgataatccgtggacatt cggccaagggaacca aggtggaaatcaa aggtggcgggtggctcggggcgggtggat ctggaggagggtggg agcggaggaggagctagcagggtggcagctgggtcagctggga gcagagggtgaaaa agcccggagagctctgaagatttctgttaagggatccggttactc attcactggctaca atatgaactgggtggccagatgccgggaaaggcctcgaatgg atgggcaatatgtatccttattatgtgtgtactacctacaacccggaagttcaagggtccagg tcactatctccggaca agtccatcagcacccgcctacctgcaaggagcagcctgaag gcctcggacaacggc atgtattactgtgcaagctcagtcggcccttctgactcctggggcc agggcacccctggta cactgtctcaggtgttccacccgtgccagcaacctgaactcctgggtg gaccgtcagctctctctctccccc aaaaacccaaggacacccctcatgatctccggaccc ctgagggtacatgcgtgtgtgtggacgtgagccacgaagaacctgagggtcaagttcaa ctggtacgtggacggcgtggagggtgcataatgccagacaaagccggggaggaggc agtacaacagcacgtaccgtgtgtgtcagcgtctcaccgtctgtcaccaggactggctg aatggcaaggagtaca agtgcaagggtctcaacaagccctccagccccatcgag aaaaccatctcca agccaaagggcagcccgagaaaccacagggtgtcacccctgcc cccatccgggaltgagctgaccaaga accagggtcagcctgacctgctgtcgaagg

		cttctatccaagcgacatcgccgtggagtgaggagagcaatgggcagccgggagaacaa ctacaagaccaagccctccgtgctggactccgacggctccttctctctacagcaagctc eccgtggacaagagcagggtggcagcaggggaacgltctctcagctcctglatgcatg aggctctgcacaaccactacacgcagaagagccctcctcgtctcgggtaaatgactc taga
019051	84	MEAPAQLFLLLLWLPTDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR ASENVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHHSDNPWTFGGGTKVEIKGGG GSGGGGSGGGGSGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKG SGYSFTGYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPYGGTTYNRKF KGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPFDSDW GGGTLVTVSSCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLIHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTKAKGQP REPOVYITLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
019008	85	aagcttgcggccatggaagccccagctcagcttctcttctcctgctactctggctccag ataccacgggagaaatgtgtgacacagctcagccacccctgtcttgtctcaggcga aagagccacccctctcctgcgaacaagtgaaaatgtttacagctacttagcctgtgacca acagaaacctggtccaggctcctaggctcctcctctatttgcataaaccttagcagaagg aatccagccagggtcagtggtcagtggtcgggacagactcactctcaccatcagca gcctagagccctgaagatttgcagtttattactgtcaacatcattccgataatccgtggacat tcggccaagggaaccaagggtggaatcaaagggtggcgggtcggcgggtggtggat ctggaggagggtgggaacgggtgaggtgcagctggtgcagctcggagcagagggtgaaa agcccgagaggtctctgaagatttctgtaagggtacgggtactcattcactggtctaaa tatgaactgggtgcgccaagtgcccggaaggcctggagtggtgggaatattgat ccttattatggtggtactcctcacaacgggaagttcaagggcagggtcactatctcggcg acaagttcatcagcaaccgctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccg ccaagtattactgtgcacgctcagtcggccctatggactaciggggcggcggaacctgg tcactgtctcctctgatcaggagcccaaatctctgacaaaactcacacatctccaccgtg cccagcacctgaactcctgggtggaccgtcagctctcctcttcccccaaacccaagg

		acacccctcagatctcccggaaccccgaggtcacatgctgtgtgtggacgtgagccac gaagacccctgaggtaagttcaactggtatgtggacggcgtggagggtgcataatgcca agacaaagccgcggggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtgtgagcgtcctc accgttcctgcaccaggacgtggctgaatggcaaggaglacaaagtgcaaggctccaac aaagccctcccgaccccccacgcagaaacccatctccaaagctaaagggcagcccg agaaccacagggtgtacacccctgcccccatcccgga/gagc/gaccaagaaccagg cagccctgacctgctgtgcaaaaggcttclatccaagcgacatcgccgtggagtgaggaga gcaatgggcagccggagacaactacaagaccacgctcccgctgtggactcggac ggctcttcttctctacagcaagctcacccgtggacaagagcagggtggcagcagggga acgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaaccactacacgcagaagagc ctctccctgtctccgggtaaatga
--	--	--

Construção N°	ID. DE SEQ. N°	Sequência de ADN ou de Aminoácidos
019008	86	MEAPAQLLFLLLLWLDPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR TSENVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISLEPEDFAVYYCQHSDNPWTFGQGKVEIKGGG GSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYS FTGYNMNVWRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARSVGPMDYWGRGT LVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHLEAHNHYTQKSLSLSPGK

Construção N°	ID. DE SEQ. N°	Sequência de ADN ou de Aminoácidos

019009	87	aagcttgcgcgcacatggaagcccagctcagctctctcctcctgctactctggcctccag atccacccggcgaattggttgacacagctcagccacccctgctcttctcagggga aagagccacccctcctgcgcgaacaagtgaaaatgttacagctacttagcctggtaacca acagaaaccctggccaggctcctaggctcctcatctatcttgcacaaaccctagcagaagg aattccagccaggctcagtggtcagtggaatcgggacagactcactctcaccatcagca gcctagagccctgaagatttgcagtttactgtcaacatcattccgataatccgtggacat tcggccaagggaccaaggtggaaalcaaaaggtggcgggtgcctgggcccgtggggat ctggaggagggtgggctagcaggtgacagctgggtcagctgggagcagaggcga agcccgagagctctcagaggatttctgaagggaaccggtaactcattcactggctacaa tatgaactgggtgcgcagatgcccgggaagggcctggagtggaatgggaatattgat ccttattatgggtgactacctacacccggaagttcaaggccaggctactatctccgccc acaagtcacacagcacccctacctgcaatggagcagcctgaaggcctcggacaccg ccaagtattactgtgcacgcctcagtcggccctatggactactggggccgcccacccctgg tcactgtcctctgacagagcccaaatctctgcacaaactcacacatctccacccg cccagcacctgaactcctgggtggaccgctcagctctcctctcccccacaaacccaagg acacccctcatgactcctccggacccctgaggctacatgctgggtgggtggagctgagccac gaagaacctgaggctcaagttcaactggtacgtggacggcggtggagggtgcataatgcca agacaaagcccgccgggagggagcagtaaacagcacgtacccgtgtggcagcgtctc accgctctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggctcacaac aaagccctccagcccccacgcagagaaaccatctcacaagccaaaggccagccccc agaaccacagggtgtacacccctgccccatcccggaatgagctgaccaagaaccagggt cagccctgacctgctgtgcaaaaggctctatccaagcgacatgcctggagtggtgaga gcaatgggcagccgggagacaactacaagaaccagccctccggtgctggactcagac ggctcctctctctctacagcaagctaccgtggacaagagcagggtggcagcagggga acgtctctcatgtcctgtgatgcatgaggctctgcacaaactacacgcagaagagc ctctccctgtcccggtaaatga
019009	88	MEAPAQLFLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR TSENVYSYLAWYQQKPGQAPRLLIYFAKTLAEGIPARFSGSGS GTDFTLTISSELPEDFAVYYCQHHSDNPWTFGGGTKVEIKGGG SGGGGSGGGGASEVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYS FTGYNMNWVRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGQV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCARSVGPMDYWGRGT LVTVSSDQEPKSSDKTHTSPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

LISTA DE SEQUÊNCIA

<110> Grosmaire et al.

<120> Redução de células B com o uso de moléculas de
ligação específicas para CD-37 e específicas para
CD20

<13 0> 30906/41324PCT

<150> US 60/702,4 99

<151> 25/07/2005

<150> US 60/800,595

<151> 16/05/2006

<160> 78

<170> Patentln versão 3.3

<210> 1

<211> 1510

<212> ADN

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> PoiinucleotídeoTRU-016

<400> 1

aagcttgccg	ccatggattt	tcaagtgcag	attttcagct	tctgctaata	cagtgcctca	60
gtcataattg	ccagaggagt	cgacatccag	atgactcagt	ctccagccctc	cctatctgca	120
tctgtggggag	agactgtcac	catcacatgt	cgaacaagtg	aaaatgttta	cagttatttg	180
gcttgggtatc	agcagaaaca	gggaaaatct	cctcagctcc	tggtctcttt	tgcaaaaacc	240
ttagcagaag	gtgtgccatc	aagggttcagt	ggcagtgga	caggcacaca	gttttctctg	300
aagatcagca	gcctgcagcc	tgaagattct	ggaagtlatt	tctgtcaaca	tcattccgat	360
aatccgtgga	cgttcgggtg	agggaccgaa	ctggagatca	aaggtggcgg	tggctcgggc	420
ggtaggtgggt	cgggtggcgg	cggatcgta	gggtccagc	tgcagcagtc	tggacctgag	480
tcggaaaagc	ctggcgcttc	agtgaagatt	tctgcgaagg	cttctgggta	ctcattcaat	540
ggctacaata	tgaactgggt	gaagcagaat	aatggaaaga	gccttgagtg	gattggaaat	600
attgatcctt	attatgggtg	tactacctac	aaccgggaagt	tcaagggcaa	ggccacattg	660
actgtagaca	aatcctccag	cacagcctac	atgcagctca	agagtcctgac	atctgaggac	720
tctgcagctc	attactgtgc	aagatcggtc	ggccctatgg	actactgggg	tcaaggaaac	780
tcagtcaccg	tctcttcaga	tctggagccc	aaatctttctg	acaaaactca	caratctcca	840
cctgtcccag	caactgaact	cttgggtgga	cgtcagctct	tctctctccc	cccaaaaccc	900
aaggacaccc	tcattgatctc	cggaccctct	gaggtcacat	gcgtgggtgt	ggacgtgagc	960
cacgaagacc	ctgaggtcaa	gttcaactgg	tacgtggacg	gcgtggaggt	gcataatgcc	1020
aagaacaaagc	cgggggagga	gcagtacaac	agcaggtacc	gtgtgggtcag	cgtcctcacc	1080
gccccgcacc	aggactgggt	gaatggcaag	gagtacaagt	gcaagggtctc	caacaaagcc	1140
ctcccagccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaagccaaag	ggcagccccc	agaaccacag	1200
gtgtacaccc	tgcctccatc	cggggatgag	ctgaccaaga	accaggtcag	cctgaacctgc	1260
ctggtcaaag	gcttctatcc	aagcgacatc	gccgtggagt	gggagagcaa	tgggcaaccg	1320
gagaacaact	acaagaccac	gcctcccggt	ctggactccg	acggctcctt	cttctctctac	1380
agcaagctca	cgtgggacaa	gagcaggtgg	cagcagggga	acgtcttctc	atgctccgtg	1440
atgcatgagg	ctctgcacaa	ccactacacg	cagaagagcc	tctccctgtc	tccgggtaaa	1500
tgagtctaga						1510

<210> 2

<211> 496

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleotídeo TRU-016

<400> 2

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser		
1				5					10					15			
Val	Ile	Ile	Ala	Arg	Gly	Val	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala		
			20				25						30				
Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr		
		35					40					45					
Ser	Glu	Asn	Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly		
	50					55					60						
Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly		
65					70					75					80		
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu		
				85					90						95		
Lys	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Gln		
			100					105					110				
His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu		
		115					120					125					
Ile	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly		
	130					135					140						

Ser Ser Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro
145 150 155 160

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
165 170 175

Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu
180 185 190

Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg
195 200 205

Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr
210 215 220

Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
225 230 235 240

Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
245 250 255

Ser Val Thr Val Ser Ser Asp Leu Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr
260 265 270

His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
275 280 285

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
290 295 300

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
305 310 315 320

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
325 330 335

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
340 345 350

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
355 360 365

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
370 375 380

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
385 390 395 400

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
405 410 415

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
420 425 430

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
435 440 445

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
450 455 460

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
465 470 475 480

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490 495

<210>
<211> 1518
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-015 polynucleotide
<400>3

```

aagcttgccg ccattggattt tcaagtgcag attttcagct tectgctaast cagtgccttca 60
gtcataatgt ccagaggaca aattgtcttc tccagctctc cagcaatcct gtctgcattct 120
ccagggggaga aggtcacaat gacttgcagg gccagctcaa gtgtaagtta catgcactgg 180
taccagcaga agccaggatc ctcccccaaa ccttggattt atgccccatc caacctggct 240
ctctggagtc ctgctcgctt cagtggcagt gggctctggga cctcttactc tctcacaatc 300
agcagagtgg aggtgaaga tgctgcact tattactgac agcagtggag ttttaaccca 360
ccacggttcg gtgtggggac caagctggag ctgaaagatg ggggtggctc gggcggtggt 420
ggatctggag gaggtgggag ctctcaggt tatctacagc agtctggggc tgagtgggtg 480
aggcctgggg cctcagtgaa gatgtcctgc aaggtctctg gctacacatt taccagttac 540
aatatgcact gggtaaagca gacacctaga cagggtctgg aatggattgg agctatttat 600
ccaggaaatg gtgatacttc ctacaatcag aagttcaagg gcaaggccac actgactgta 660
gacaaatcct ccagcacagc ctacatgcag ctacagagcc tgacatctga agactctgcg 720
gtctatttct gtgcaagagt ggtgtactat agtaactctt actggtactt cgatgtctgg 780
ggcacagggg caacggtcac cgtctctgat caggagccca aatcttctga caaaactcac 840
acatctccac cgtgctcagc acctgaacte ctgggtggac cgtcagtcct cctcttcccc 900

```

ccaaaaccca	aggacaccc	catgatctcc	eggacccctg	aggtcacatg	cgtgggtggtg	960
gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	tccaactggt	acgtggacgg	cgtggaggtg	1020
cataatgcc	agacaaagcc	gggggaggag	cagtacaaca	gcacgtaccg	tgtggtcagc	1080
gtcctcaccc	tcttgaccca	ggactggctg	aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	1140
aacaaagccc	ccccagcccc	catcgagaaa	accatctcca	aagccaaagg	gcagccccga	1200
gaaccacagg	tgtacaccc	gccccatcc	eggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	1260
ctgacctgcc	tggtaaagg	cttctatcca	agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	1320
gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	cctcccgctg	tggactccga	cggctccttc	1380
ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	agcaggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	1440
tgctccgtga	tgcattgagg	tctgcacaac	cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	1500
ccgggtaaat	gatctaga					1518

<210> 4

<211> 499

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> Polinucleotídeo TRU-015

<400> 4

Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	1	5	10	15
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	20	25	30	
Leu	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	35	40	45	
Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	50	55	60	
Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Pro	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	65	70	75	80
Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	85	90	95	
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	100	105	110	
Ser	Phe	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	115	120	125	

Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ser
 130 135 140
 Gln Ala Tyr Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Ser Val Arg Pro Gly Ala
 145 150 155 160
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 165 170 175
 Asn Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Arg Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 180 185 190
 Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 195 200 205
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 210 215 220
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 225 230 235 240
 Ala Arg Val Val Tyr Tyr Ser Asn Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
 245 250 255
 Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Cys
 260 265 270
 Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Ser Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 275 280 285
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 290 295 300
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His
 305 310 315 320
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val
 325 330 335
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
 340 345 350
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
 355 360 365
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
 370 375 380

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
385 390 395 400

Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
405 410 415

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
420 425 430

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
435 440 445

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
450 455 460

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
465 470 475 480

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
485 490 495

Pro Gly Lys

<210> 5

<211> 1482

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 5

```

atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc      120
ctctcttgcc gaacaagtga aaatgtttac agctaettag cctggtagca acagaaacct      180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc      240
aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcaactetca ccacacagag cctagagcct      300
gaagattttg cagttttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa      360
gggaccaaag tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggag gtggtggatc tggaggaggt      420
gggacccgtg aggtgcagct ggtgcagttc ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagttc      480
ctgaagattt cctgtaaggg atccgggtac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg      540
cgccagatgc cggggaaaag cctcgagttg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt      600
actacctaca accggaagtt caaggggccag gtcactatct ccgcccagaa gtccatcagc      660

```

```

accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca cgcctatgta ttactgtgca 720
cgctcagteg gccctatgga ctactggggc cggggcacc cggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatctctga caaaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtctt cctcttccc ccaaaaccca aggaacccct catgctctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gggggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagcccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtc aaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccag 1320
cctcccgtagc tggactcga cggtctctt ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctcgtga tgcattgaggc tctgcacaac 1440
cactacagc agaagagcct ctccctgtct cggggtaat ga 1482

```

<210> 6
 <211> 493
 <212> P12T
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 6

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro.
1          5          10          15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20          25          30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
35          40          45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50          55          60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65          70          75          80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85          90          95

```


Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 7

<211> 1482

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 7

```

atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgctactct ggtctccaga taccaccgga      60
gaattgtgtg tgacacagtc ttcagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc      120
ctctctgtgc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct      180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaaact tagcagaagg aattccagcc      240
aggttcagtg gcagtggtat cgggacagac ttcactctca ccacagcag cctagagcct      300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa      360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcgggct gtggtggatc tggaggaggt      420
gggagctctg aggtgcagct ggtgcagtct ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagctt      480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg      540

```

```

cgccagatgc cggggaagg cctogagtgg atgggcaata ttgatectta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gteactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccttatgga ctactggggc cggggcaccg tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccggt acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtcct cctcttccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggt gacgtgagcc acgaagaccc tgagggtcag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaagcc cggggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc acaaaagccc tccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gcccccctcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcn tggtaaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
ctctccgtgc tggactccga cggctccttc tctctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattaggc tctgcacaac 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cggggtaaat ga 1482

```

<210> 8

<211> 493

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 8

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20           25           30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
35           40           45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50           55           60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65           70           75           80

```

Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser		
				85					90					95			
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Ser		
			100					105					110				
Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly		
		115					120					125					
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu		
	130					135					140						
Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser		
145					150					155					160		
Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Asn		
				165					170					175			
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly		
			180					185					190				
Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys		
		195				200						205					
Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu		
	210					215					220						
Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala		
225				230						235					240		
Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr		
				245					250					255			
Val	Ser	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser		
			260					265					270				
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu		
		275					280					285					
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu		
	290					295					300						
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys		
305					310					315					320		
Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys		
				325				330						335			

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 9
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 9

atggaagccc	cagctcagct	tctcttctct	ctgtactctt	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccaggcga	wagagccacc	120
ctctcctgcc	gaacaagtga	aaatgtttac	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ctaggctcct	catctatctt	gcaaaaacct	tagcagaagy	aaticcagcc	240
aggttcagtg	gcagtggtac	ogggacagac	ttactcttca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcaacat	cattccgata	atccgtggac	attcggccaa	360
gggaccaagg	tggaaatcaa	aggtggcggt	ggctcgggog	gtggtggatc	tggaggaggt	420
gggacccggtg	aggtgcagct	ggtgcagctt	ggagcagagt	cgaaaaagcc	cgagaggtct	480
ctgaagattt	cctgtaaggg	atccggttac	tcattcaactg	gctacaatat	gaactgggtg	540
cgccagatgc	ccgggaaagg	cctcgagtg	atgggcaata	ttgatcctta	ttatgggtgt	600
actacctaca	acgggaagtt	caagggccag	gtcactatct	ccgcagacaa	gtccatcagc	660
accgcctacc	tgcaatggag	cagctgaag	gcctcggaca	ccgccatgta	ttactgtgca	720
cgttcagtcg	gccctatgga	ctactggggc	cgccgcaccc	tggtcactgt	ctcctctgat	780
caggagccca	aatctcttga	caaaactcac	acatctccac	cgtgcccagc	acctgaactc	840
ctgggtggac	cgtcagtcct	cctcttcccc	ccaaaaccca	aggacacctt	catgatctcc	900
cggacccctg	aggtcacatg	cgtgggtggt	gacgtgagcc	acgaagacct	tgaggtcaag	960
ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggagggt	cataatgcca	agacaaagcc	gcgggaggag	1020
cagtacaaca	gcaggtaccg	tgtggtcagc	gtcctcaccg	tcctgcacca	ggactgggtg	1080
aatggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aacaaagccc	tcccagcccc	catcgagaaa	1140
accatctccn	aagccaaagg	gcagcccccga	gaaccacagg	tgtacaacct	gccccatcc	1200
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctatcca	1260
agcgacatcg	cgtggagtg	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	1320
cctcccgctg	tggactccga	eggctccttc	ttctcttaca	gcaagctcac	cgtggacaag	1380
agcaggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	tgctcgtga	tgcatgaggc	tctgcacaa	1440
cactacagcg	agaagagccc	ctccctgtct	ccgggtaaat	ga		1482

<210> 10

<211> 493

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 10

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5				10						15	
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25						30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn
		35					40						45		
Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
	50					55					60				

Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	65	70	75	80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	85	90	95	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Ser	100	105	110	
Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	115	120	125	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Thr	Gly	Glu	130	135	140	
Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Ser	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser	145	150	155	160
Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Asn	165	170	175	
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	180	185	190	
Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys	195	200	205	
Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	210	215	220	
Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	225	230	235	240
Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	245	250	255	
Val	Ser	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	260	265	270	
Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	275	280	285	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	290	295	300	
Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	305	310	315	320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 11
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 11

atggaagccc	cagctcagct	tctcttcttc	ctgtactct	ggctcccaga	taccaccgga	60
gaaatttgt	tgacacagtc	tcagccacc	ctgtctttgt	ctccaggcga	aagagccacc	120
ctctcctgc	gaacaagtca	aaatgtttac	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ctaggtcct	cattctatct	gcacaaacct	tagcagaagg	aattccagcc	240
aggttcagtg	gcagtggatc	cggaacagac	ttactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcaacat	cattccgata	atccgtggac	attcggccaa	360
gggaccaagg	tggaatcaa	aggtggcgg	ggctcgggg	gtggtaggac	tggaaggagt	420
gggacgggtg	aggtgcagct	ggtgcagct	ggagcagagg	tgaaaaagcc	cggagagtct	480
ctgaagattt	cctgtaagg	atccgggtac	tcattcaactg	gctacatata	gaactgggtg	540
cggcagatgc	cgggaaagg	cctcagtggt	atgggaata	ttgatcctta	ttatgggtgt	600
actacctaca	accggaagtt	caagggccag	gtcactatct	cggccgacaa	gtccatcagc	660
accgctacc	tgcaatggag	cagcctgaag	gcctcggaca	cggccatgta	ttactgtgca	720
cgtcagtcg	gcccatagga	ctactggggc	cggggcacc	tggtcactgt	ctcctctgat	780
caggagccca	aattctctga	caaaactcac	acatctccac	cgtgcccagc	acctgaactc	840
ctgggtggac	cgtcagtcct	ctcttctccc	ccaaaaccca	aggacacctt	cattgatctcc	900
cggacccctg	aggtcacatg	cgtgggtggtg	gacgtgagcc	acgaagaccc	tgaggtcaag	960
ttcaactggt	acgtggacgg	cgtggaggtg	cataatgcca	agacaaagcc	gcgggaggag	1020
cagtacaaca	gcaegtaccg	tgtggtcagc	gtcctccacc	tctgcacca	ggactggtgt	1080
aattggcaagg	agtacaagtg	caaggtctcc	aaacaaagcc	tcacagcccc	cattcagagaa	1140
accatctcca	aagccaaagg	gcagcccccga	gaaccacagg	tgtacacctt	gcccccatcc	1200
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctatcca	1260
agcgacatcg	cgtggagtg	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	1320
cctcccgctg	tggaactcga	cggctccttc	ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	1380
agcaggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	tgctccctga	tgcatgaggc	tctgcacaa	1440
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	cggggtaaat	ga		1482

<210> 12

<211> 493

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 12

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5					10					15	
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25					30		
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Asn
		35					40					45			

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 235 240 245 250 255
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 260 265 270
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 275 280 285
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 290 295 300

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
305 310 315 320

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
325 330 335

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
340 345 350

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 13

<211> 1482

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 13

```
atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga    60
gaaattgtgt tgaccagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc    120
ctctctgtgc gaacaagtga aagtgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct    180
```

```

ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaaact tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtgagtc cgggacagac ttcaactctc ccacagcag cctagagcct 300
gaagatcttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
gggaccggtg aggtgcagct ggtgcagctt ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagctt 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc cgggaaagg cctcagtggt atgggcaata ttgatccta ttatgggtgt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct cggccgacaa gtccatcagc 660
accgctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca cggccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggggcacc cggtcactgt ctccctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaaactcac acatctccac cgtgccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagtcct cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaagcc gggggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtcttcaccg tctgcacca ggactggtg 1080
aatggcaagg agtacaaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagcccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagccacg 1320
cctcccgctg tggactcga cggctcttc ttctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgctccgtga tgcattgagg tctgcacaac 1440
cactacagc agaagagcct ctccctgtct cgggtaaat ga 1482

```

<210> 14
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 14

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20           25           30

```

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Ser
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 15
 <211> 1482
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 15


```

atggaagccc cagctcagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccaga taccacccga 60
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
ctctcttgcc gagcaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtagca acagaaacct 180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggaac cgggacagac ttcaactctc ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggctcggggc gtggtggatc tggaggaggt 420
gggaccgggt aggtgcagct ggtgcagctt ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagtct 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc cggggaagg cctcgagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcaactctt ccgcgcacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgcctatga ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccg tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatcttctga caaactcac acatctccac cgtgcccagc acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacacct catgatctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggt gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcca agacaaagcc gcgggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tcttgaccca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacct gccccatcc 1200
cgggatgagc tgacaaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtaaaagg cttctatcca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgctg tggactccga cggctcttc tctctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcattgagg tctgcacaac 1440
cactacaagc agaagagcct ctccctgtct cggggtaaat ga 1482

```

```

<210> 16
<211> 493
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 16

```

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

```

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 17

<211> 1479

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 17

```
atggaagcac cagcgcagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga tcccaccggt    60
gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgcat ctgtgggaga gactgtcacc    120
atcacatgtc gaacaagtga aaatgtttac agttatttgg cttggtatca gcagaaacag    180
ggaaaatctc ctragctcct ggtctctttt gcaaaaacct tagcagaagg tgtgccatca    240
aggttcagtg gcagtgagtc aggcacacag ttttctctga agatcagcag cctgcagcct    300
gaagattctg gaagttattt ctgtcaacat cattccgata atccgtggac gttcggtgga    360
ggcacccaac tggagatcaa aggtggcggt ggctggggcg gtgggtgggtc gggtggcggc    420
ggagctagcg aggtgcagct ggtgcagctc ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagctc    480
ctgaggattt cctgttaagg atccggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg    540
cgccagatgc ccgggaaggg cctggagtgg atgggcaata ttgatcetta tiatggtggt    600
actacctaca accggaagtt caagggcag gtcactatct ccgccagaca gtccatcagc    660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctggaca ccgccatgta ttactgtgca    720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcaccc tggtcactgt ctctcagagc    780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gcccagcacc tgaactcctg    840
ggtagaccgt cagtcttctt cttcccccca aaacccaagg acacccctcat gatctccggg    900
acccctgagg tcacatgcgt ggtgggtggc gtyagccacy aagaccctga ggtcaagttc    960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaga caaagccgcg ggaggagcag   1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaat   1080
ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc cagcccccct cgagaaaacc   1140
atctccaaag ccaaaggcca gccccagaga ccacaggtgt acacccctgcc cccatcccg   1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc   1260
gacatcgctg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct   1320
cccgctctgg actccgaagg ctctctcttc ctctscagca agctcaccgt ggacaagagc   1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac   1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaaatga                               1479
```

<210> 18

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 18

Met. Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1		5		10		15									
Asp	Thr	Thr	Gly	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser
			20					25						30	
Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn
		35					40					45			
Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro
	50					55					60				
Gln	Leu	Leu	Val	Ser	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Val	Pro	Ser
65					70					75					80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Gln	Phe	Ser	Leu	Lys	Ile	Ser
			85						90					95	
Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Ser	Tyr	Phe	Cys	Gln	His	His	Ser
			100					105					110		
Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu	Ile	Lys	Gly
		115					120					125			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Glu
	130					135					140				
Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu	Ser
145					150					155					160
Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Asn
				165					170					175	
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
			180					185					190		
Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys
		195					200					205			
Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu
	210					215					220				
Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala
225					230					235					240
Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr
				245					250					255	

Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	260	265	270	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	275	280	285	
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	290	295	300	
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	305	310	315	320
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	325	330	335	
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	340	345	350	
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	355	360	365	
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	370	375	380	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	385	390	395	400
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	405	410	415	
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	420	425	430	
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	435	440	445	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	450	455	460	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	465	470	475	480
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					485	490		

<211> 1479
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 19

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgtactctt ggctccaga taaccacggg	60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctccgtgc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtagca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
agggttcagt gcagtgagtc cgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcggggg gtagtgagtc tggaggagg	420
ggagctagcg cggctcagct gcagcagctt ggacctgagt cggaaaagcc tggcgcttca	480
gtgaagattt cctgcaaggc ttctgggtac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg	540
aagcagaata atggaagag ccttgagtgg attggaata ttgatcctta ttatgggtgg	600
actacctaca accggaagtt caagggcaag gccacattga ctgtagacaa atccctccagc	660
acagcctaca tgcagctcaa gagtctgaca tctgaggact ctgcagctca ttactgtgca	720
agatcggteg gccctatgga ctactggggg caaggaacct cagtcaccgt ctctccagc	780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccacctt gcccagcacc tgaactcctg	840
ggtagacagt cagtcttctt cttcccccca aaaccaagg acacctcat gatctccgg	900
acctctgagg tcacatgcgt ggtggtagac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc	960
aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaa ga caaagccgcg ggaggagcag	1020
tacaacagca cgtacogtgt ggtcagcgtc ctccacgtcc tgcaccagga ctggctgaat	1080
ggcaaggagt acaagtgc aa ggtctccacc aaagccctcc cagcccccct cgagaaaacc	1140
atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acacctgce cccatcccg	1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgctctg tcaaaggctt ctatccaago	1260
gacatcgcgc tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa gaccacgct	1320
cccgctctgg actccagcgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc	1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac	1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga	1479

<210> 20
<211> 492
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 20

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ala
 130 135 140
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro Gly Ala Ser
 145 150 155 160
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 210 215 220
 Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 21
 <211> 1479
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 21

```

atggaagcac cagcgagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga taccacoggt    60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc    120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtagca acagaaacct    180
ggccaggctc ctaggctcct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc    240
aggttcagtg gcagtgagtc cgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctagagcct    300
gaagattttg cagtttatla ctgtcaacat cattccgata atcctgggac attcggccaa    360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggtcggggcg gtggtggatc tggaggaggt    420
ggagctagcc aggtgcagct ggtggagctt ggtggaggcg tggccagcc tgggaggtcc    480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc    540
cgccagatgc cggggaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt    600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct cggccgacaa gtccatcagc    660
accgectacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca cggccatgta ttactgtgca    720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggcgaccct tggtcactgt ctctcagac    780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tctccaccgt gccagcacc tgaactcctg    840
ggtggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaaccaagg acacccctcat gatctcccg    900
acctctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagttc    960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaga caaagccgcg ggaggagcag   1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaat   1080
ggcaaggagt acaagtgcac ggtctcnaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaaac   1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacccctgcc cccatcccg    1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg taaaaggctt ctatccaagc   1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgctt   1320
ccgtgctgg actcgaagg ctcttctctt ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc   1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tcctgatgc atgaggctct gcacaaccac   1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga                      1479
  
```

<210> 22
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial

<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 22

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro	1	5	10	15
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	20	25	30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	35	40	45	
Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	50	55	60	
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	65	70	75	80
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	85	90	95	
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Ser	100	105	110	
Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	115	120	125	
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Gln	130	135	140	
Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	Ser	145	150	155	160
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Asn	165	170	175	
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	180	185	190	
Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys	195	200	205	
Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	210	215	220	

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 23
<211> 1503
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 23

```

atggaagcac cagcgcagct tctcttctct ctgtactctt ggtcccaga taccaccggt    60
gcggtccagc tgcagcagtc tggacctgag tcggaaaagc ctggcgcttc agtgaagatt    120
tcctgcaagg cttctgggtt ctcattcact ggctacaata tgaactgggt gaagcagaat    180
aatggaaaga gccctgagtg gattggaaat attgatcctt attatgggtg tactacctac    240
aaccggaagt tcaagggcaa ggcacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac    300
atgcagctca agagtctgac atctgaggac tetgcagtct attactgtgc aagatcggtc    360
ggccttatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcttctgg tggcggtggc    420
tcgggcggtg gtgggtcggg tggcgcgga tcaggaggag gggggagtgc tagcgaatt    480
gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gcgaagagc caccctctcc    540
tgccgaacaa gtgaaaatgt ttacagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag    600
gctectaggc tctctcatct ttttgcaaaa accttagcag aaggaattcc agccaggttc    660
agtggcagtg gatccgggac agacttcact ctccaccatc gcagcctaga gctgaagat    720
tttgcagttt attactgtca acatcattcc gataatccgt ggacattcgg ccaagggaac    780
aaggtggaaa tcaaaggctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatctcca    840
ccgtgcccag cactgaact cctgggtgga cgtcagttct tctcttccc cccaaaaccc    900
aaggacaccc tcattgattc ccgaacccct gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc    960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggaag gcgtggaggt gcataatgcc   1020
aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc   1080
gtcctgcacc aggaactggc gaatggcaag gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc   1140
ctcccagccc ccactgagaa aaccatctcc aaagocaaag ggcagccccg agaaccacag   1200
gtgtacaccc tgccccatc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc   1260
ctggtcaaag gcttctatcc aagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tggcgagccc   1320
gagaacaact acaagaccac gcctcccggt ctggactccg acggctcctt ctctctctac   1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg   1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa   1500

```


tga	1503
<210>	24
<211>	500
<212>	PRT
<213>	Sequência artificial
<220>	
<223>	TRU-016 humanizado
<400>	24

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu
 20 25 30
 Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
 35 40 45
 Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr
 65 70 75 80
 Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
 85 90 95
 Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
 100 105 110
 Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 115 120 125
 Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Ile
 145 150 155 160
 Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 165 170 175
 Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Phe
 195 200 205

Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

- <210> 25
- <211> 1488
- <212> ADN
- <213> Sequência artificial
- <220>
- <223> TRU-016 humanizado
- <400> 25

```

atggatitct aagtgcagat ttccagcttc ctgctaatac gtgcttcagt cataattgcc      60
agaggagtcg aaattgtgtt gacacagctc ccagccaccc tgcctttgtc tccaggcgaa      120
agagccaccc tctcctgcgc aacaagtga aatgtttaca gctacttagc ctggtaccaa      180
cagaaacctg gccaggctcc taggcctctc atctattttg caaaaacctt agcagaagga      240
attccagcca ggttcagtgg cagtggatcc gggacagact tcactctcac catcagcagc      300
ctagagcctg aagattttgc agtttattac tgtcaacatc attccgataa tccgtggaca      360
ttcggccaag ggaccaaggt ggaatcaaa ggtggcggtg gtcggggcgg tgggtggatc      420
ggaggaggtg gagctagcgc ggtccagctg cagcagctct gacctgagtc ggaaaagcct      480
ggcgttcag tgaagatttc ctgcaaggtt tctggttact cattcactgg ctacaatatg      540
aactgggtga agcagaataa tggaaagagc cttgagtggg ttggaaatat tgatccttat      600
tatggtggta ctacctacaa ccggaagttc aaggggcaagg ccacattgac tgtagacaaa      660
tcttcagcca cagcctacat gcagctcaag agtctgacat ctgaggactc tgcagcttat      720
tactgtgcaa gatcggtcgg ccttatggac tactggggtc aaggaaacct agtcaccgtc      780
tcttcagagc agcccaaatc ttctgacaaa actcacacat ctccacgtg cccagcacc      840
gaactcctgg gtggaccgtc agtcttctc ttcccccaa aacccaagga caccctcatg      900
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtggacy tgagccacga agacctgag      960
gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg      1020
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcacgtctct gcaccaggac      1080
tggtgaatg gcaaggagta caagtgaag gtctccaca aagccctccc agccccatc      1140
gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaae cacaggtgta caccctgccc      1200
ccatcccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc      1260

```

tatccaaggg acatgcgcgt ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag 1320
 accaagcctc cctgtctgga ctccgacggc tcttctctcc ttatcagcaa gctcaccgtg 1380
 gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct cctgatgca tgaggctctg 1440
 cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg glaaatga 1488

<210> 26

<211> 495

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 26

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val Ile Ile Ala Arg Gly Val Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 20 25 30

Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr
 35 40 45

Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 50 55 60

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly
 65 70 75 80

Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 85 90 95

Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
 100 105 110

His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 115 120 125

Ile Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

Ala Ser Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro
 145 150 155 160

Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 165 170 175

Gly	Tyr	Asn	Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Asn	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu		
		180						185					190				
Trp	Ile	Gly	Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg		
		195					200					205					
Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr		
	210					215					220						
Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr		
225					230					235					240		
Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr		
			245						250					255			
Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His		
			260					265					270				
Thr	Ser	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val		
		275					280					285					
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr		
	290					295					300						
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu		
305					310					315					320		
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys		
			325						330					335			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser		
			340					345					350				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys		
		355					360					365					
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile		
	370					375					380						
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro		
385					390					395					400		
Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu		
			405						410					415			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn		
		420						425					430				

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 435 440 445

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 450 455 460

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 465 470 475 480

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490 495

<210> 27

<211> 1503

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 27

```

atggaagcac cagcgagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt    60
gcggtccagc tgcagcagtc tggacctgag tcgaaaaagc ctggcgcttc agtgaagatt    120
tcttgcaagg cttctgggta ctcatcact ggctacaata tgaactgggt gaagcagaat    180
aatggaaaga gccttgagtg gattggaat attgatcctt attatgggtg tactacctac    240
aaccggaagt tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac    300
atgcagctca agagtctgac atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatcggtc    360
ggccttatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcttctgg tggcggtggc    420
tcgggcggtg gtgggtcggg tggcggcgga tcaggaggag gggggagtgc tagcgaaatt    480
gtgttgacac agtctccagc caccctgtct ttgtctccag gcgaaagagc caccctctcc    540
tgccgaacaa gtgaaaatgt ttacagctac ttagcctggt accaacagaa acctggccag    600
gtccttaggc tctcatcta ttttgcaaaa accttagcag aaggaattcc agccagggtc    660
agtggcagtg gatccgggac agacttcaat ctaccatca gcagcctaga gectgaagat    720
tttgagttt attactgtca acatcatccc gataatcagt ggacattcgg ccaagggacc    780
aaggtggaaa tcaaaggctc gagcgagccc aaatcttctg acaaaactca cacatgccca    840
ccgtgccagc cactgaact cctgggtgga ccgtcagtct tctcttccc cccaaaaccc    900
aaggacaccc tcatgatctc cggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc    960
cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc   1020
aagacaaagc ccggggagga gcagtacaa agcagctacc gtgtggtcag cgtcctcacc   1080
gtcctgnacc aggactggct gaatggcag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc   1140

```

```

ctcccagccc ccctcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag 1200
gtgtacaccc tgcccccac ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 1250
ctggtcaaaag gctttctatcc aagcgacatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg 1320
gagaacaact acaagaccac gctctccgtg ctggaactccg acggtctctt ctteetctac 1380
agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg 1440
atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 1500
tga 1503

```

<210> 28

<211> 500

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 8

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

```

```

Asp Thr Thr Gly Ala Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu
20           25           30

```

```

Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser
35           40           45

```

```

Phe Thr Gly Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser
50           55           60

```

```

Leu Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr
65           70           75           80

```

```

Asn Arg Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser
85           90           95

```

```

Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala
100          105          110

```

```

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln
115          120          125

```

```

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
130          135          140

```

```

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Ile
145          150          155          160

```


Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg
 165 170 175
 Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
 180 185 190
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Phe
 195 200 205
 Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 210 215 220
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp
 225 230 235 240
 Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser Asp Asn Pro Trp Thr Phe
 245 250 255
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly Ser Ser Glu Pro Lys Ser
 260 265 270
 Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 275 280 285
 Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 290 295 300
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 305 310 315 320
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 325 330 335
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 340 345 350
 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asp
 355 360 365
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 370 375 380
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 385 390 395 400
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 405 410 415

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 420 425 430

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 435 440 445

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 450 455 460

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 465 470 475 480

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 485 490 495

Ser Pro Gly Lys
 500

<210> 29

<211> 1479

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 29

atggaagcac	cagcgcagct	tctcttctct	ctgetactct	ggetcccaga	taccacgggt	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccaggcga	aagagccacc	120
ctctctgtcc	gaacaaagtga	aaatgtttac	agctacttag	cctggtagca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ctaggctctt	cattctatct	gcaaaaaacct	tagcagaagg	aattccagcc	240
agggtcagtg	gcagtgagtc	cgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcaacat	cattccgata	atccgtggac	attcgcccaa	360
gggaccaagg	tggaaatcaa	aggtggcggt	ggctcgggcg	gtggtggatc	tggaggaggt	420
ggagctagcg	cggtccagct	gcagcagctc	ggacctgagt	cggaaaagcc	tggcgcttca	480
gtgaagattt	cctgcaaggc	ttctggttac	tcattcactg	gctacaatat	gaactgggtg	540
aagcagaata	atggaaagag	ccttgagtg	attggaaata	ttgatcctta	ttatgggtgt	600
actacctaca	accggaagtt	caagggcaag	gccacattga	ctgtagacaa	atcctccagc	660
acagcctaca	tcagctcaa	gagtcctgac	tctgaggact	ctgcagctca	ttactgtgca	720
agatcggtcg	gacctatgga	ctactggggg	caaggaacct	cagtcaccgt	ctcctcgagc	780
gagcccaaat	cttctgacaa	aactcacaca	tctccaccgt	gccagcacc	tgaactcctg	840
ggtaggaccg	cagttctctt	cttcccccca	aaacccaagg	acacctcat	gatctccggg	900

```

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacccatga ggtcaagttc 960
aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcttgg tcaaaggctt ctatccaage 1260
gacatgcgcg tggagtgagg gagcaatggg cagccggaga caactacaa gaccacgct 1320
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1479

```

<210> 30

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 30

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20          25          30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
35          40          45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50          55          60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65          70          75          80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85          90          95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
100         105         110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115         120         125

```

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Ala	130	135	140
Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Ser	Glu	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	145	150	155
Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Gly	Tyr	Asn	165	170	175
Met	Asn	Trp	Val	Lys	Gln	Asn	Asn	Gly	Lys	Ser	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	180	185	190
Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys	195	200	205
Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	210	215	220
Gln	Leu	Lys	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	225	230	235
Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	245	250	255
Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	260	265	270
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	275	280	285
Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	290	295	300
Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	305	310	315
Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	325	330	335
Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	340	345	350
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	355	360	365
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	370	375	380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

- <210> 31
- <211> 1479
- <212> ADN
- <213> Sequência artificial
- <220>
- <223> TRU-016 humanizado
- <400> 31

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggtcccca taccaccggt	60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc	120
ctctcctgco gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct	180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc	240
agggtcagtg gcagtggtac cgggacagac ttcaactctca ccatcagcag cctagagcct	300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa	360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggtcggggc gtggtggatc tggaggaggt	420
ggagctagcy cggctccagct gcagcagttt ggaactgagt cggaaaagcc tggcgtttca	480
gtgaagattt cctgcaaggc ttctggttac tcattcactg gctacaatat gaactgggtg	540
aagcagaata atggaagag ccttgagtgg attggaaata ttgatactta ttatggtggt	600
actacctaca accggaagtt caagggaag gccacattga ctgtagacaa atcctccagc	660
acagcctaca tgcagctcaa gactctgaca tctgaggact ctgcagctca ttactgtgca	720
agatcggtcg gccataigga ctactggggt caaggaaacct cagtcaccgt ctctccagac	780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcaccaggt gccagcacc tgaactcctg	840
ggtggaccgt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acacctcat gatctcccg	900
accctgagg tcacatgctt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc	960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag	1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaat	1080
ggcaaggagt acaagtcaa ggtctcaaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaaac	1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgcc cccatcccg	1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc	1260
gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct	1320
cccggtgctg actccagcgg ctctttcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc	1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac	1440
tacacgcaga agagctctc cctgtctccg ggtaaatga	1479

<210> 32
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 32

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

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Ala
 130 135 140

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Ser Glu Lys Pro Gly Ala Ser
 145 150 155 160

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175

Met Asn Trp Val Lys Gln Asn Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
 180 185 190

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 210 215 220

Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 245 250 255

Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 33
 <211> 1479
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 33

atggaagcac cagcgcagct tctcttctct ctgtactctt ggtccccaga taccaccggt 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccaac ctgtctttgt ctcnaggcga aagagccacc 120
 ctctcttgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
 ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
 aggttcagtg gcagtggatc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
 gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
 gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggtcggggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
 ggagctagcc aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggcg tggccagcc tgggaggtcc 480
 ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
 cgcagatgc ccgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgacetta ttatgggtgt 600
 actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgcgcacaa gtccatcagc 660

```

accgctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggggcaacc tggtaactgt ctctcagagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tggccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 840
ggcggaccgt cagtcttctt cttccccca aaacccasgg acacccctcat gatctcccg 900
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctacccgtcc tgcaccagga ctggtgaaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagcccccct cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacccctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1320
cccgtgctgg actcgcagc ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctct cctgtctccg ggtaaatga 1479

```

<210> 34
 <211> 492
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 34

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20          25          30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
35          40          45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50          55          60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65          70          75          80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85          90          95

```

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val
		355					360					365			
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala
	370					375					380				
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg
385					390					395					400
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
				405					410					415	
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro
			420					425					430		
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser
	435						440					445			
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln
	450					455					460				
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His
465					470					475					480
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
				485					490						

<210> 35
 <211> 1479
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 35

atggaagcac	cagcgcragct	tctcttcctc	ctgetactct	ggctcccaga	taccaccggt	60
gaaatttgtt	tgacacagtc	tccagccacc	ctgtctttgt	ctccaggcga	aagagccacc	120
ctctcctgcc	gaacaagtga	aaatggttac	agctacttag	cctgggtacca	acagaaacct	180
ggccaggctc	ctaggctcct	catctatctt	gcaaaaacct	tagcagaagg	aattccagcc	240
aggttcagtg	gcagtggatc	cgggacagac	ttcactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcaacat	cattccgata	atccgtggac	attcggccaa	360
gggaccaagg	tggaaatcaa	aggtggcggt	ggctcgggcg	gtggtggatc	tggaggaggt	420
ggagctagcc	aggtgcagct	ggtggagctc	ggtagaggcg	tggtcagccc	tgggaggtcc	480
ctgagactct	cctgtgcagc	ctctggattc	accttcagtg	gctacaatat	gaactgggtc	540
cgccagatgc	ccgggaaagg	cctggagtg	atgggcaata	ttgatcctta	ttatggtggt	600
actacctaca	accggaagtt	caagggccag	gtcactatct	ccgcgcacaa	gtccatcagc	660
accgcctacc	tgcaatggag	cagcctgaag	gcctcggaca	cgcctatgta	ttactgtgca	720
cgctcagtcg	gccctatgga	ctactggggc	cgcggcaccc	tggtcactgt	ctctcagagc	780
gagcccaaat	ctctcgacaa	aactcacaca	tgcccaacct	gcccagcacc	tgaactcctg	840
ggtggacogt	cagtcttctc	cttcccccca	aaacccaagg	acacctcat	gatctccgg	900
acccctgagg	tcacatgcgt	ggtgggtggc	gtgagccacg	aagacctga	ggtcaagtcc	960
aactggtagc	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaa	caaagccgcg	ggaggagcag	1020
tacaacagca	cgtacctgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggtgaat	1080
ggcaaggagt	acaagtgc	ggtctccaa	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaacc	1140
atctccaaag	ccaaagggca	gccccagaaa	ccacaggtgt	acacctgcc	ccatccccgg	1200
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatccaagg	1260
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	1320
cccgtgctgg	actccgacgg	ctccttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	1380
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	1440
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaatga			1479

<210> 36

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 36

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Gln
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	340	345	350	
Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	355	360	365	
Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	370	375	380	
Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	385	390	395	400
Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	405	410	415	
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	420	425	430	
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	435	440	445	
Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	450	455	460	
Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	465	470	475	480
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys					485	490		

<210> 37

<211> 1476

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 37

atggaagcac	cagcgcagct	tetettctct	ctgtactct	ggctcccaga	taccacgggt	60
gaaattgtgt	tgacacagtc	cccagctacc	ctgtctttgt	ctccaggcga	aagagccacc	120
ctctcctgcc	gaacaagtga	aaatggttac	agctacttag	cctggtaacca	acagaaacct	180
ggctaggctc	ctaggctcct	catctatttt	gcaaaaacct	tagcagaagg	aattccagcc	240
aggttcagtg	gcagtggtc	cgggacagac	ttaactctca	ccatcagcag	cctagagcct	300
gaagattttg	cagtttatta	ctgtcaacat	cattccgata	atccgtggac	attcgcccaa	360
gggaccaagg	tggaaatcaa	aggtggcggt	ggctcgggcg	gtggtggatc	tggaggaggt	420
ggggctagcg	aggtgcagct	ggtggagtct	ggtggaggct	tggccagacc	tggagggtcc	480
ctgagactct	cctgtgcagc	ctctggattc	accttcagtg	gtacaatat	gaactgggtc	540
cgccagatgc	cggggaagg	cctggagtgg	atgggcaata	ttgatcctta	ttatggtggt	600
actacctaca	accggaagtt	caagggccag	gtcaactatc	cgcgcgacaa	gtccatcagc	660
accgcctacc	tgcaatggag	cagcctgaag	gcctcggaca	cgcctatgta	ttactgtgca	720
cgttcagtgc	gccctatgga	ctactggggc	cgcggcaccc	tggtcactgt	ctcctcgagc	780
gagcccaaat	cttctgacaa	aactcaacaa	tctccaccgt	gcccagcacc	tgaactcctg	840
ggtggaccgt	cagtcttctc	cttcccccca	aaaccccaagg	acaccctcat	gatctcccg	900
acccctgagg	tcacatgcgt	ggtgggtggc	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	960
aactcgtaac	tggacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	1020
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggtgtaat	1080
ggcaaggagt	acaagtgcac	ggtctccaac	aaagccctcc	cagcccccat	cgagaaaaac	1140
atctccaaag	ccaaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acaccctgcc	cccatcccg	1200
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatccaagc	1260
gacatgcgcg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	1320
ccctgctgg	actccgacgg	ctcttctctc	ctctacagca	agctcacctg	ggacaagagc	1380
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	1440
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctccg	ggtaaa			1476

<210> 38

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 38

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5					10					15	
Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser
			20					25						30	
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn
		35					40						45		
Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
50						55					60				

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 39

<211> 1476

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 39

```

atggaagcac cagcgcagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccaga taccaccggt      60
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc      120
ctctctgccc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct      180
ggccaggctc ctaggctcct catctatttt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc      240
aggttcagtg gcagtcggtc cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      300
  
```

```

gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
ggggctagcg aggtgcagct ggtggagtct ggtggaggct tggccagcc tggagggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc cggggaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatgggtgt 600
actacctaca accggaagtc caagggccag gtcactatct ccgccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgaatggag cagcctgaag gcctcggaca ccgccaatga ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cgcggcacc cgggtcactgt ctctcgagc 780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 840
ggtggaccgt cagtcttctt cttccccca aaacccaagg acacccctcat gatctcccg 900
accctcgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggtgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagcccccac cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gcccagagaa ccacaggtgt acacccctgcc cccatcccg 1200
gatgagctga ceaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc 1260
gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct 1320
ccctgctgg actccagcgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctct cctgtctccg ggtaaa 1476

```

<210> 40

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 40

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
          20           25           30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
          35           40           45

```

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 41

<211> 1476

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 41

atggaagcac cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt 60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc 120
ctctctgccc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180

```

ggcagagptc ctaggtctct catctatctt gcaaaaacot tagcagaagg aattocagcc 240
aggttcagtg gcagtgagtc cgggacagac ttcactctca ccacagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat caticcgata atccgtggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggt ggtcggggcg gtggtggatc tggaggaggt 420
ggggctagcg aggtgcagct ggtggagctt ggtggaggct ctgtccagcc tggagggtcc 480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggatcc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc 540
cgccagatgc cgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatootta ttatgggtgt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct ccgcgacaa gtccatcagc 660
accgctacc tgcaatggag cagcctgaag gctcggaca ccgcatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggggcaccg tggtcactgt ctctcgagc 780
gagcccaaat cttctganaa aactcacaca tctccaccgt gccagcacc tgaactctg 840
ggtggacogt cagtcttctt ctcccccca aaacccaagg acacctcat gatctccgg 900
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 960
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caagccgcg ggaggagcag 1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccaccgtc tgcaccagga ctggctgaat 1080
ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1140
atctccaaag ccaaagggca gccccagaaa ccacaggtgt acacctgcc cccatccgg 1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaggctt ctatccaagc 1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgct 1320
cccgtgctgg actccagcgg ctcttcttct ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctcgg ggtaaa 1476

```

<210> 42

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 42

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1           5           10           15

```

```

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20           25           30

```


Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Thr Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ala Ser Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro
 260 265 270
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

- <210> 43
- <211> 1476
- <212> ADN
- <213> Sequência artificial
- <220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 43

```
atggaagcac cagcgcagct tctcttcttc ctgctactct ggctcccaga taccaccggt      60
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggcga aagagccacc      120
ctctcctgcc gaacaagtga aaatgtttac agctacttag cctggtagca acagaaacct      180
ggccaggctc ctaggtctct catctatttt gcaaaaaact tagcagaagg aattccagcc      240
aggttcagtg gcagtggtac cgggacagac ttcactctca ccacagcag cctagagcct      300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattccgata atccgtggac attcggccaa      360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtggcggg ggctcgggag gtggtggatc tggaggaggt      420
ggggctagcg aggtgcagct ggtggagctt ggtggaggct ctgtccagcc tggagggtcc      480
ctgagactct cctgtgcagc ctctggattc accttcagtg gctacaatat gaactgggtc      540
cgccagatgc cgggaaagg cctggagtgg atgggcaata ttgatcctta ttatggtagt      600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct cggccgacaa gtccatcagc      660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca cggccatgta ttactgtgca      720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggggcaccg tggtcactgt ctctcagacc      780
gagcccaaat cttctgacaa aactcacaca tgcaccacct gccccagacc tgaactcctg      840
ggtggacogt cagtcttctt ctctccccc aaaaaccaagg acacctctat gatctccggg      900
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagacctga ggtcaagtgc      960
aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaag caaagccggg ggaggagcag     1020
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctccacctcc tgcaccagga ctggctgaat     1080
ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc     1140
atctccaaag ccaaggggca gcccagagaa ccacaggtgt acacctgccc cccatccggg     1200
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccaagc     1260
gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct     1320
cccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc     1380
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggtctt gcacaaccac     1440
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaa                                1476
```

<210> 44

<211> 492

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 44

Met	Glu	Ala	Pro	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro
1				5					10					15	

Asp	Thr	Thr	Gly	Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	
			20					25					30			
Leu	Ser	Pro	Gly	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Thr	Ser	Glu	Asn	
		35					40					45				
Val	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	
	50					55					60					
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ala	Lys	Thr	Leu	Ala	Glu	Gly	Ile	Pro	Ala	
65					70					75					80	
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	
			85						90					95		
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	His	Ser	
			100					105					110			
Asp	Asn	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Gly	
		115					120						125			
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser	Glu	
	130					135						140				
Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	
145					150					155					160	
Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Asn	
				165					170					175		
Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	
		180						185					190			
Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe	Lys	
		195					200					205				
Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	
	210					215					220					
Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	
225					230					235					240	
Arg	Ser	Val	Gly	Pro	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	
				245					250					255		
Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	
			260					265					270			

Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 275 280 285

Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 290 295 300

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 305 310 315 320

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 325 330 335

Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 340 345 350

Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 355 360 365

Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 370 375 380

Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 385 390 395 400

Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 405 410 415

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 420 425 430

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 435 440 445

Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 450 455 460

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 465 470 475 480

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 45
 <211> 1482
 <212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 45

```
atggaagbccc cagctcagct tctcttctct ctgtactctt ggctcccgga taccacogga 60
gaaatttgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccaggoga aagagccacc 120
ctctctctgpc gagcaagtc aagtgtttac agctacttag cctggtacca acagaaacct 180
ggccaggctc ctaggtctct catctatctt gcaaaaacct tagcagaagg aattccagcc 240
aggttcagtg gcagtggtat cgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 300
gaagattttg cagtttatta ctgtcaacat cattecgata atcctgggac attcggccaa 360
gggaccaagg tggaaatcaa aggtgggggt ggctcggggg gtggtggatc tggaggaggt 420
gggaccggtg aggtgcagct ggtgcagctt ggagcagagg tgaaaaagcc cggagagctt 480
ctgaagattt cctgtaaggg atccggttac tcattoactg gctacaatat gaactgggtg 540
cgccagatgc cgggaaagg cctcgagtg atgggcaata ttgatcctta ttatggtggt 600
actacctaca accggaagtt caagggccag gtcactatct cggccgacaa gtccatcagc 660
accgcctacc tgcaatggag cagcctgaag gcctcggaca cggccatgta ttactgtgca 720
cgctcagtcg gccctatgga ctactggggc cggggcaccc tggtcactgt ctctctgat 780
caggagccca aatctttctga caaaactcac acatctccac cgtgcccage acctgaactc 840
ctgggtggac cgtcagttct cctcttcccc ccaaaaccca aggcacacct catgatctcc 900
cggacccctg aggtcacatg cgtgggtggtg gacgtgagcc acgaagaacc tgaggtcaag 960
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cataatgcc aagacaaagcc ggggaggag 1020
cagtacaaca gcacgtaccg tgtggtcagc gtctcaccg tctgcacca ggactggctg 1080
aatggcaagg agtacaaagt caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa 1140
accatctcca aagccaaagg gcagcccccga gaaccacagg tgtacacctt gccccatcc 1200
cgggatgagc tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg ctctctacca 1260
agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaat gggcagccgg agaacaacta caagaccacg 1320
cctcccgtgc tggactccga cggctcttct tctctctaca gcaagctcac cgtggacaag 1380
agcaggtggc agcaggggaa cgtcttctca tgcctcgtga tgcctgagge tctgcacaa 1440
cactacacgc agaagagcct ctccctgtct cggggtaaat ga 1482
```

<210> 46

<211> 493

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 46

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Trp Leu Pro

1	5	10	15
Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser	20	25	30
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser	35	40	45
Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro	50	55	60
Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala	65	70	75
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser	85	90	95
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser	100	105	110
Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Glu Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly	115	120	125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu	130	135	140
Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser	145	150	155
Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn	165	170	175
Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly	180	185	190
Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys	195	200	205
Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu	210	215	220
Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala	225	230	235
Arg Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr	245	250	255

Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
260 265 270
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
275 280 285
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
290 295 300
Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
305 310 315 320
Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
325 330 335
Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
340 345 350
Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
355 360 365
Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
370 375 380
Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
385 390 395 400
Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
405 410 415
Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
420 425 430
Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
435 440 445
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
450 455 460
Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
465 470 475 480
His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 47

<211> 1500

<212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 47

```

aagcttgccg ccattggaagc cccaggccag cttctcttcc tctgtctact ctggctccca    60
gataccaccg gagaaattgt gttgacacag tctccagcca cctgtctttt gtctccaggc    120
gaaagagcca cctctctctg ccgagcaagt gaaaatgttt acagctactt agcctggtag    180
caacagaaac ctggccaggc tcttaggtct ctcctctatt ttgcataaac cttagcagaa    240
ggaattccag ccagggttcag tggcagtgga tccgggacag acttcactct caccatcagc    300
agcctagagc ctgaagattt tgcagtttat tactgtcaac atcattccga taatccgtgg    360
acattcggcc aagggaccaa ggtggaatc aaaggtggcg ggggctcggg cgggtggtgga    420
tctggaggag gtgggacogg tgaggtgcag ctggtgcagt ctggagcaga ggtgaaaaag    480
cccgagagat ctctgaagat ttctgttaag ggatccggtt actcattcac tggctacaat    540
atgaactggg tgcgccagat gcccgggaaa ggcctcgagt ggatgggcaa tattgatect    600
tattatggtg gtactaccta caaccggaag ttcaaggggc aggtcactat ctccgccgac    660
aagtcaccca gcaccgcta cctgcaatgg agcagcctga aggcctcgga caccgccatg    720
tattactgtg cagctcagc cggcccttcc gactactggg gccagggcac cctggctact    780
gtctctctct atcaggagcc caatctctt gacaaaactc acacatctcc accgtgccca    840
gcacctgaac tctgggtggt accgtcagtc ttctcttccc ccccaaaacc caaggacacc    900
ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccaagaagac    960
cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag   1020
ccgctgggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgggtc ggtctctcac cgtcctgcac   1080
caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc   1140
cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc   1200
ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggtca gctgacctg cctgggtcaa   1260
ggcttctatc caagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac   1320
tacaagacca cgcctccggt gctggactcc gacggctcct tcttctctta cagcaagctc   1380
accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg aagctcttct catgctccgt gatgcatgag   1440
gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa atgatetaga   1500

```

<210> 48
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 48

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
 130 135 140
 Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
 145 150 155 160
 Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
 165 170 175
 Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
 180 185 190
 Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
 195 200 205
 Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
 210 215 220
 Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240

Arg Ser Val Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 485 490

<210> 49
 <211> 356
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 49

```

gctagcgagg tgcagctggt gcagctctga gcagaggtga aaaagcccg agagtctctg      60
aagatttctt gtaagggatc cggtractca ttcactggct acaatatgaa ctgggtgcgc      120
cagatgcccg ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tggtaggtact      180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc      240
gcttacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc      300
tcagtcggcc ctatggacgt ctggggccaa ggcaccactg tcaactgtctc ctgcag      356
  
```

<210> 50
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 50

aagcttgccg	ccatggaagc	cccagcgcag	cttctcttcc	tectgetact	ctggtcccca	60
gataccaccg	gagaaattgt	gttgacacag	tctccagcca	ccctgtcttt	gtctccaggc	120
gaaagagcca	ccctctcttg	cagagcaagt	gaaaatgttt	acagctactt	agcctgggtac	180
caacagaaac	ctggccaggc	tcctaggctc	ctcatctatt	ttgcaaaaac	cttagccgaa	240
ggaattccag	ccaggttcag	tggcagtgga	tcogggacag	acttcactct	caccatcagc	300
agcctagagc	ctgaagattt	tgcagtttat	tactgtcaac	atcattccga	taatccgtgg	360
acattcggcc	aagggaccac	ggcggaaatc	aaaggtggcg	gtggtcggg	cgggtgggtga	420
tctggaggag	gtgggaccgg	tgaggtgcag	ctggtgcagt	ctggagcaga	ggcgaaaaag	480
cccgagaggt	ctctgaagat	ttcctgtaag	ggatccgggt	actcattcac	tggtctaacat	540
atgaactggg	tgccgcagat	gccccggaaa	ggcctcgagt	ggatgggcaa	tattgatcct	600
tattatggtg	gtactaccta	caaccggaag	ttcaagggcc	aggtcactat	ctccgcccag	660
aagtccatca	gcacgccttc	cctgcaatgg	agcagcctga	aggcctcgga	caccgccatg	720
tattactgtg	cacgttcagt	cggcccttcc	gactcctggg	gccagggcac	cctggtcact	780
gtctctcttg	atcaggagcc	caaatcttct	gacaaaactc	acacatctcc	accgtgcccc	840
gcacctgaac	tcctgggtgg	accgtcagtc	ttcctcttcc	ccccaaaacc	caaggacacc	900
ctcatgatct	cccggaaccc	tgaggtcaca	tgcgtgggtg	tggacgtgag	ccacgaagac	960
cctgaggtca	agttcaactg	gtacgtggac	ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	1020
cgcggggagg	agcagtacaa	cagcacgtac	cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	1080
caggactggc	tgaatggcaa	ggagtacaag	tgcaaggtct	ccaacaaagc	cctccragcc	1140
cccctcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	gggcagcccc	gagaaccaca	ggtgtacacc	1200
ctgcccccat	cccgggatga	gctgaccaa	aaccaggtca	gcctgacctg	cctgggtcaa	1260
ggcttctatc	caagcgacat	cgcctgggag	tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	1320
tacaagacca	cgcctcccg	gctggactcc	gacggctcct	tcttctctca	cagcaagctc	1380
*						1381

<210> 52
 <211> 493
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 52

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20 25 30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50 55 60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
100 105 110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly Glu
130 135 140

Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu Ser
145 150 155 160

Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Asn
165 170 175

Met Asn Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met Gly
180 185 190

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Arg Lys Phe Lys
195 200 205

Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu
210 215 220

Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala
 225 230 235 240
 Arg Ser Val Gly Pro Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 245 250 255
 Val Ser Ser Asp Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser
 260 265 270
 Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 275 280 285
 Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 290 295 300
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 305 310 315 320
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 325 330 335
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 340 345 350
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 355 360 365
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 370 375 380
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 385 390 395 400
 Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 405 410 415
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 420 425 430
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 435 440 445
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 450 455 460
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 465 470 475 480

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
485 490

<210> 53
<211> 356
<212> ADN
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 53

```

gctagcgagg tgcagctggt gcagtcctga gcagaggtga aaaagccccg agagtcctctg      60
aagatttccct gtaagggtac cggttactca ttractggct acaatatgaa ctgggtgogc      120
cagatgcccg ggaagggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tggtagtaact      180
acctacaccc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc      240
gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccc ccatgtatta ctgtgogogc      300
tcagtcggcc ettttgaccc ctggggccaa ggcacctggy tcactgtctc ctogag      356

```

<210> 54
<211> 143
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 54

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
 1 5 10 15
 Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
 20 25 30
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
 50 55 60
 Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
 65 70 75 80
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
 100 105 110
 Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
 115 120 125
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
 130 135 140

<210> 55

<211> 356

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 55

gctagcgagg tgcagctggt gcagctctga gcagaggtga aaagcccg agagtctctg 60
 aagatttctt gtaagggatc eggttactca ttcaactggct acaatatgaa ctgggtgcgc 120
 cagatgcccg ggaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atcettatta tgggtgtact 180
 acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctcgg ccgacaagtc catcagcacc 240
 gcctacctgc aatggagcag cctgaaggcc tcggacaccg ccattgtatta ctgtgcgcgc 300
 tcagtcggcc attttcagca ctggggccaa ggcacccctg tcaactgtctc ctgcag 356

<210> 56

<211> 143

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 56

```
Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1      5      10      15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20     25     30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35     40     45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50     55     60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65     70     75     80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85     90     95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
100    105    110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115    120    125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130    135    140
```

<210> 57

<211> 356

<212> ADN

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 57

```
gctagcgagg tgcagctggt gcagctctga gcagaggtga aaaagccccg agagtctctg      60
aagatttccct gtaagggatc cggttactca ttbaetggct acaatatgaa ctgggtgcgc      120
cagatgcccc ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tgggtggtact      180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc      240
gctaactgc aatggagcag cctgaaggcc tgggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc      300
tcagtgggct cttttgacgt ctggggccaa ggcaccatgg taactgtctc ctgcag      356
```

<210> 58
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 58

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
          20          25          30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
          35          40          45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50          55          60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65          70          75          80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
          85          90          95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
          100          105          110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
          115          120          125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130          135          140
  
```

<210> 59
 <211> 356
 <212> ADN
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 59

```

gctagcgagg tgcagctggt gcagtcctga gcagaggtga aaaagcccg agagtctctg      60
aagatttact gtaaggggatc cggttactca ttcactggct acaatatgaa ctgggtgcgc      120
cagatgcctc ggaaaggcct ggagtggatg ggcaatattg atccttatta tgggtgtact      180
acctacaacc ggaagttcaa gggccaggtc actatctccg ccgacaagtc catcagcacc      240
gcctactctg aatggagcag cctgaaggcc tgggacaccg ccatgtatta ctgtgcgcgc      300
tcagtcggcc cttttgacat ctggggccaa ggcaccatgg tcactgtctc ctgcag      360

```

<210> 60
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 60

```

Met Glu Ala Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro
1          5          10          15

Asp Thr Thr Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser
20          25          30

Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35          40          45

Val Tyr Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro
50          55          60

Arg Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Ile Pro Ala
65          70          75          80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85          90          95

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His His Ser
100         105         110

Asp Asn Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gly
115         120         125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr Gly
130         135         140

```

<210> 61
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>

<223> TRU-016 humanizado
<400> 61

Arg Ala Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 62

Arg Thr Ser Glu Asn Val Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 63
<211> 5
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 63

Gly Tyr Asn Met Asn
1 5

<210> 64
<211> 7
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 64

Phe Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 65
<211> 18
<212> PRT
<213> Sequência artificial
<220>
<223> TRU-016 humanizado
<400> 65

Asn	Ile	Asp	Pro	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Arg	Lys	Phe
1				5					10				15	

Lys Gly

<210> 66
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 66

Gln	His	His	Ser	Asp	Asn	Pro	Trp	Thr
1				5				

<210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 67

Ser	Val	Gly	Pro	Phe	Asp	Tyr
1				5		

<210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 68

Ser	Val	Gly	Pro	Phe	Asp	Ser
1				5		

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 69

Ser Val Gly Pro Met Asp Tyr
 1 5

<210> 70
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 70

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 71
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 71

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr
 20 25 30

<210> 72
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 72

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 73
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado

<400> 73

Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly
1				5					10				

<210> 74

<211> 32

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 74

Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 75

<211> 32

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 75

Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Leu	Gln
1				5					10					15	

Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
			20					25					30		

<210> 76

<211> 10

<212> PRT

<213> Sequência artificial

<220>

<223> TRU-016 humanizado

<400> 76

	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
	1				5					10

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 77

	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	1				5					10	

<210> 78
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência artificial
 <220>
 <223> TRU-016 humanizado
 <400> 78

	Trp	Gly	Arg	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser
	1				5					10	

REIVINDICAÇÕES

1. Uma proteína de ligação específica à CD37 humanizados para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune, em que a proteína de ligação específica à CD37 humanizado compreende:

(a) regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 64 e uma cadeia leve de CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 ; e

(b) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, uma cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 e uma cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ou 68 caracterizado pelo facto de o CD - 37 da proteína de ligação específica humanizada é para ser utilizada em combinação com uma CD20 - proteína de ligação específica.

2. Uma proteína de ligação específica à CD20 para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune caracteriza-se pelo facto a proteína de ligação específica à CD20 é para ser utilizado em combinação com uma proteína de ligação específica à CD37 humanizado para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune, em que a proteína de ligação específica à CD37 humanizado compreende:

(a) regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 64 e uma cadeia leve

de CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 ; e

(b) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, uma cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 e uma cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ou 68.

3. Um artigo de fabrico que compreende uma proteína de ligação específica à CD20 e uma proteína de ligação específica à CD37 humanizado para utilização no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune, em que a proteína de ligação específica à CD37 humanizado compreende:

(a) regiões de estrutura de cadeia leve humana, uma CDR1 de cadeia leve compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 61, uma CDR2 de cadeia leve compreendendo uma sequência de amino ácido de SEQ ID NO: 64 e uma cadeia leve de CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 66 ; e

(b) regiões de estrutura de cadeia pesada humana, uma CDR1 de cadeia pesada compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 63, uma cadeia pesada CDR2 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 65 e uma cadeia pesada CDR3 compreendendo uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NO: 67 ou 68.

4. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune das reivindicações 1, 2 ou 3, em que a cadeia leve CDR1, CDR2, e CDR3 da proteína de ligação específica à CD37 humanizado consiste nas sequências de

aminoácidos de SEQ ID NOS: 61, 64 e 66, respectivamente, e em que a cadeia pesada CDR1, CDR2, e CDR3 consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 63, 65 e 67, respectivamente.

5. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune das reivindicações 1, 2 ou 3, em que a cadeia leve CDR1, CDR2, e CDR3 da proteína de ligação específica à CD37 humanizado consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 61, 64 e 66, respectivamente, e em que a cadeia pesada CDR1, CDR2, e CDR3 consiste nas sequências de aminoácidos de SEQ ID NOS: 63, 65 e 68, respectivamente

6. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo:

uma região de estrutura de cadeia leve humana selecionada a partir de SEQ ID NOS:170 - 172, 175, 179,182, 184-188, 191, 194-198, 203 e 205-210, ou

uma região de estrutura de cadeia pesada humana selecionada a partir das SEQ ID NOS: 140, 141, 143-147, 150, 151, 154-163, 168 e 169.

7. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, compreendendo:

uma primeira região de estrutura de cadeia leve humana (FR1) seleccionado a partir de SEQ ID NOS:170 - 172, 175 e 177-181; uma FR2 humana da região de estrutura de cadeia leve seleccionada a partir de SEQ ID NOS: 182, 184-188 e 191, um humano FR3 da cadeia leve seleccionada a partir de SEQ ID NOS:194 - 198, 203 e 205, e um humano FR4 da cadeia leve seleccionada a partir de SEQ ID NOS:206 - 210, ou uma primeira região de estrutura de cadeia pesada humana (FR1) seleccionado a partir de SEQ ID NOS: 140, 141 e 143-146; humano FR2 da cadeia pesada seleccionado a partir de SEQ ID NOS: 147, 150 e 151, um humano FR3 da cadeia pesada seleccionada a partir de SEQ ID NOS:154 - 160, e um humano FR4 da cadeia pesada seleccionado a partir de SEQ ID NOS:161 - 163, 168 e 169.

8. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína de ligação compreende uma cadeia simples Fv (scFv) de polipéptido, um anticorpo ou um fragmento de ligação do mesmo, ou uma proteína de fusão de imunoglobulina que compreende, a partir de amino para terminal carboxi, (i) um domínio de ligação tendo regiões variáveis leve de imunoglobulina e cadeia pesada, separadas por um péptido de ligação, (ii) uma imunoglobulina região de charneira polipéptido tendo ou zero, um ou dois resíduos de cisteína, e (iii) de imunoglobulina CH2 e CH3 domínios.

9. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de acordo com a reivindicação 8, em que a

região de charneira da imunoglobulina polipéptido pode ser uma região charneira de IgG1 polipéptido, IgGA ou IgE ou uma IgG1 mutante.

10. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de manufactura para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações 8 ou 9, em que:

a proteína de ligação é uma proteína de fusão de imunoglobulina de acordo com a reivindicação 8, que compreende uma região variável de cadeia leve e uma cadeia pesada região variável;

a região variável da cadeia leve está ligada à região variável da cadeia pesada de um péptido ligante que compreende (Gly₄SER)_n, em que n é 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 ; e as cadeias leve e pesada regiões variáveis ligadas estão ligados a um domínio efector de IgG1, através de uma articulação composta de uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 90, 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 115, 116, 118, 120, 122, 124, 126, ou 127.

11. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o humanizado Proteína de ligação específica - CD37 que compreende uma sequência de aminoácidos seleccionada a partir do grupo que consiste em SEQ ID NO: 48 e 52.

12. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a CD20 - proteína de ligação específica é um anticorpo monoclonal específico para CD20.

13. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a CD20 - anticorpo monoclonal específico é Rituximab.

14. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações 1 a 11, em que o específico do CD20 a proteína de ligação é uma proteína de fusão de imunoglobulina que é específico de CD20 e compreende, a partir de amino para carboxi regiões variáveis terminal, (i) um domínio de ligação de imunoglobulina tendo cadeias leve e pesada, separadas por um ligante péptido, (ii) um polipéptido da região de charneira de imunoglobulina tendo ou zero, um ou dois resíduos de cisteína, e (iii) imunoglobulina CH2 e do domínio CH3.

15. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de acordo com a reivindicação 14, em que a região de charneira da imunoglobulina polipéptido pode ser uma região charneira de IgG1 polipéptido, IgGA ou IgE ou uma IgG1 mutante.

16. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para usar num método de tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que o método compreende ainda a utilização de um agente quimioterapêutico, um agente radioterapêutico, uma citocina, uma quimiocina ou um factor de crescimento.

17. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a célula - B o cancro é a doença de Hodgkin, linfoma não - Hodgkin, linfoma do sistema nervoso central, linfoblástica aguda leucemia, a leucemia linfocítica crônica, leucemia de células pilosas, leucemia mioblástica crônica, mieloma múltiplo, pequeno linfoma lymphocytic, B-células de leucemia prolinfocítica, linfoma linfoplasmocitário, linfoma de zona marginal do baço, mieloma plasma celular, plasmocitoma solitário do osso, plasmocitoma extraósseo, extra-nodal marginal linfoma de células B da zona do tecido linfóide associado à mucosa, zona marginal nodal linfoma de células B, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células B, mediastino (timo) linfoma de grandes células B, intravascular linfoma de grandes células B, linfoma primário, linfoma de Burkitt/leucemia, proliferação de células B de potencial maligno incerto, granulomatose linfomatóide, ou pós-transplante doença linfoproliferativa.

18. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico

para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações 1 a 16, em que o auto-imune doença é a artrite reumatoide, esclerose múltipla, lúpus eritematoso sistémico, doença de Crohn, síndrome de Sjogren, Doença de Graves, diabetes mellitus tipo I, psoríase, púrpura trombocitopênica imunológica, pênfigo, idiopática miopatia inflamatória, myasthenis gravis, ou macroglobinemia de Waldenstorm.

19. A proteína CD37 humanizado específico da ligação ou a proteína de ligação específica - CD20 ou o artigo de fabrico para uso no tratamento de um cancro de células B ou de uma doença auto-imune de qualquer uma das reivindicações anteriores, em que a proteína de ligação específica à CD37 e a proteína de ligação específica à CD20 são administrados sequencialmente dentro de cerca de 24 horas período ou são administrados em simultâneo.

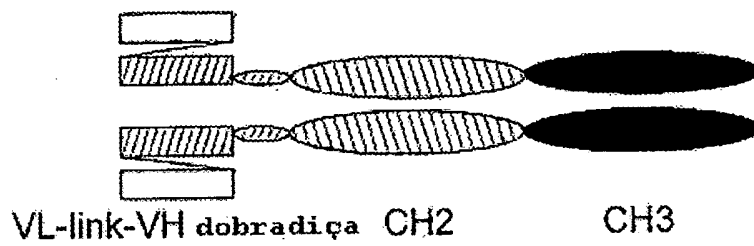


FIG. 1A

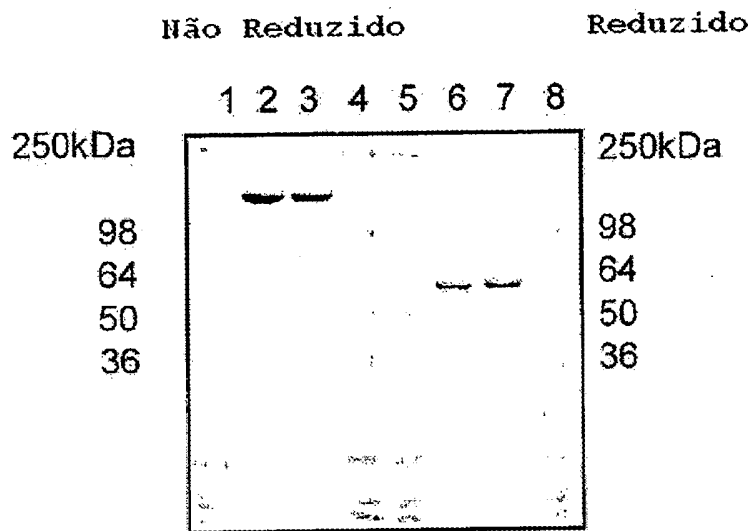


FIG. 1B

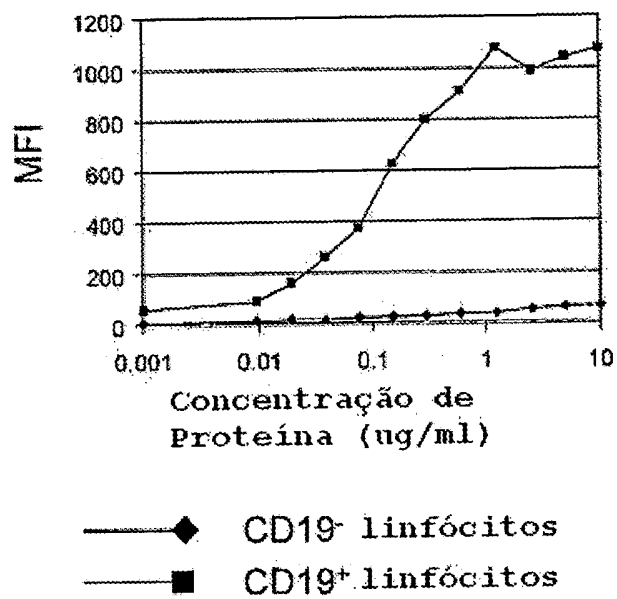


FIG. 1C

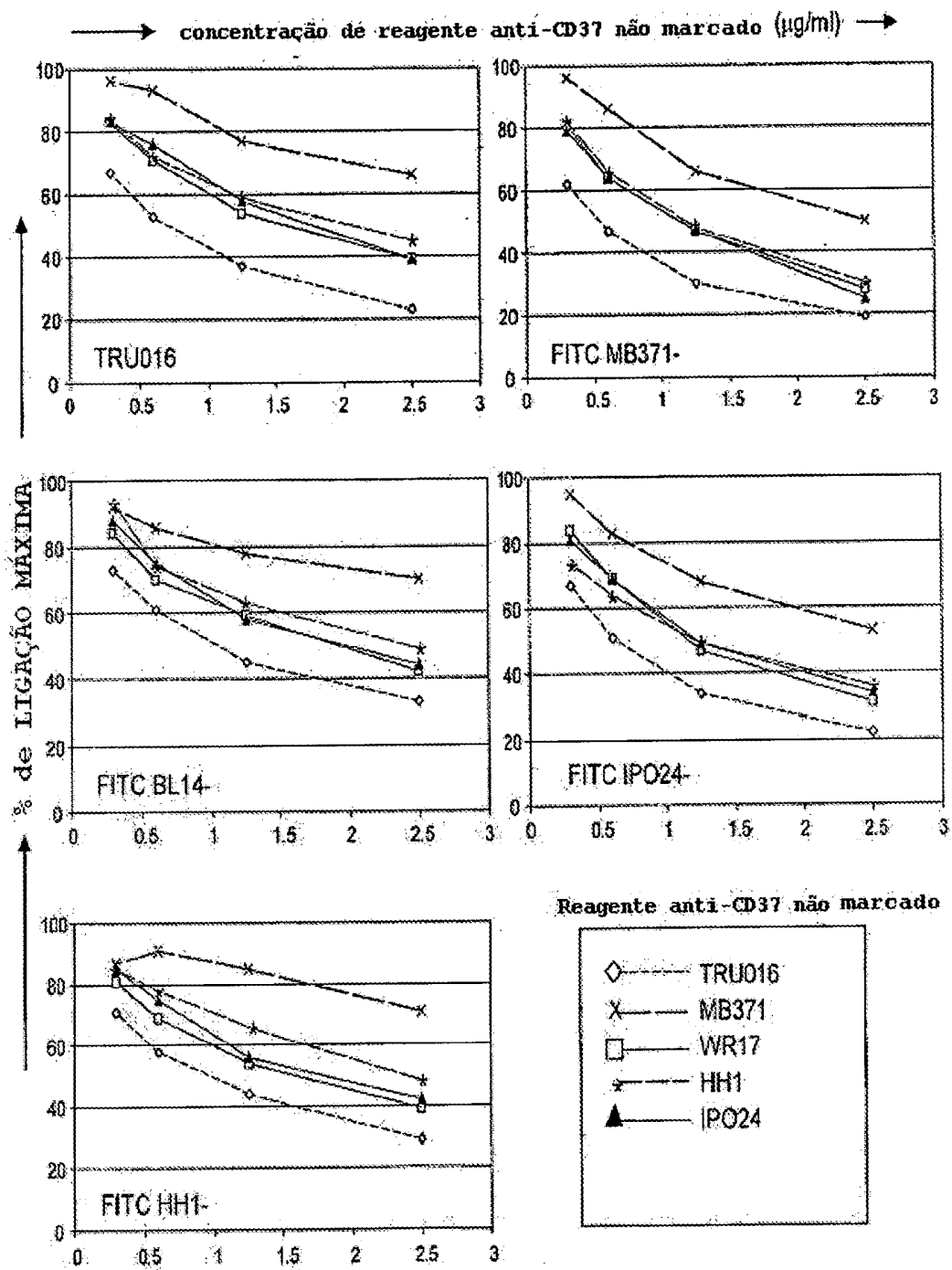


FIG. 2

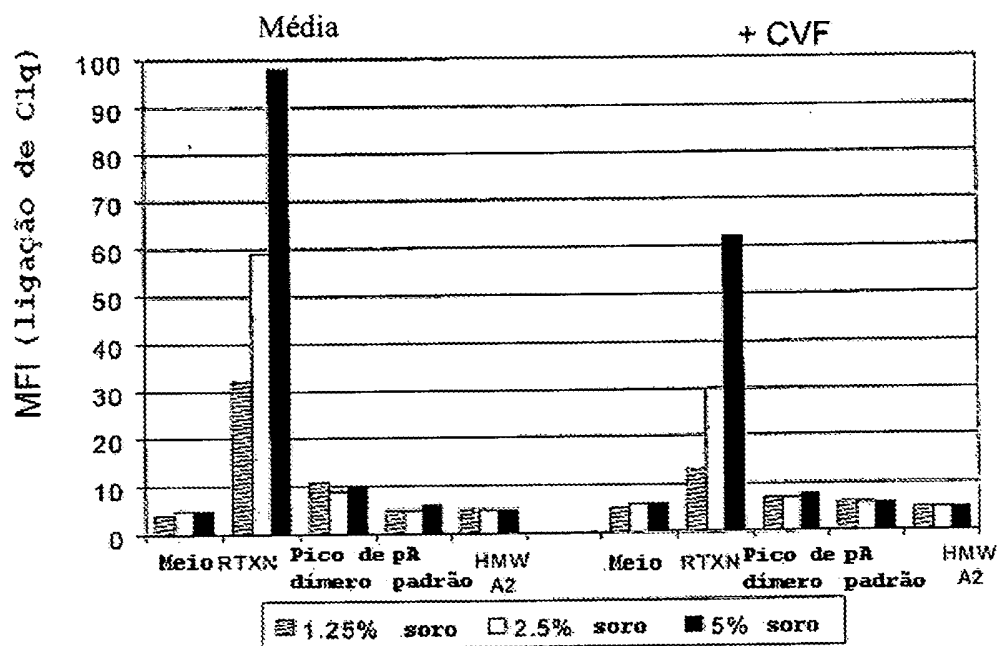


FIG. 3A

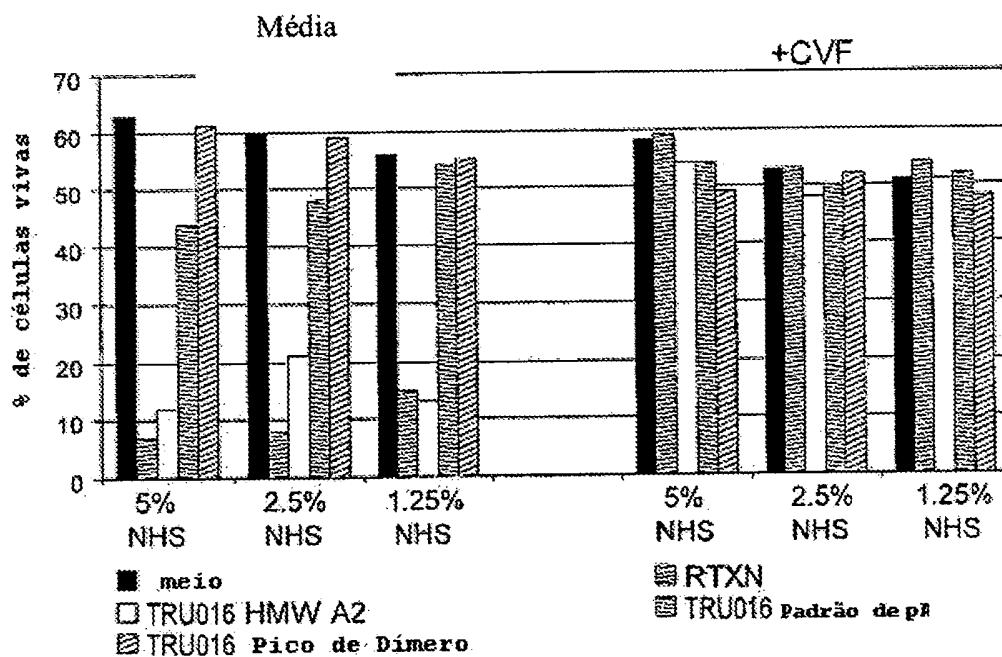


FIG. 3B

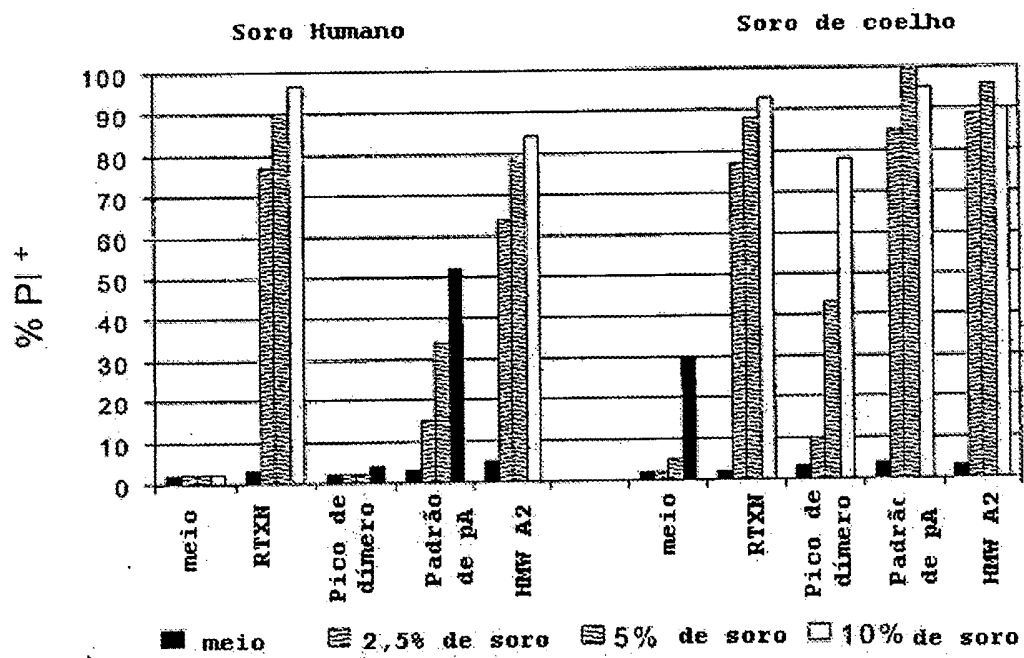


FIG. 3C

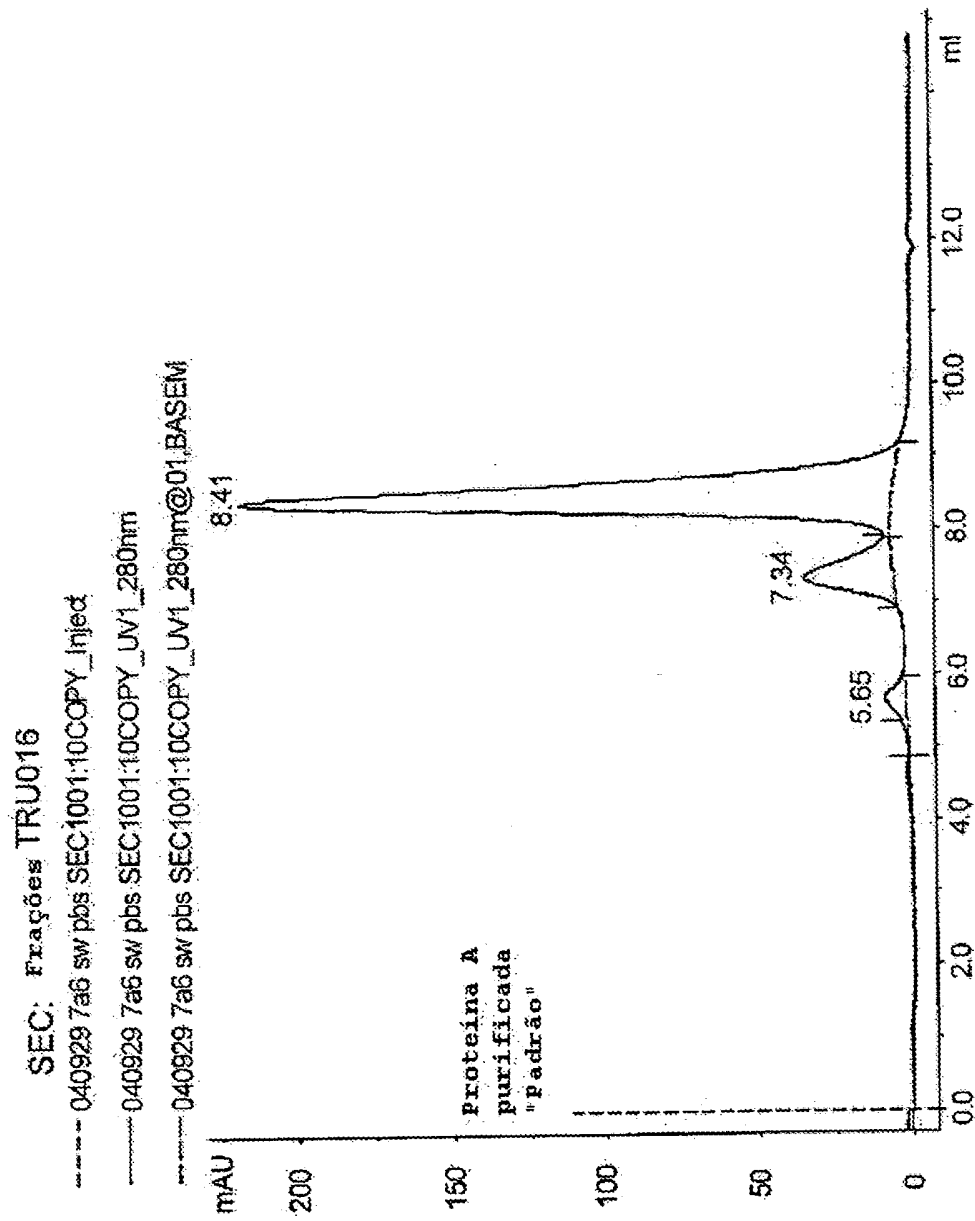


FIG. 4A

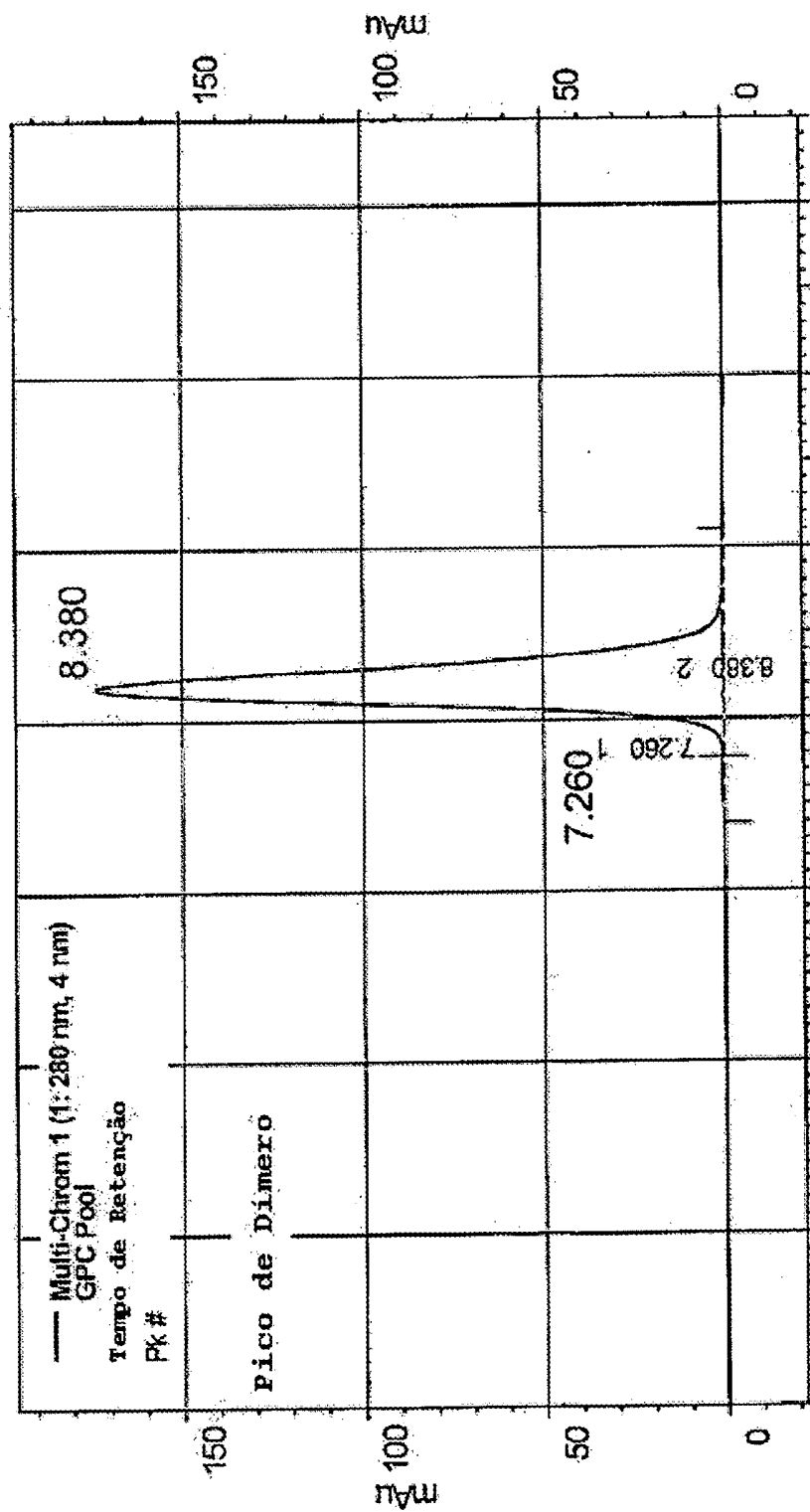


FIG. 4B

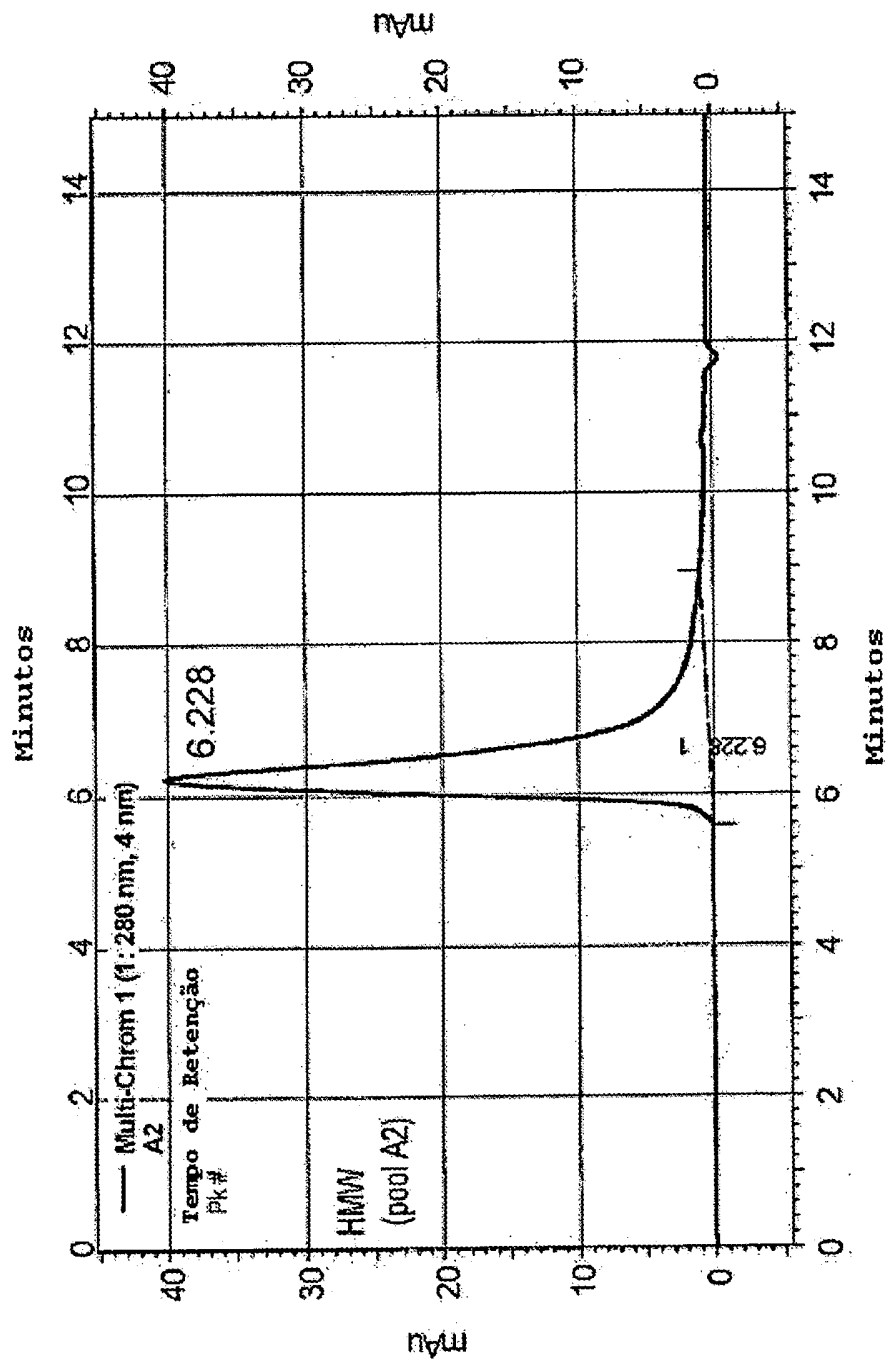


FIG. 4C

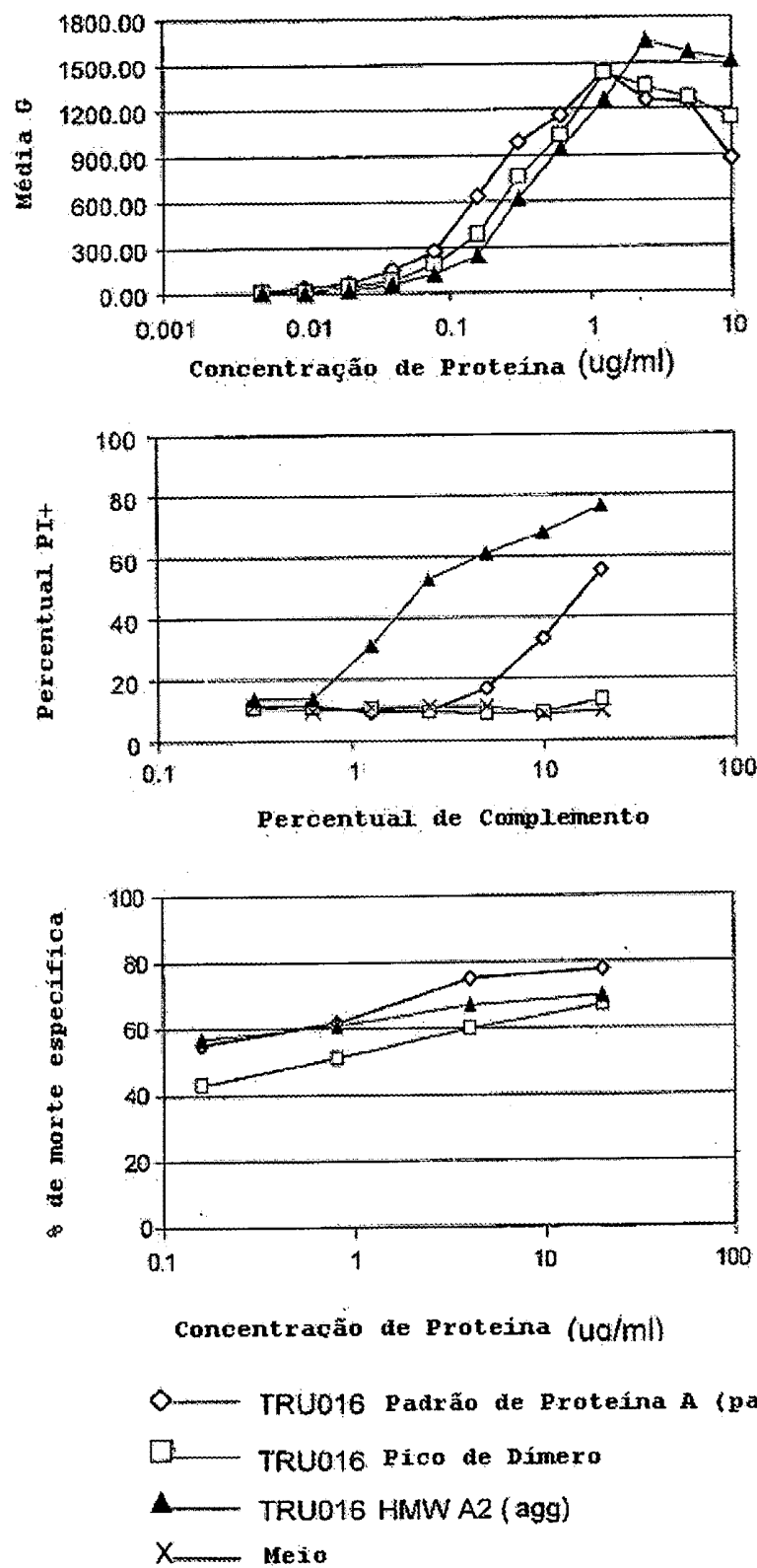


FIG. 5

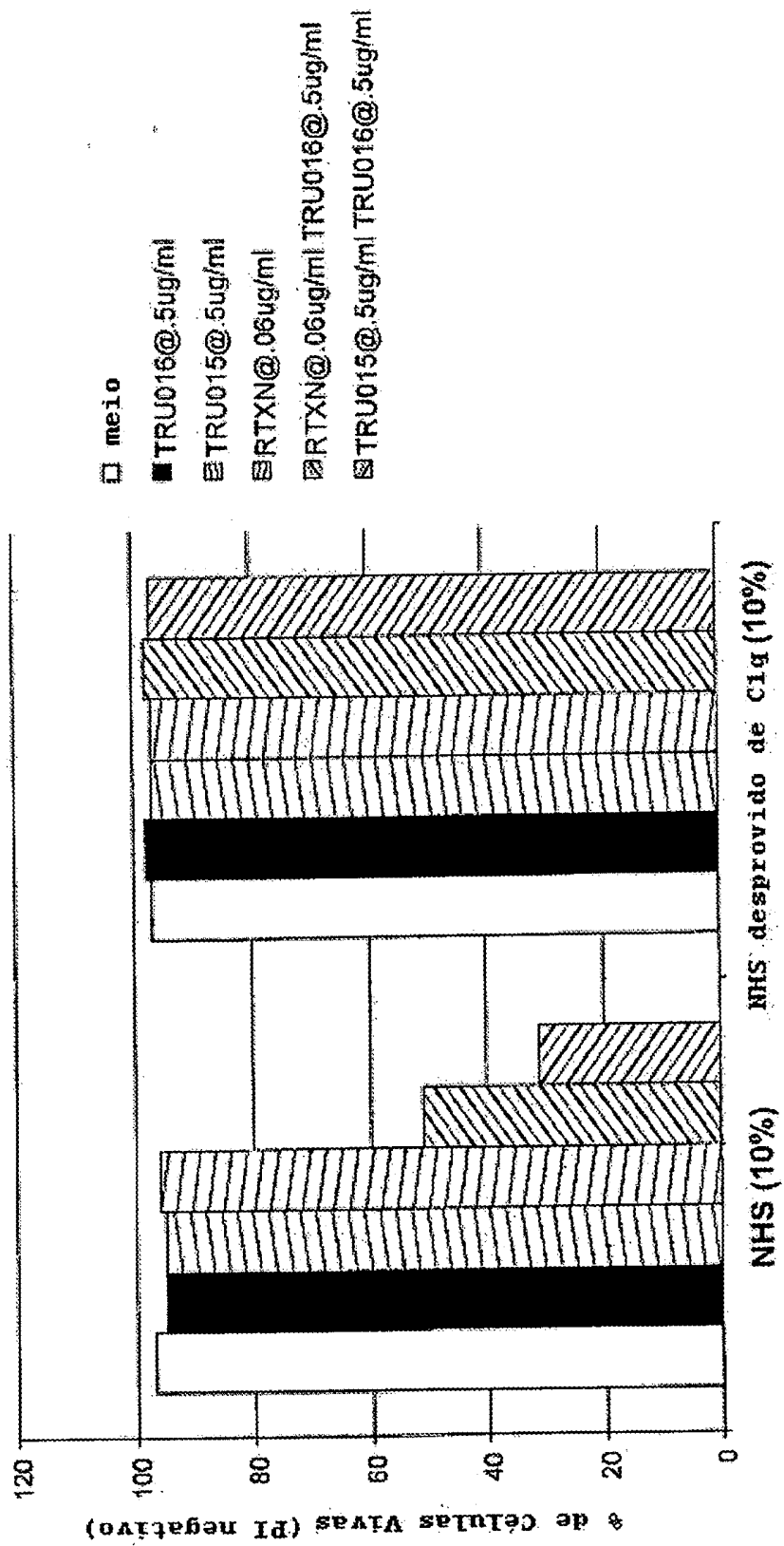


FIG. 6

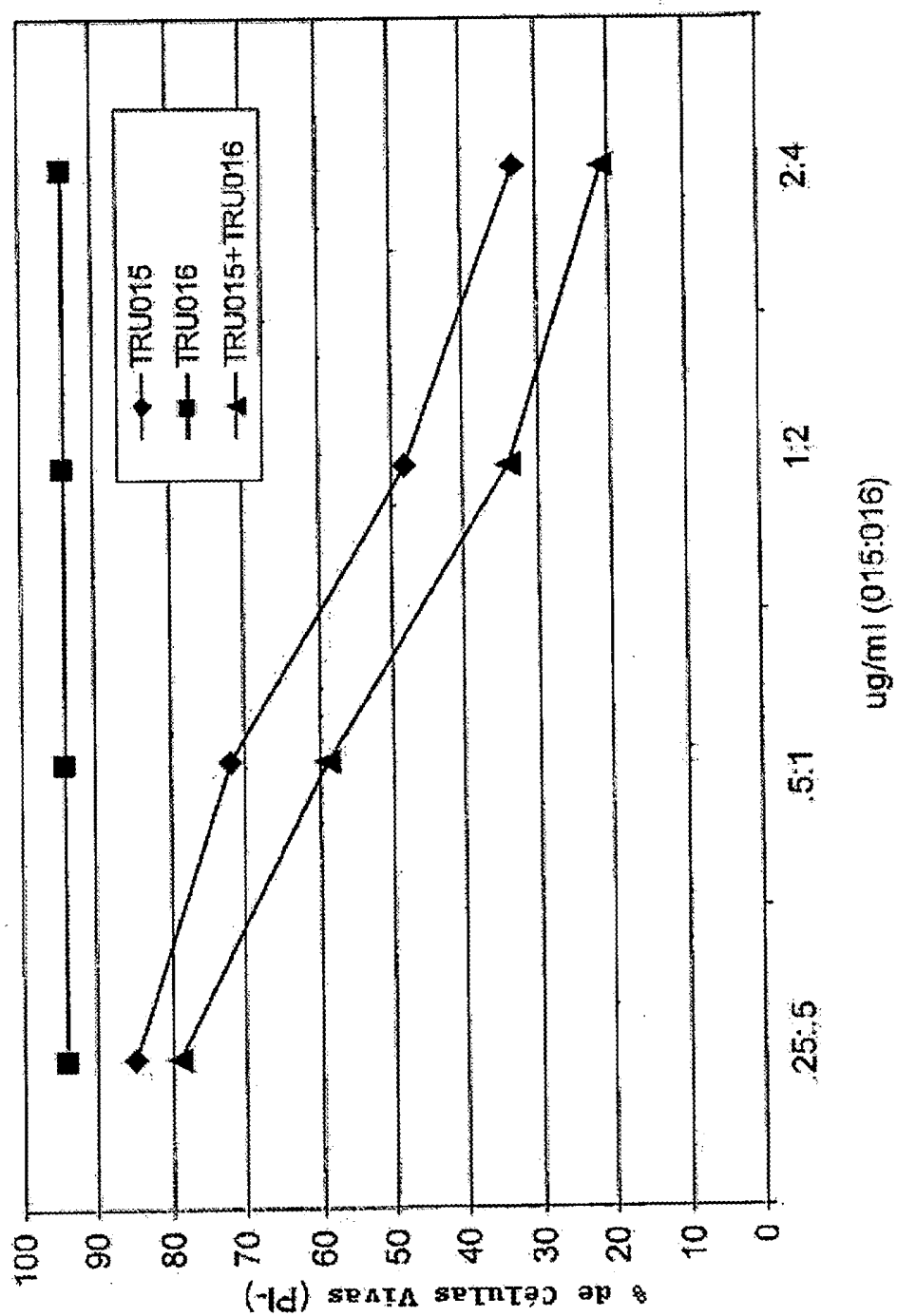


FIG. 7

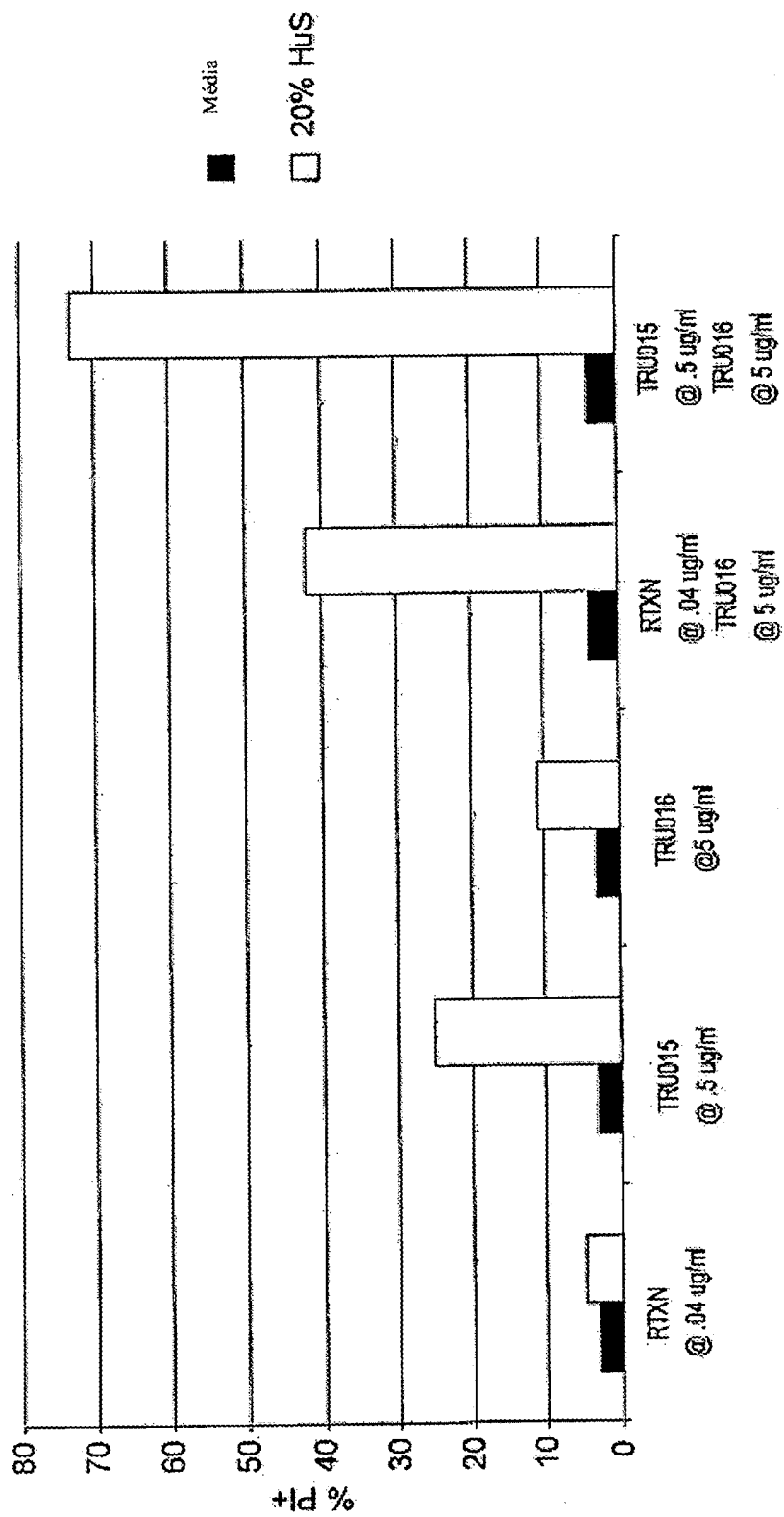


FIG. 8

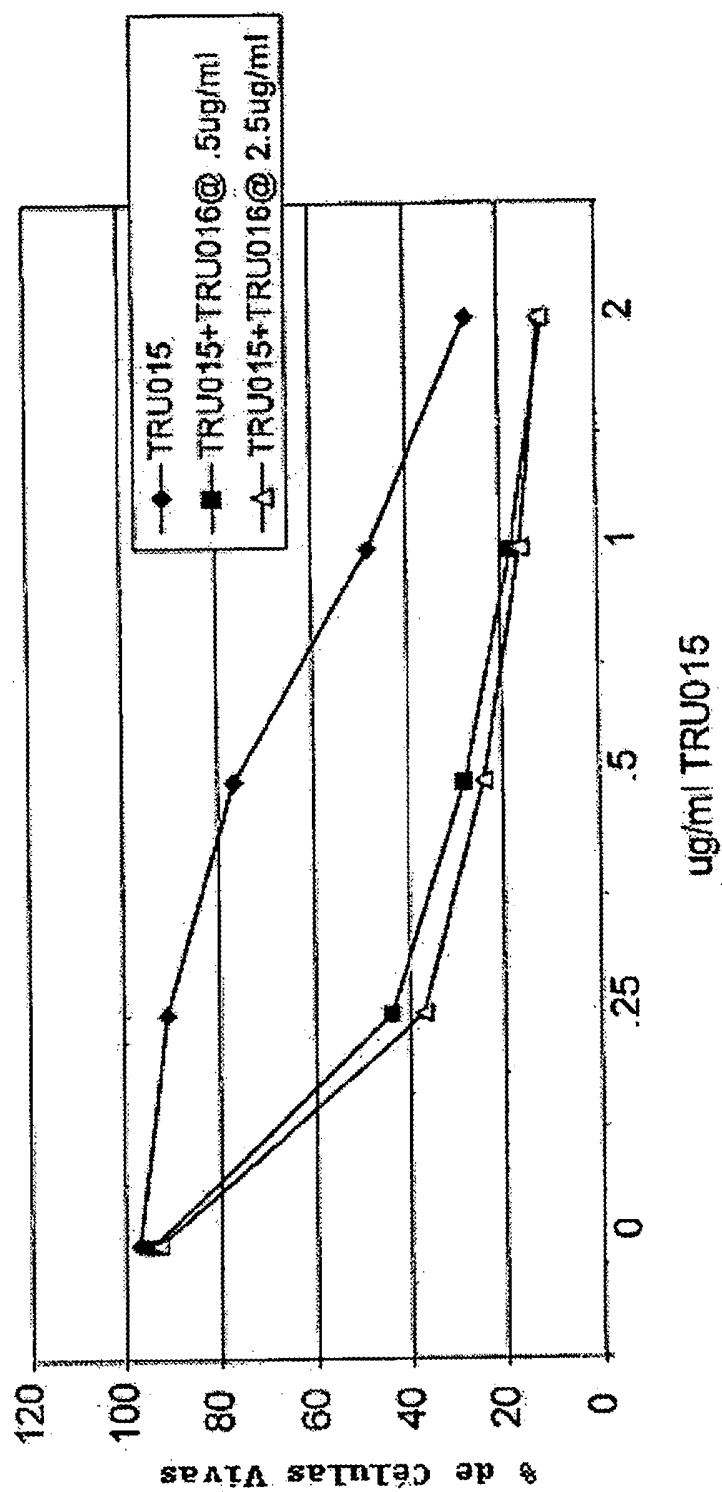


FIG. 9

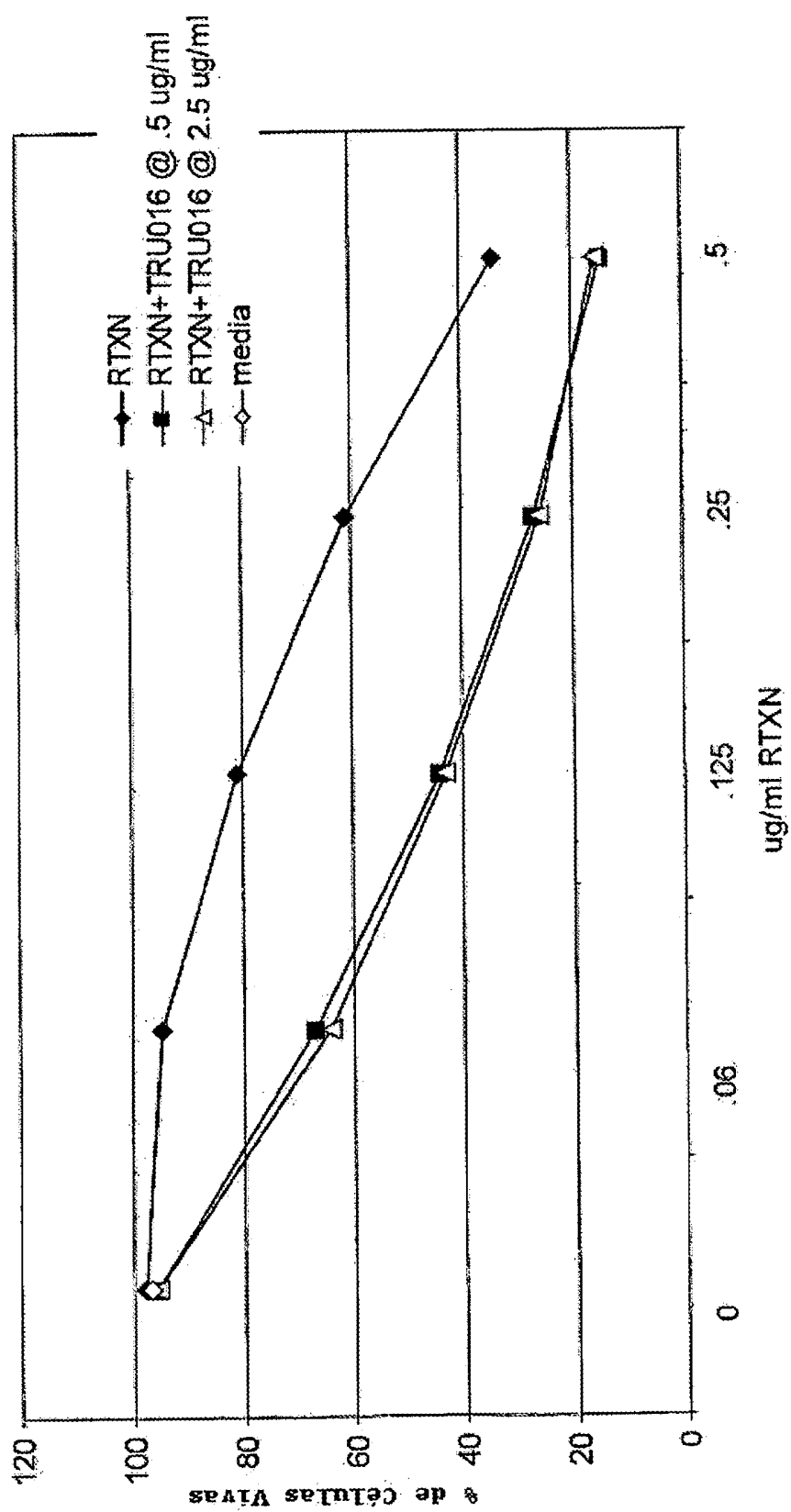


FIG. 10

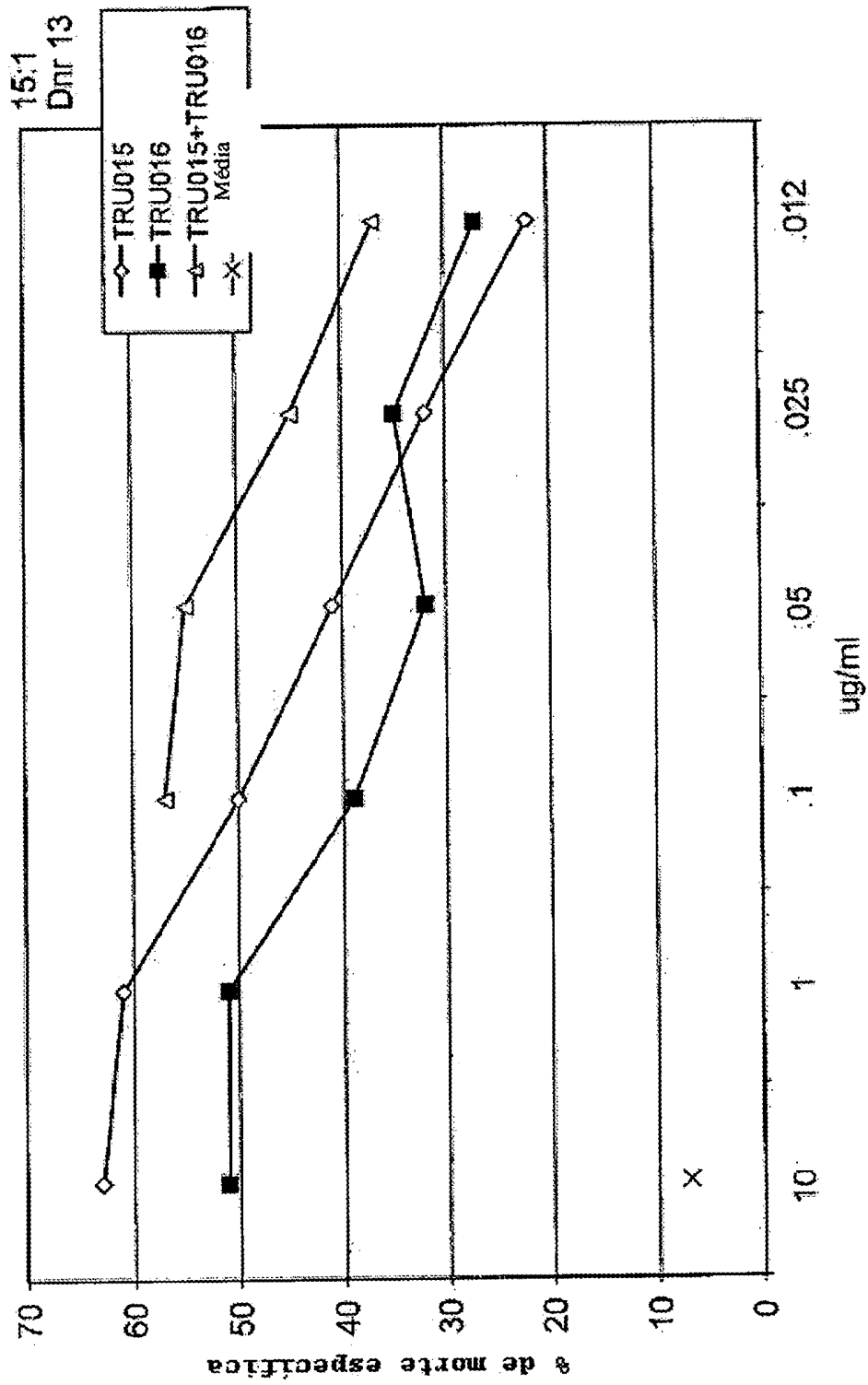


FIG. 11

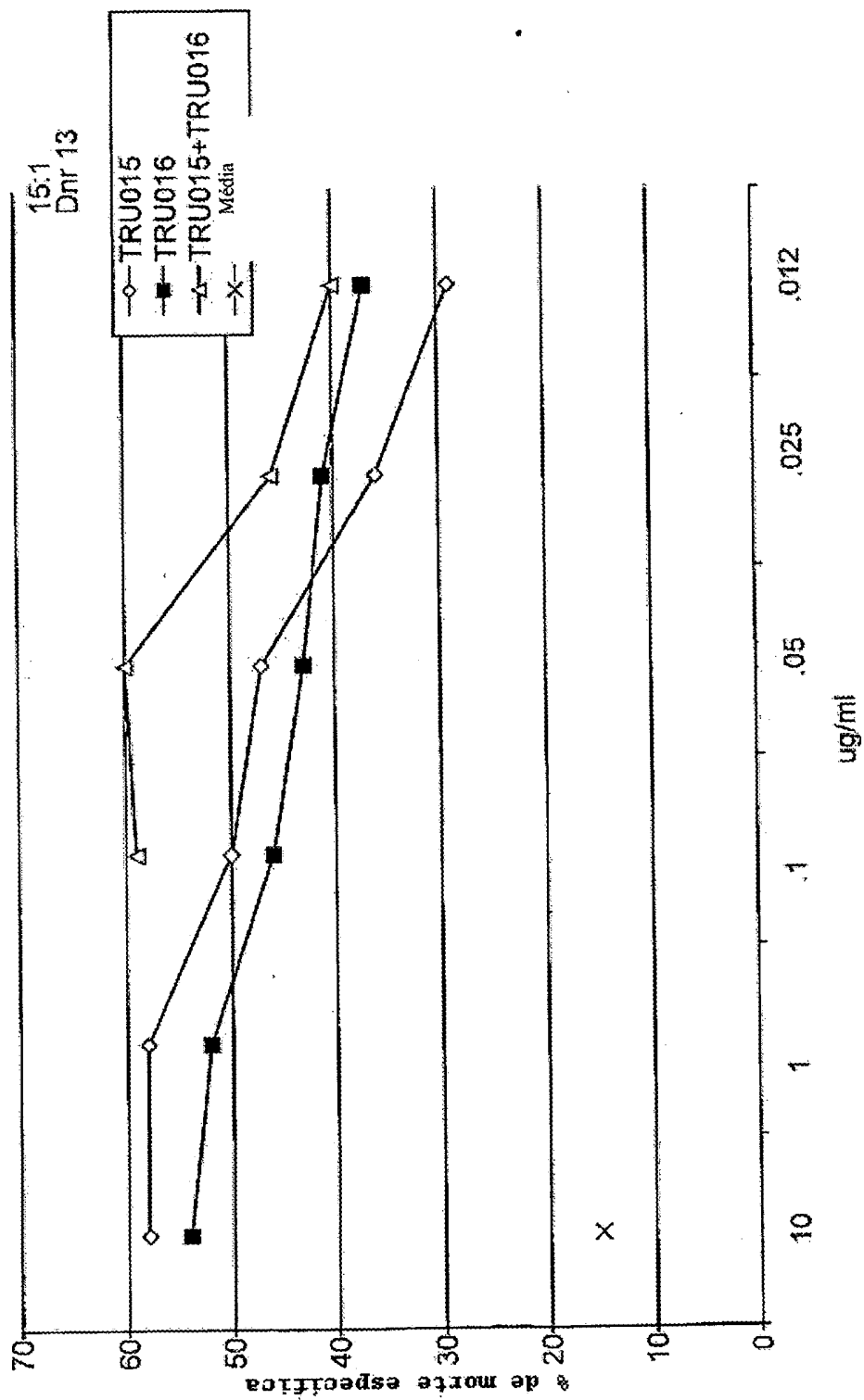


FIG. 12

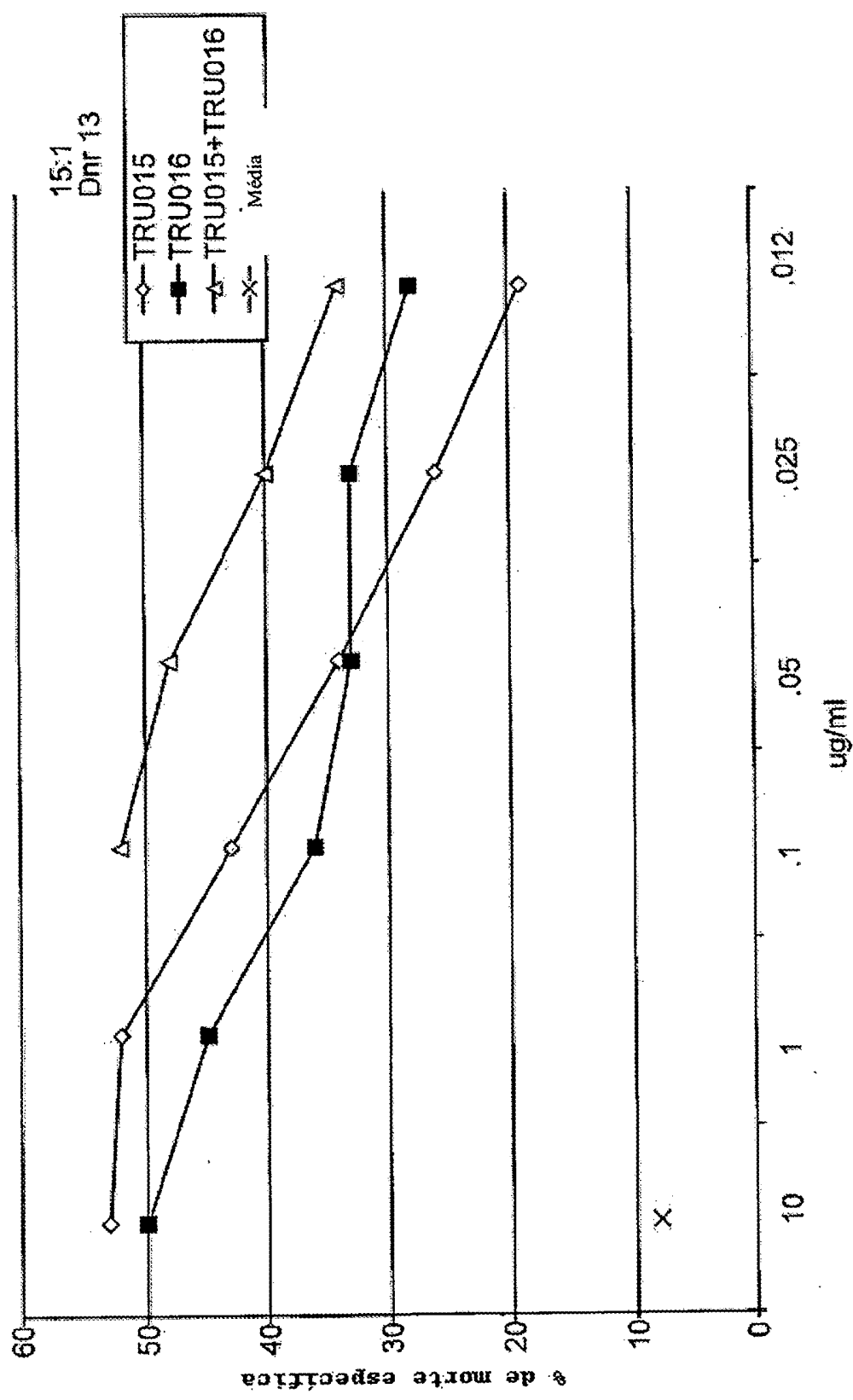


FIG. 13

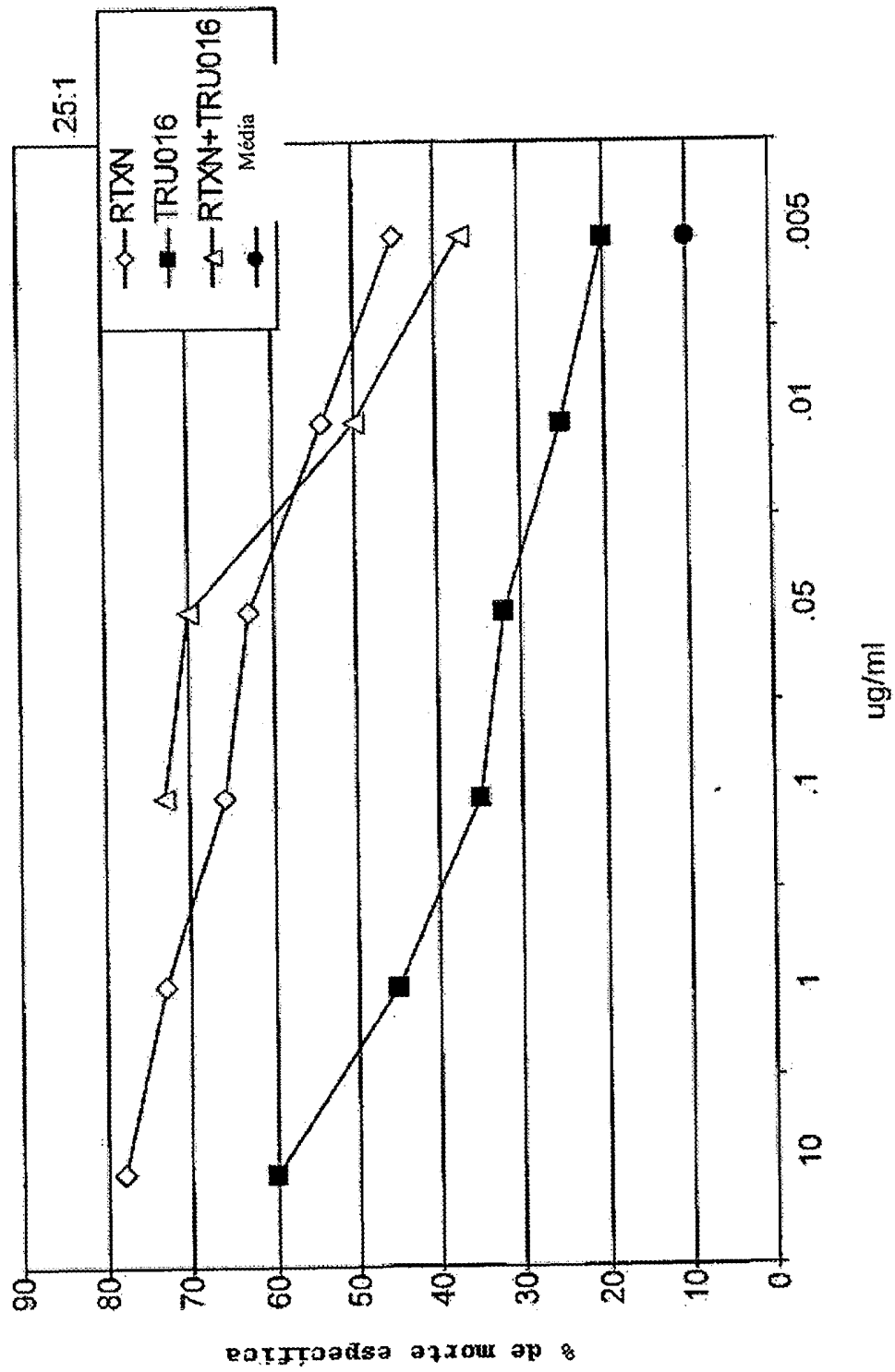


FIG. 14

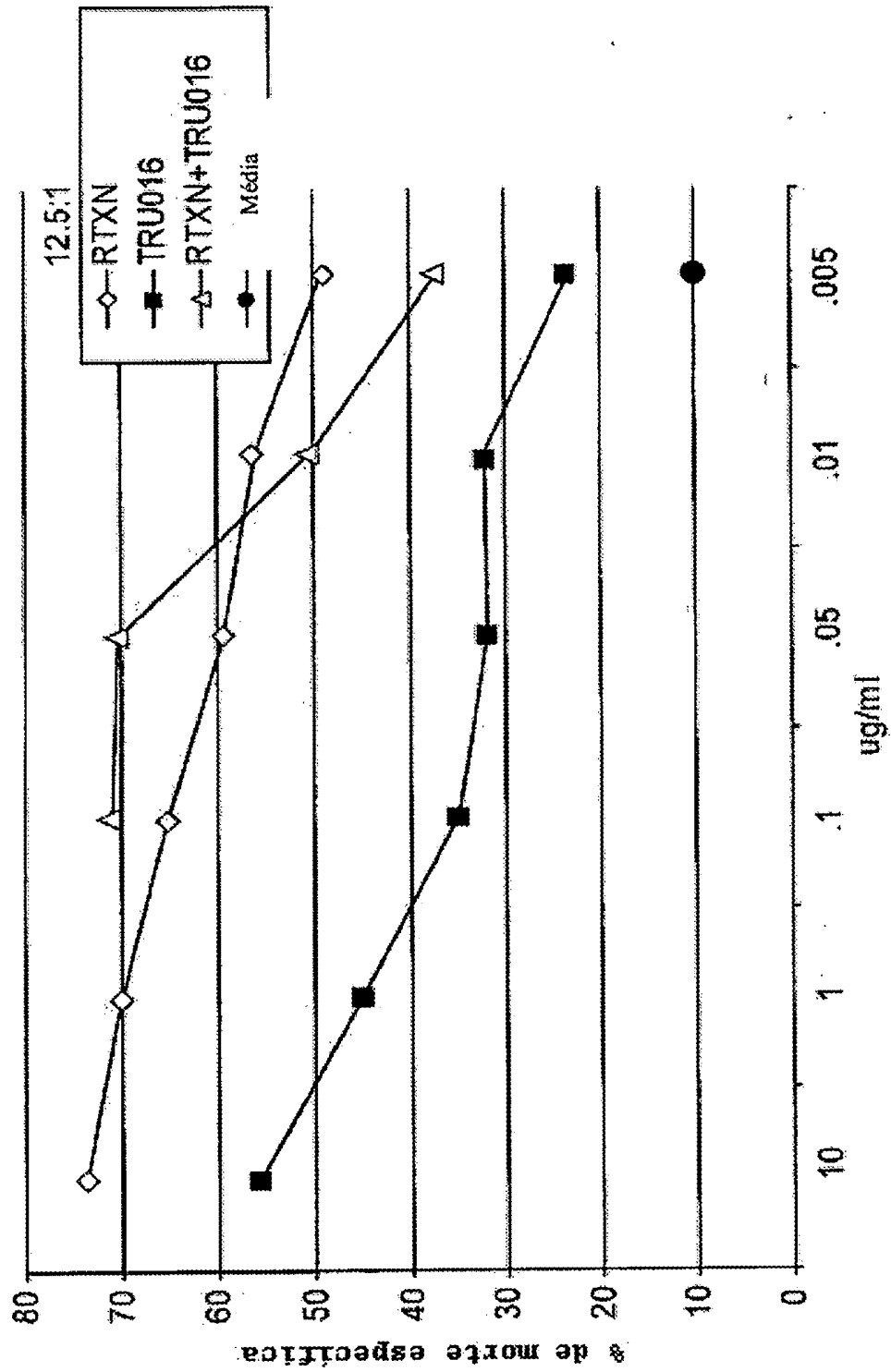


FIG. 15

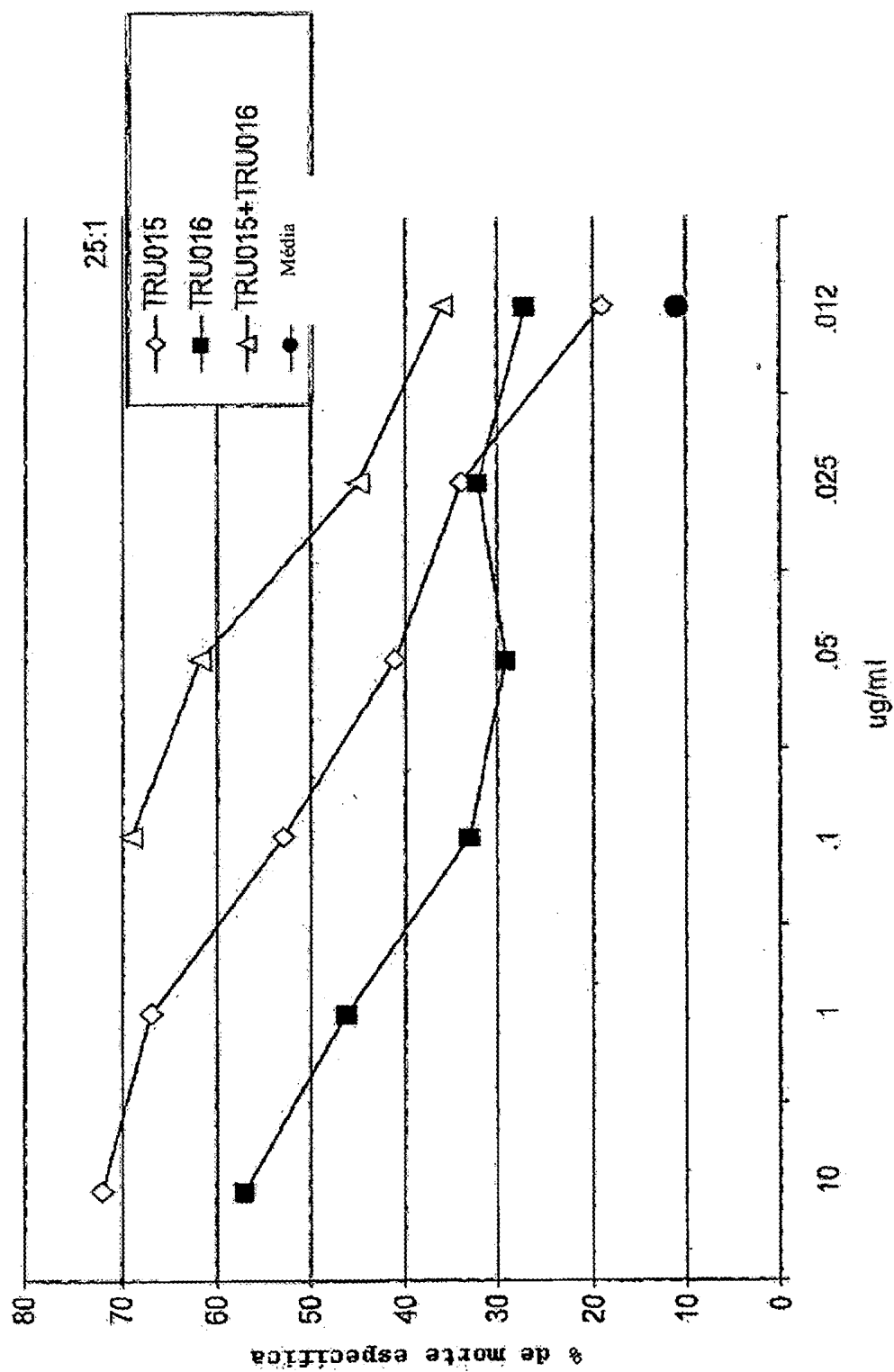


FIG. 16

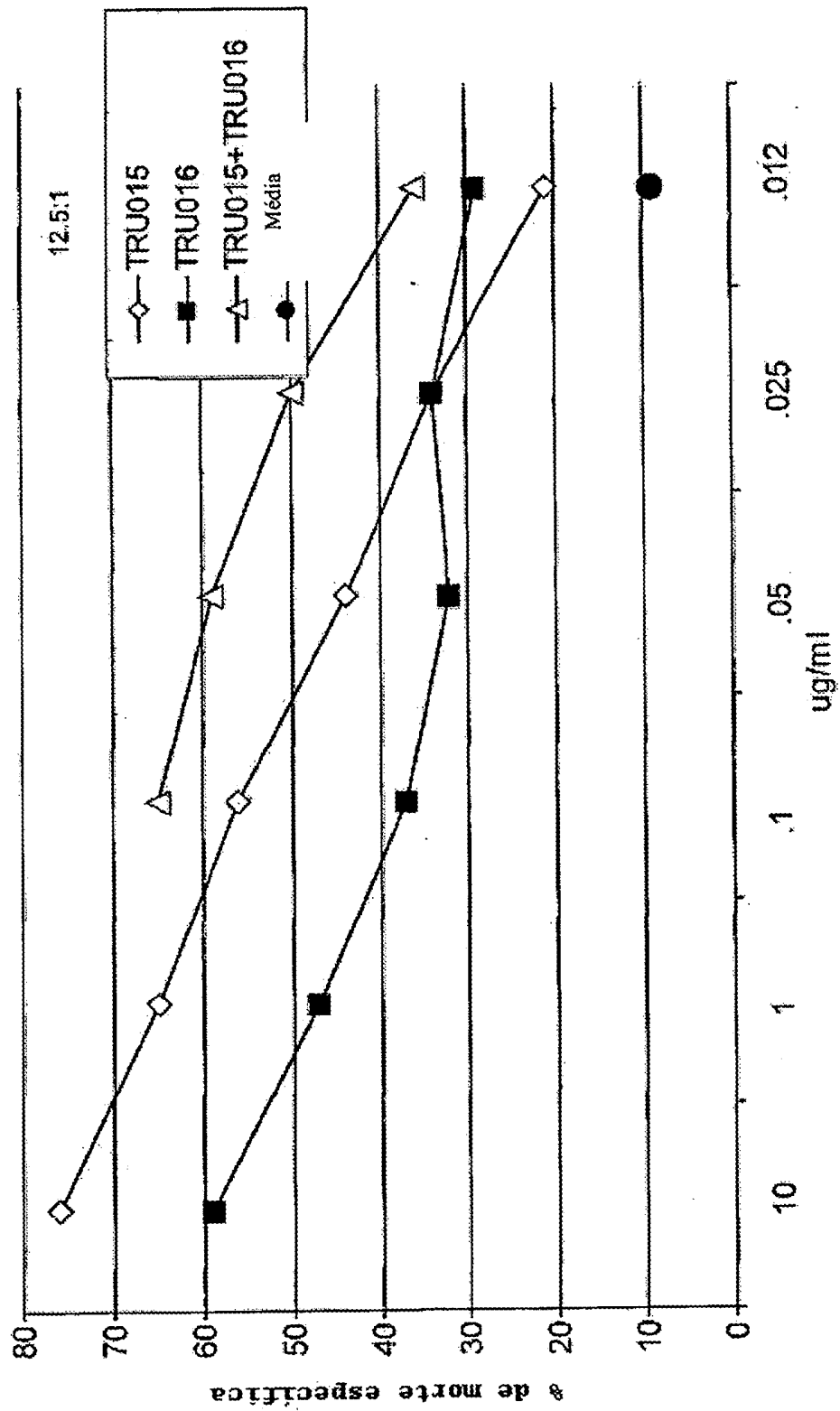
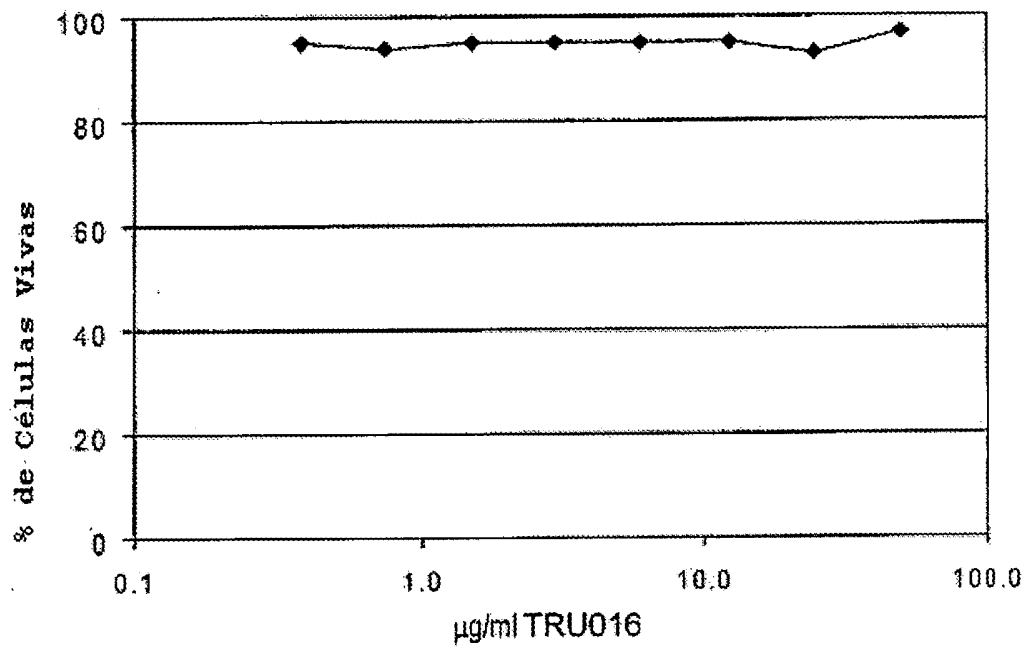
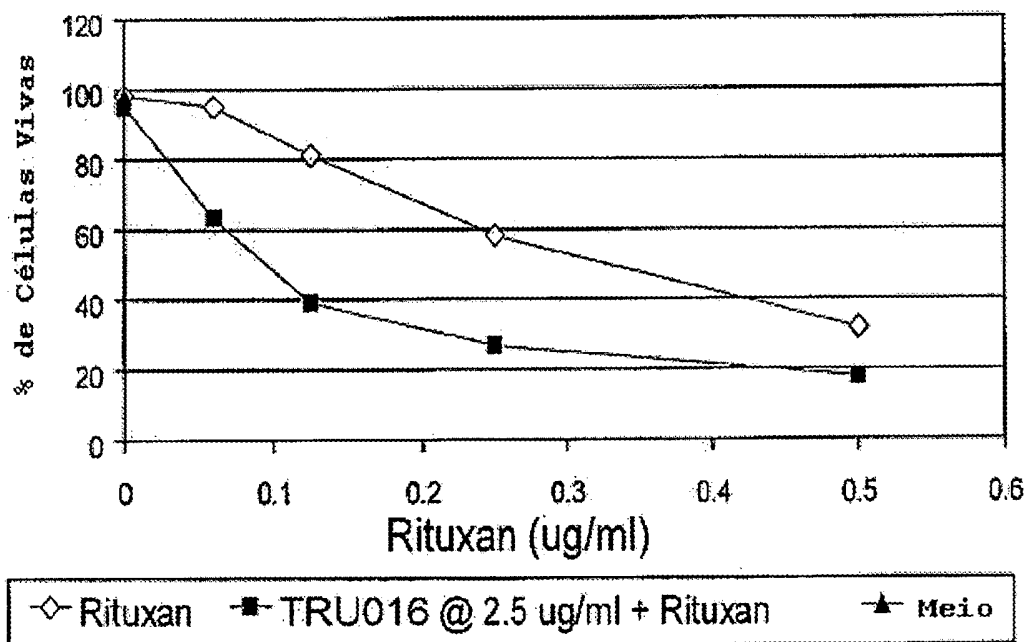


FIG. 17

**FIG. 18A****FIG. 18B**

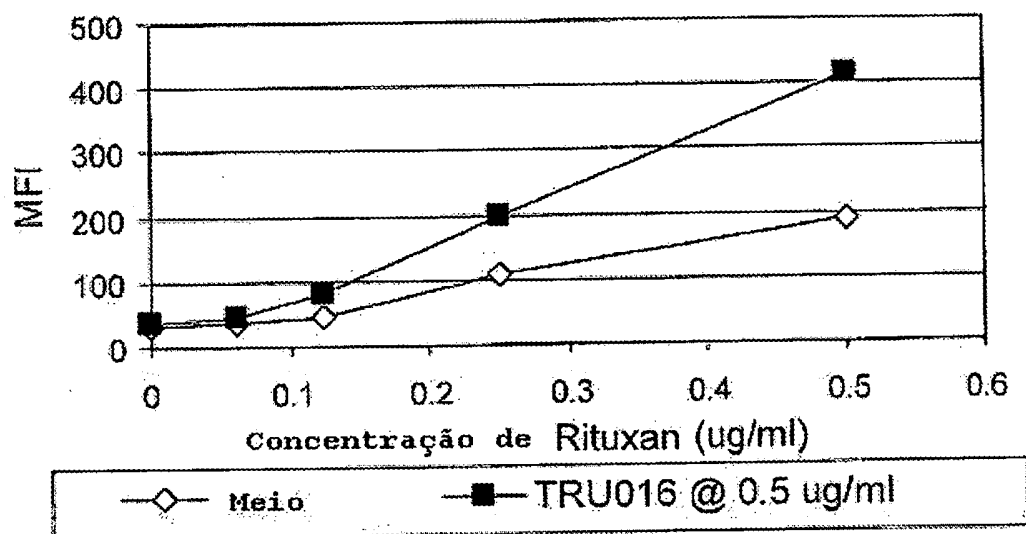


FIG. 18C

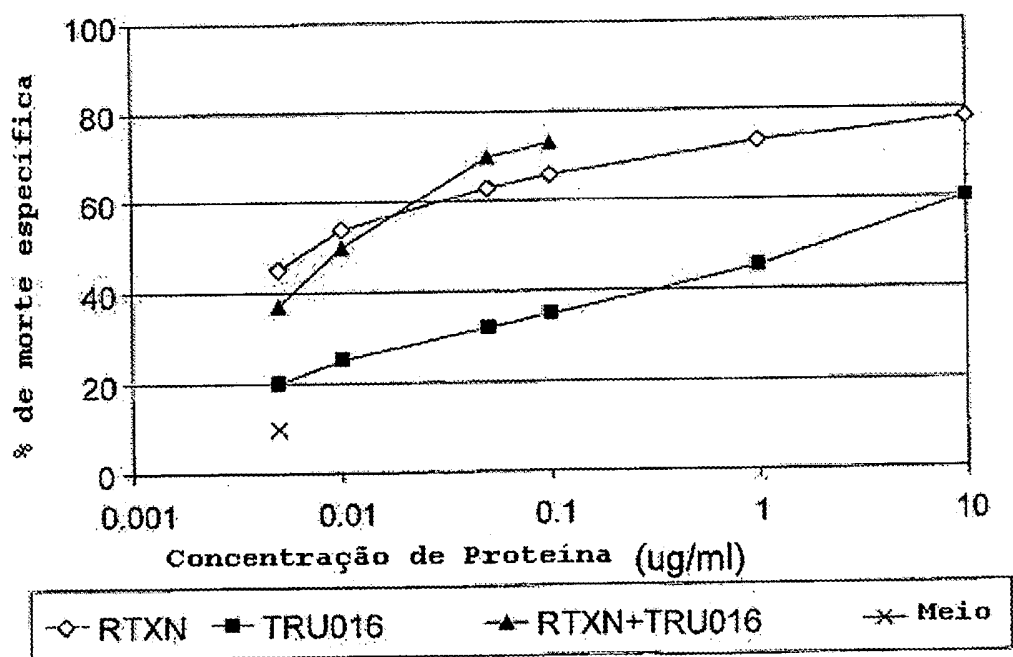


FIG. 18D

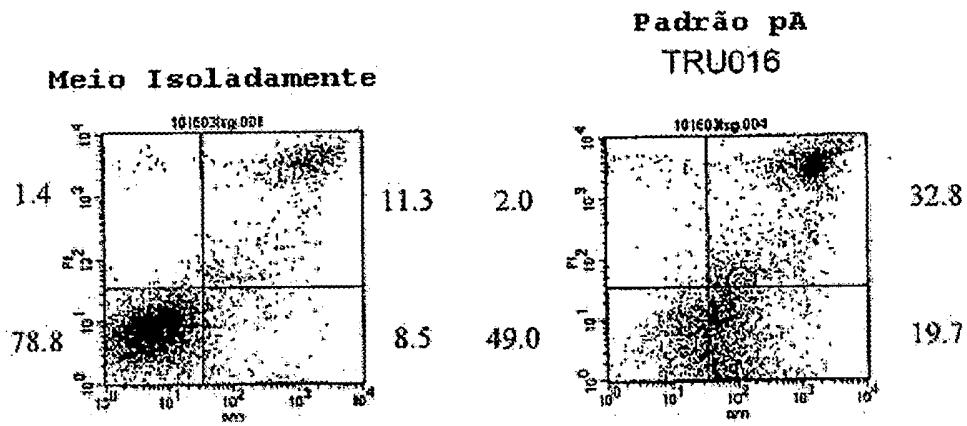


FIG. 19A

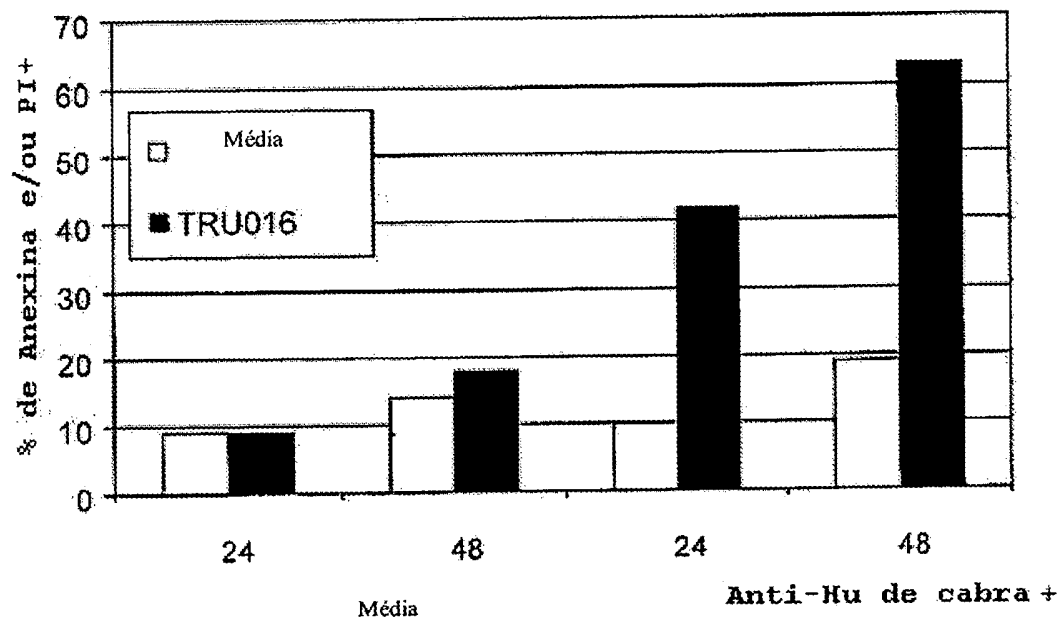


FIG. 19B

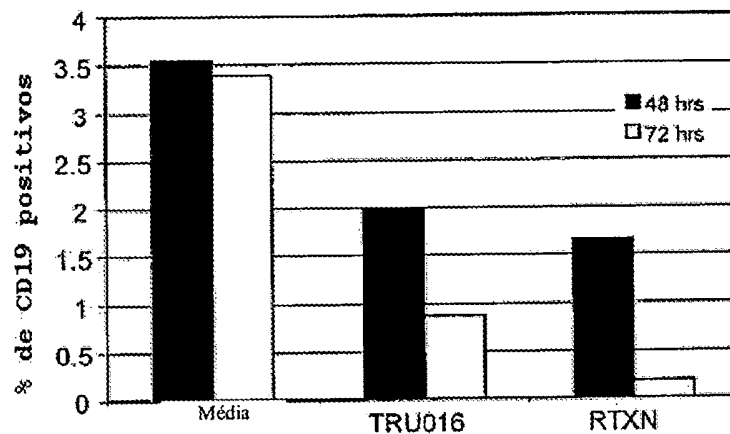


FIG. 20A

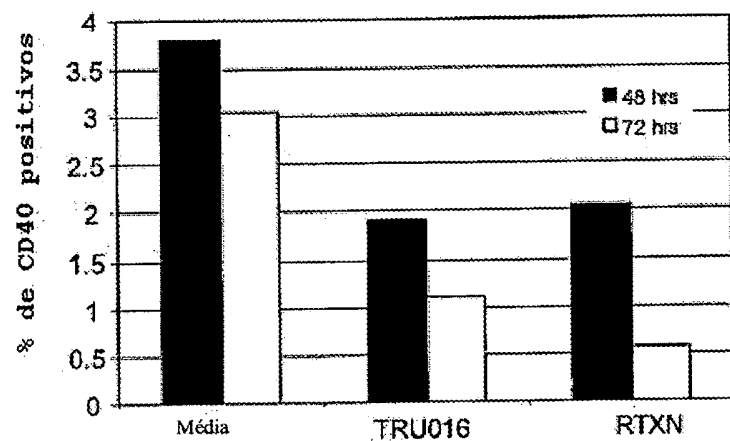


FIG. 20B

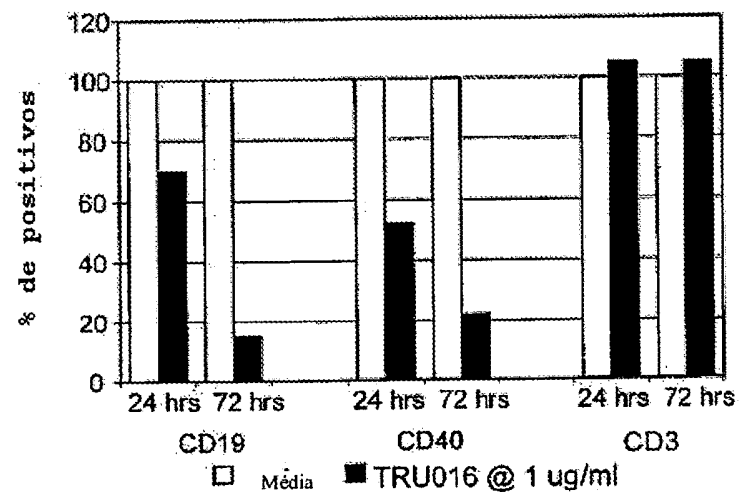


FIG. 20C

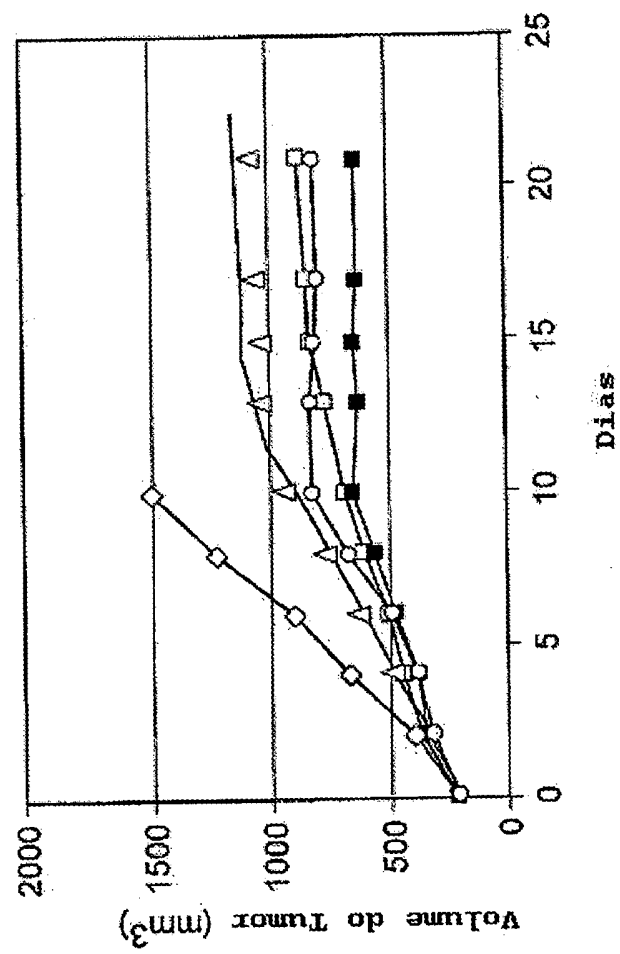


FIG. 21

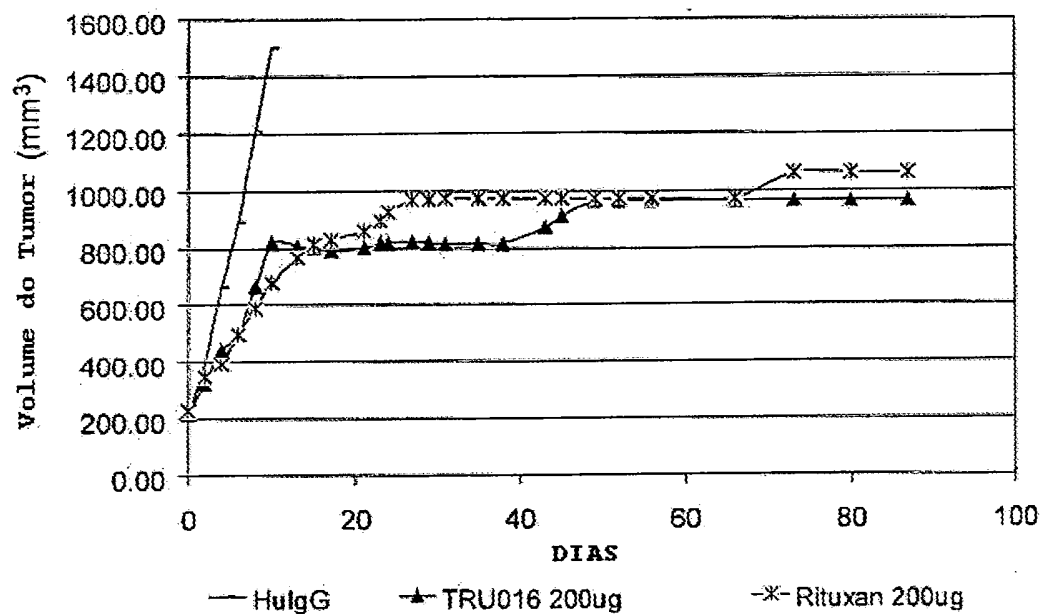


FIG. 22A

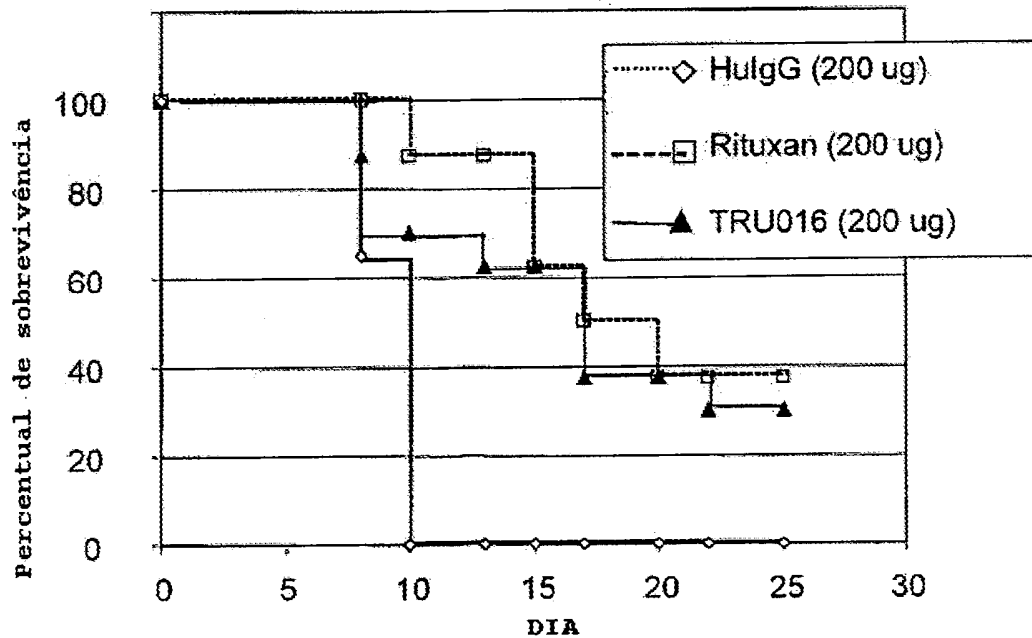


FIG. 22B

FIG. 23A

Anti-Classe II

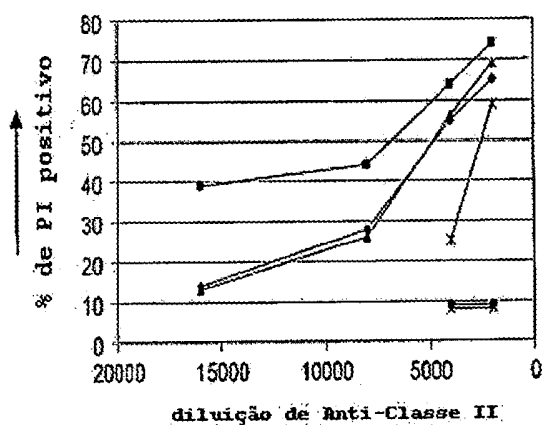
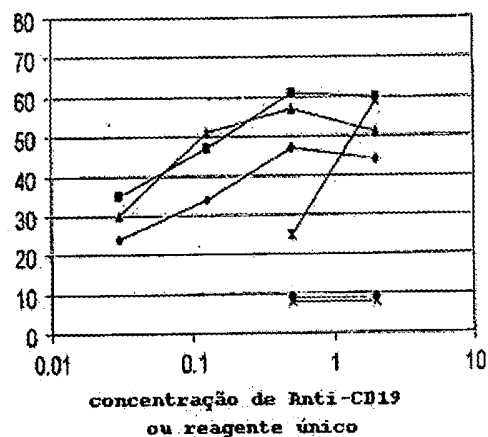
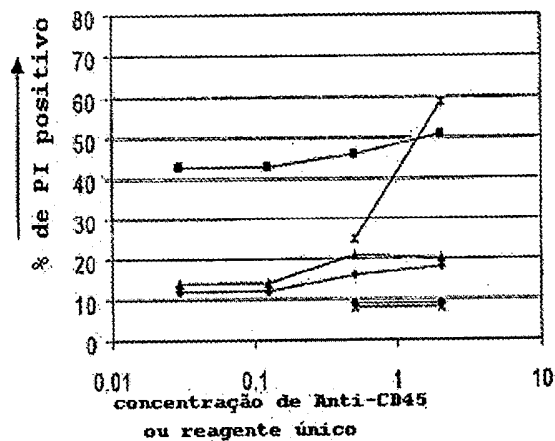


FIG. 23B

Anti-CD19



C. Anti-CD45



D. CTLA4Ig

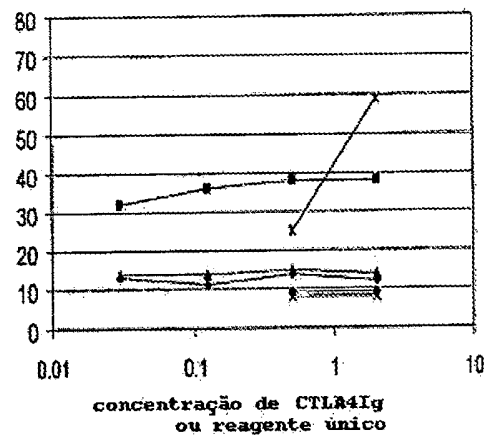


FIG. 23C

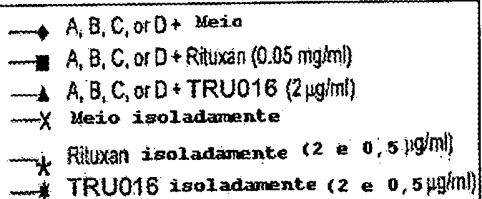


FIG. 23D

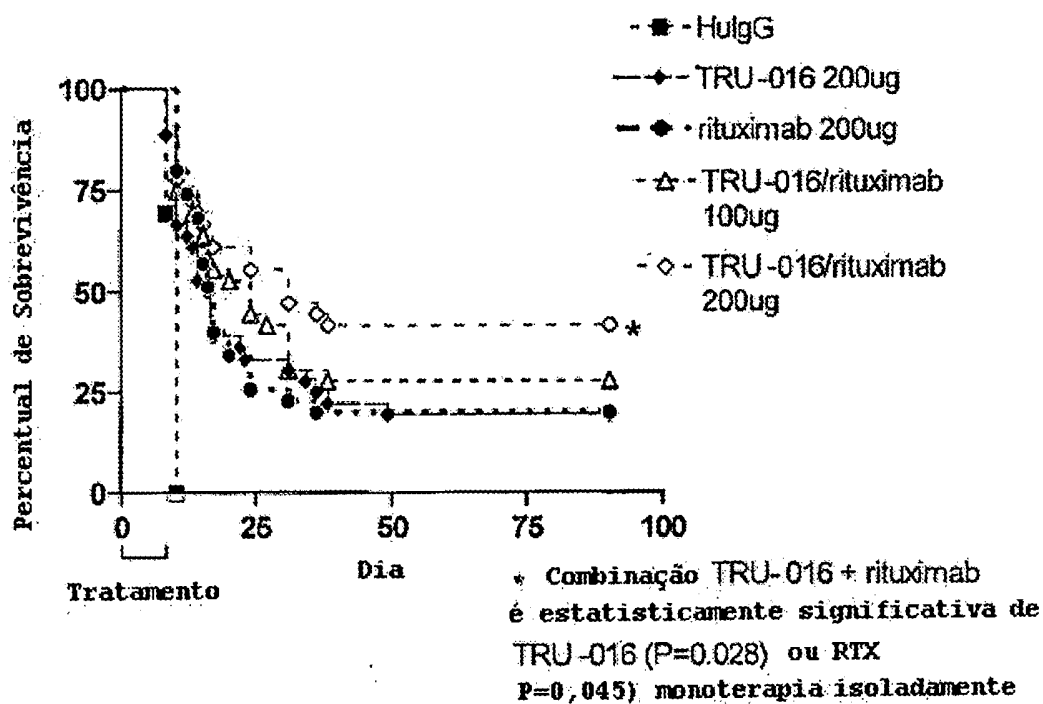


FIG. 24

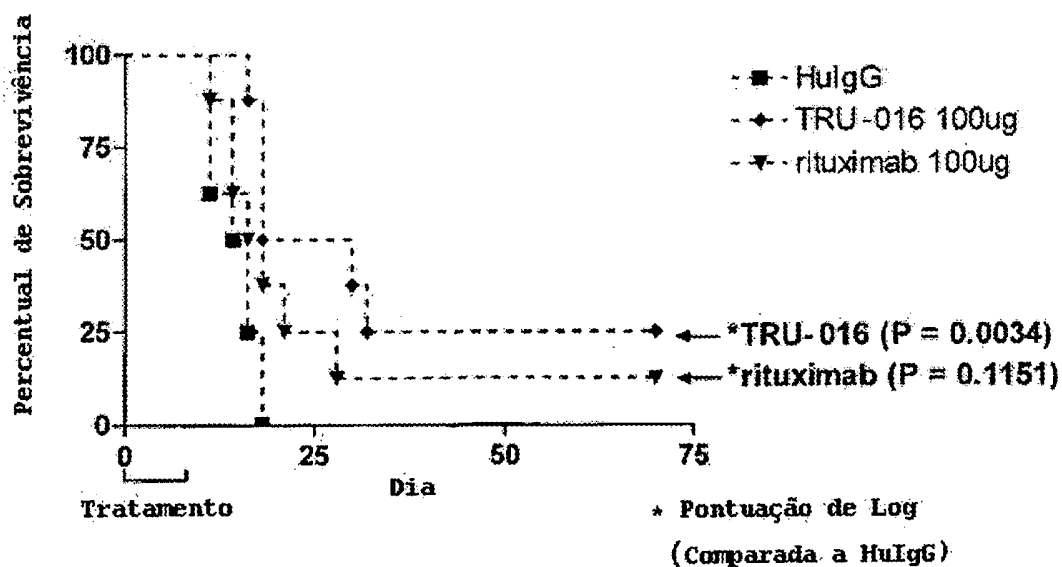


FIG. 25

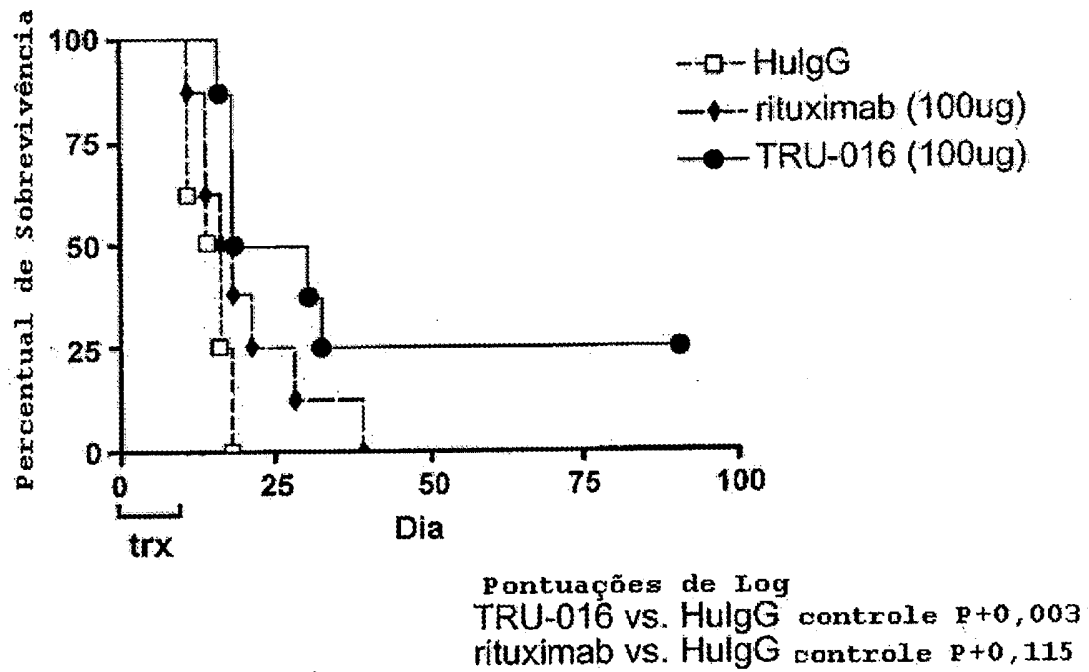


FIG. 26

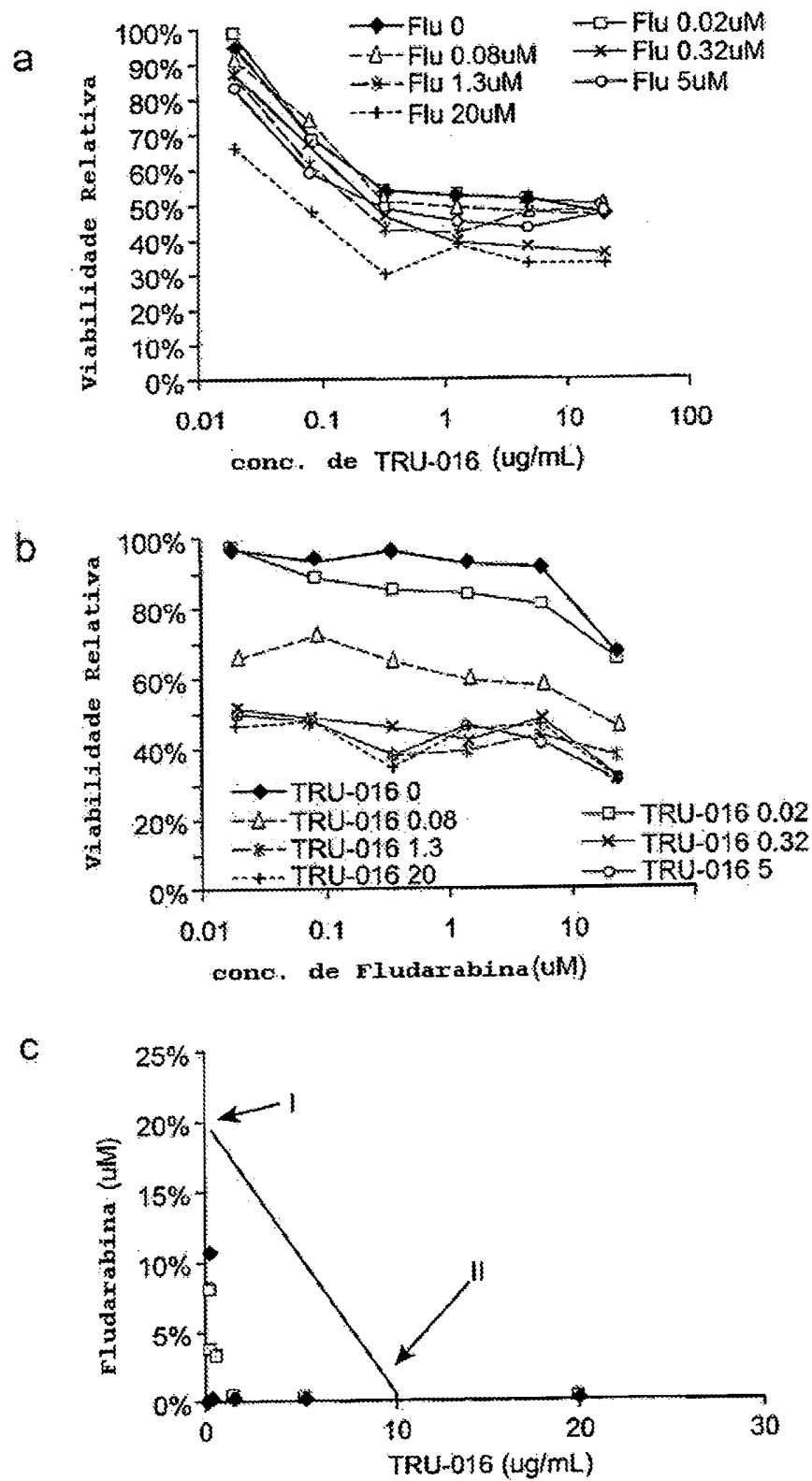
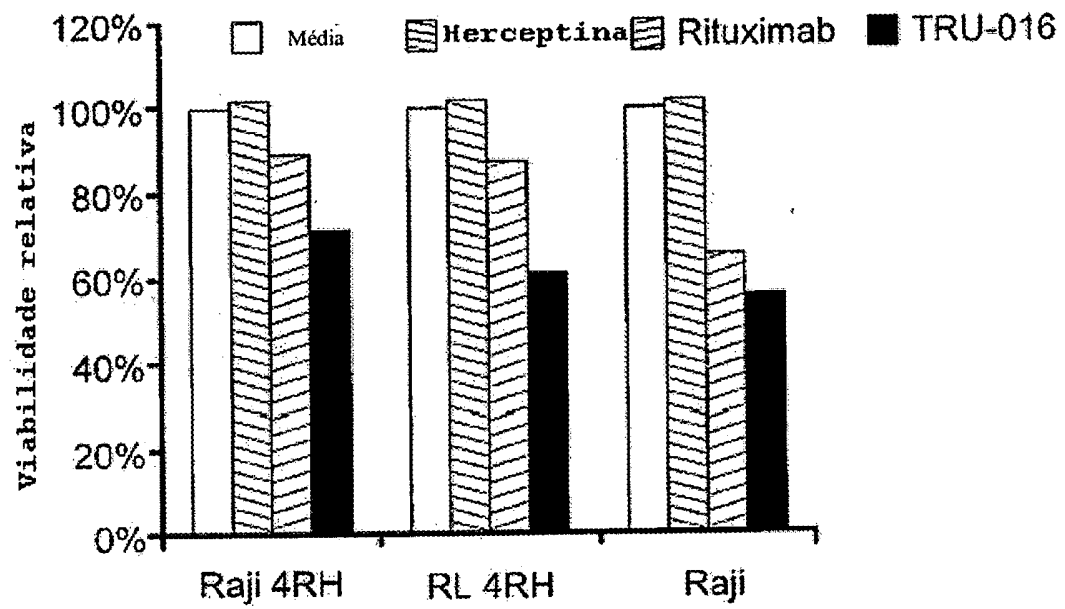


FIG. 27

**FIG. 28**

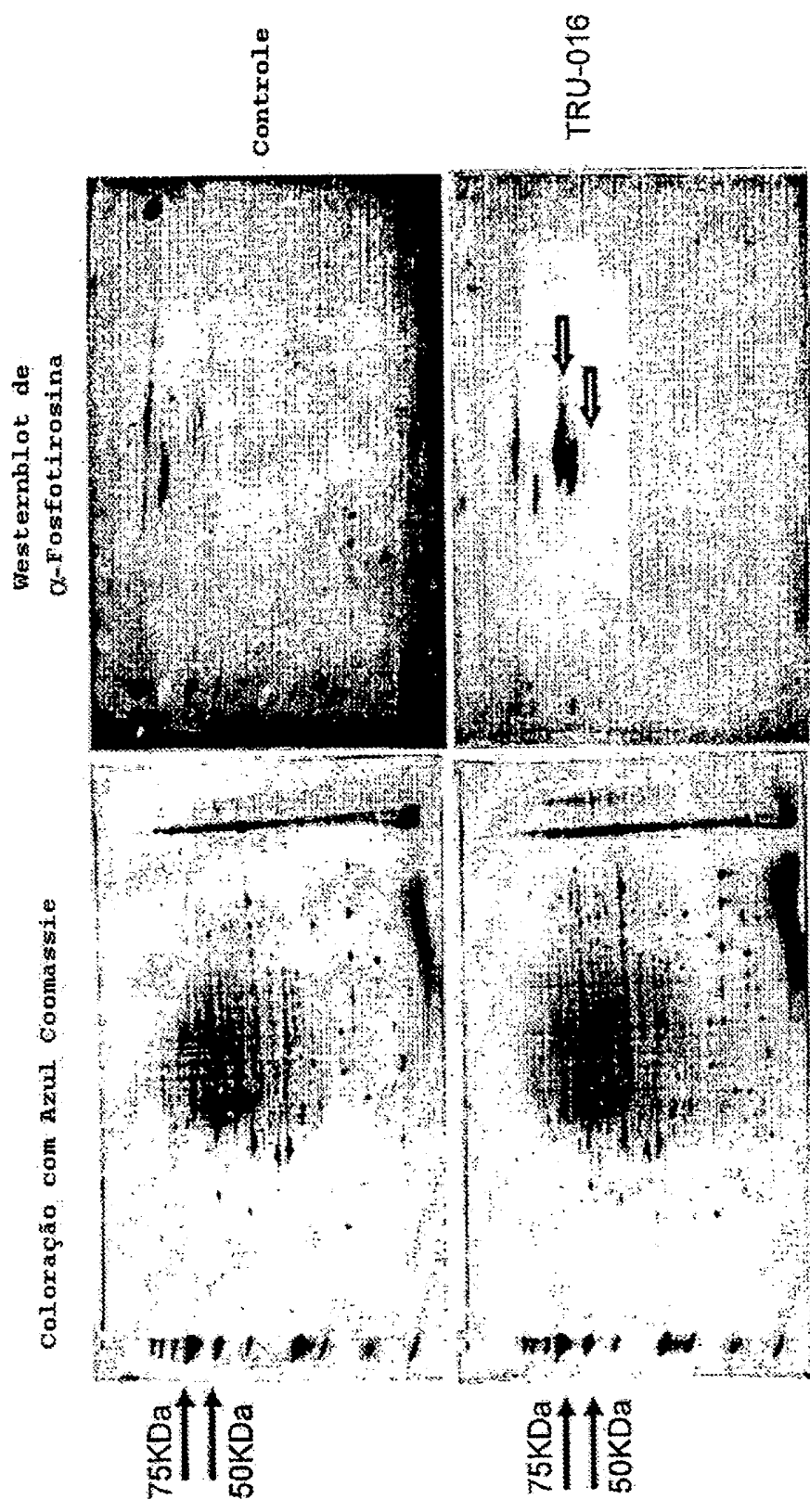


FIG. 29

		L-FR1	L-CDR1	L-FR2	
	1				49
016_-_G28-1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	RTSENVYSYLA	WYQQKQKGKSPQLLV		
H016_-_019001	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RTSENVYSYLA	WYQQKPGQAPRLIY		
Consenso	I	TQSPA LS S GE T C	RTSENVYSYLA WYQQK G P LL		
		L-CDR2	L-FR3	L-CDR3	
	50				97
016_-_G28-1	FAKTLAE GVPSRFSGSGSGTQFSLKISSLPEDSGSYFC	QHHSNPNWT			
H016_-_019001	FAKTLAE GIPARFSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYC	QHHSNPNWT			
Consenso	FAKTLAE G P RFSGSGSGT F L ISSL PED	Y C QHHSNPNWT			
		L-FR4	{G4S}3 linker	H-FR1	
	98				30
016_-_G28-1	FGGGTELEIK GGGGSGGGGSGGGGSS	AVQLQQSGPESEKPGASVKISCKASGYSFT			
H016_-_019001	FGQGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGTG	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT			
Consenso	FG GT EIK GGGGSGGGGSGGGG	VQL QSG E KPG S KISCK SGYSFT			
		H-CDR1	H-FR2	H-CDR2	
	31				76
016_-_G28-1	GYNMN WVKQNGKSLEWIG	NIDPYYGGTTYNRKFKG	KATLTVDKSSS		
H016_-_019001	GYNMN WVRQMPGKGLEWMG	NIDPYYGGTTYNRKFKG	QVTISADKSSS		
Consenso	GYNMN WV Q GK LEW G	NIDPYYGGTTYNRKFKG	T DKS S		
		H-FR3	H-CDR3	H-FR4	
	77				113
016_-_G28-1	TAYMQLKSLTSEDSAVYYCAR	SVGPMQY WSGGTSTVTVSS			
H016_-_019001	TAYLQWSSLKASDTAMYYCAR	SVGPMQY WSGGTSTVTVSS			
Consenso	TAY Q SL D A YYCAR	SVGPMQY WSG GT VTVSS			

FIG. 30A

	1	50
HO16_-_019001	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSENVVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYF	
HO16_-_019008	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSENVVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYF	
HO16_-_019009	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSENVVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYF	
	51	100
HO16_-_019001	AKTLAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHHSDNPWTFGQ	
HO16_-_019008	AKTLAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHHSDNPWTFGQ	
HO16_-_019009	AKTLAEGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQHHSDNPWTFGQ	
	101	150
HO16_-_019001	GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGTGEVQLVQSGAEVKKPGE SLKISCKGSGY	
HO16_-_019008	GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAESKKPGE SLKISCKGSGY	
HO16_-_019009	GTKVEIKGGGSGGGGSGGGGASEVQLVQSGAESKKPGE SLRISCKGSGY	
	151	200
HO16_-_019001	SFTGYNMNWRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGQVTISADKSI	
HO16_-_019008	SFTGYNMNWRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGQVTISADKSI	
HO16_-_019009	SFTGYNMNWRQMPGKGLEWMGNIDPYYGGTTYNRKFKGHVTISADKSI	
	201	239
HO16_-_019001	TAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPMDYWGRGTLVTVSS	
HO16_-_019008	TAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPMDYWGRGTLVTVSS	
HO16_-_019009	TAYLQWSSLKASDTAMYYCARSVGPMDYWGRGTLVTVSS	

FIG. 30B

FIG. 32A

CADEIA LEVE	FR1.....	_____CDR1_____	FR2.....
019041	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASENVYSYLA	WYQOKPGQAPRLLIY
019044	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RASENVYSYLA	WYQOKPGQAPRLLIY
019001	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC	RTSENVYSYLA	WYQOKPGQAPRLLIY

	_____CDR2_____	FR3.....	_____CDR3_____	FR4....
019041	FAKTLAE	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	QHHSDNPWT	FGQGTKVEIK
019044	FAKTLAE	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	QHHSDNPWT	FGQGTKVEIK
019001	FAKTLAE	GIPARFSGSGSGTDFTLTIS	QHHSDNPWT	FGQGTKVEIK

CADEIA PESADA	FR1.....	_____CDR1_____	FR2.....
019041	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYNMN	WVRQMPGKGLEWMG
019044	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYNMN	WVRQMPGKGLEWMG
019001	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFT	GYNMN	WVRQMPGKGLEWMG

	_____CDR2_____	FR3.....
019041	NIDPHYGGTTYNRKFKG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
019044	NIDPHYGGTTYNRKFKG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR
019001	NIDPHYGGTTYNRKFKG	QVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR

	_____CDR3_____	FR4....
019041	SVGPFDY	WGQGTLLTVSS
019044	SVGPFDS	WGQGTLLTVSS
019001	SVGPM DY	WGRGTLTVSS

CLUSTAL W (1.83) alinhamento de sequência múltipla

019041	-----ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCA	48
019044	-----ATGGAAGCCCCAOCGCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCA	48
019001	AAGCTTGCCTCCCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTCTCTCTCTGCTACTCTGGCTCCCA	60



FIG. 32B



```

*****
019041 GATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTGTCTTTGTCTCCAGGC 108
019044 GATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTGTCTTTGTCTCCAGGC 108
019001 GATACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCGTGTCTTTGTCTCCAGGC 120
*****

019041 GAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCCGAGCAAGTGAAAATGTTTACAGCTACTTAGCCTGGTAC 168
019044 GAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCCGAGCAAGTGAAAATGTTTACAGCTACTTAGCCTGGTAC 168
019001 GAAAGAGCCACCCCTCTCCTGCCGAGCAAGTGAAAATGTTTACAGCTACTTAGCCTGGTAC 180
*****

019041 CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCTAGGCTCCTCATCTATTTTGCAGAAACCTTAGCAGAA 228
019044 CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCTAGGCTCCTCATCTATTTTGCAGAAACCTTAGCAGAA 228
019001 CAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCTAGGCTCCTCATCTATTTTGCAGAAACCTTAGCAGAA 240
*****

019041 GGAATTCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGC 288
019044 GGAATTCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGC 288
019001 GGAATTCAGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCCGGGACAGACTTCACCTCACCATCAGC 300
*****

019041 AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATCATTTCCGATAATCCGTGG 348
019044 AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATCATTTCCGATAATCCGTGG 348
019001 AGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAACATCATTTCCGATAATCCGTGG 360
*****

019041 ACATTCGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGTGGCGGGCTCGGCGGGTGGTGA 408
019044 ACATTCGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGTGGCGGGCTCGGCGGGTGGTGA 408
019001 ACATTCGGCCAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAGGTGGCGGGCTCGGCGGGTGGTGA 420
*****

019041 TCTGGAGGAGGTGGGACCGGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG 468
019044 TCTGGAGGAGGTGGGACCGGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG 468
019001 TCTGGAGGAGGTGGGACCGGTGAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCAGAGGTGAAAAAG 480
*****

019041 CCCGGAGAGTCTCTGAGGATTTCTGTAAAGGATCCGGTTACTCATTCAGTGGCTACAA 528
019044 CCCGGAGAGTCTCTGAGGATTTCTGTAAAGGATCCGGTTACTCATTCAGTGGCTACAA 528
019001 CCCGGAGAGTCTCTGAGGATTTCTGTAAAGGATCCGGTTACTCATTCAGTGGCTACAA 540
*****

019041 ATGAAC TGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTCGAGTGGATGGGCAATATTGATCCT 588
019044 ATGAAC TGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTCGAGTGGATGGGCAATATTGATCCT 588
019001 ATGAAC TGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTCGAGTGGATGGGCAATATTGATCCT 600
*****

019041 TATTATGGTGGTACTACCTACAACCGGAAGTTCAAGGSCCAGGTCACTATCTCCGCCGAC 648

```



FIG. 32C



```

019044 TATTATGGTGGTACTACCTACAACCGGAAGTTCAAGGGCCAGGTCACTATCTCCGCCGAC 648
019001 TATTATGGTGGTACTACCTACAACCGGAAGTTCAAGGGCCAGGTCACTATCTCCGCCGAC 650
*****

019041 AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAATGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATG 708
019044 AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAATGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATG 708
019001 AAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAATGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGACACCGCCATG 720
*****

019041 TATTACTGTGCACGCTCAGTCGGCCCTTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCGTGTCCT 768
019044 TATTACTGTGCACGCTCAGTCGGCCCTTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCGTGTCCT 768
019001 TATTACTGTGCACGCTCAGTCGGCCCTTTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCGTGTCCT 780
*****

019041 GTCTCCTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACTCACACATCTCCACCGTGCCCA 828
019044 GTCTCCTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACTCACACATCTCCACCGTGCCCA 828
019001 GTCTCCTCTGATCAGGAGCCCAATCTTCTGACAAAACTCACACATCTCCACCGTGCCCA 840
*****

019041 GCACCTGAATCCTGGGTGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCTCCCAAAACCCAAAGGACAC 888
019044 GCACCTGAATCCTGGGTGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCTCCCAAAACCCAAAGGACAC 888
019001 GCACCTGAATCCTGGGTGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCTCCCAAAACCCAAAGGACAC 900
*****

019041 CTTATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGAC 948
019044 CTTATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGAC 948
019001 CTTATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGAC 960
*****

019041 CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAAG 1008
019044 CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAAG 1008
019001 CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAAG 1020
*****

019041 CCGCGGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC 1068
019044 CCGCGGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC 1068
019001 CCGCGGGAGGAGCAGTACACAGCAGCTACCGTGTGGTTCAGCGTCTCACCCTCCTGCAC 1080
*****

019041 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTSCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC 1128
019044 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTSCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC 1128
019001 CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTSCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCC 1140
*****

019041 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACC 1188
019044 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACC 1188
019001 CCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCAAGGTGTACACC 1200
*****

```





```

019041 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA 1248
019044 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA 1248
019001 CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAA 1260
*****

019041 GGCTTCATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC 1308
019044 GGCTTCATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC 1308
019001 GGCTTCATCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAC 1320
*****

019041 TACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC 1368
019044 TACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC 1368
019001 TACAAGACCACGCCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTACAGCAAGCTC 1380
*****

019041 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCATGCTCCGTGATGCATGAG 1428
019044 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCATGCTCCGTGATGCATGAG 1428
019001 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCCTTCATGCTCCGTGATGCATGAG 1440
*****

019041 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA----- 1482
019044 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA----- 1482
019001 GCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATCTAGA 1500
*****

```

FIG. 32D