



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 321 567**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 51/10 (2006.01)

C12N 15/02 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **99123967 .4**

(96) Fecha de presentación : **12.11.1993**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1005870**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2000**

(54) Título: **Aplicación terapéutica de anticuerpos quiméricos para antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos para el tratamiento de linfoma de células B.**

(30) Prioridad: **13.11.1992 US 978891**
03.11.1993 US 149099

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2009

(73) Titular/es: **Biogen Idec Inc.**
14 Cambridge Center
Cambridge, Massachusetts 02142, US

(72) Inventor/es: **Anderson, Darrell R.;**
Hanna, Nabil;
Leonard, John E.;
Newman, Roland A.;
Reff, Mitchell E. y
Rastetter, William H.

(74) Agente: **Ungría López, Javier**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Aplicación terapéutica de anticuerpos quiméricos para antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos para el tratamiento de linfoma de células B.

La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-CD20 quimérico, inmunológicamente activo.

El sistema inmune de los vertebrados (por ejemplo, primates, que incluyen seres humanos, simios, monos, etc.) consiste en varios órganos y tipos celulares que han evolucionado para: reconocer exactamente y específicamente microorganismos extraños (“antígeno”) que invaden el hospedador vertebrado; unirse específicamente a tales microorganismos extraños; y eliminar/destruir tales microorganismos extraños. Los linfocitos, entre otros, son críticos para el sistema inmune. Los linfocitos se producen en el timo, en el bazo y en la médula ósea (adulto) y representan aproximadamente el 30% de los glóbulos blancos totales presentes en el sistema circulatorio de los seres humanos (adulto). Existen dos sub-poblaciones principales de linfocitos: las células T y las células B. Las células T son responsables de inmunidad mediada por células, mientras que las células B son responsables de la producción de anticuerpos (inmunidad humoral). Sin embargo, las células T y las células B se pueden considerar interdependientes -en una respuesta inmune típica, las células T se activan cuando el receptor de células T se une a fragmentos de un antígeno que están unidos a glucoproteínas del complejo principal de histocompatibilidad (“MHC”) en la superficie de una célula presentadora de antígenos; tal activación origina la liberación de mediadores biológicos (“interleuquinas”) que, en esencia, estimulan a las células B para que se diferencien y produzcan anticuerpos (“inmunoglobulinas”) contra el antígeno.

Cada célula B en el hospedador expresa en su superficie un anticuerpo diferente -de este modo, una célula B expresará un anticuerpo específico para un antígeno, mientras que otra célula B expresará un anticuerpo específico para un antígeno diferente. Por consiguiente, las células B son bastantes diversas y esta diversidad es crítica para el sistema inmune. En los seres humanos, cada célula B puede producir un número enorme de moléculas de anticuerpo (es decir, aproximadamente de 10^7 a 10^8). Tal producción de anticuerpos cesa muy típicamente (o disminuye sustancialmente) cuando el antígeno extraño se ha neutraliza. Ocasionalmente, sin embargo, la proliferación de una célula B particular continuará sin disminuir; tal proliferación puede tener como resultado un cáncer denominado “linfoma de células B”.

Las células T y las células B comprenden ambas proteínas de superficie celular que se pueden utilizar como “marcadores” para diferenciación e identificación. Uno de tales marcadores de células B humanas es el antígeno de diferenciación Bp35 restringido a linfocitos B humanos, denominado “CD20”. El CD20 se expresa durante el desarrollo temprano de pre-células B y permanece hasta la diferenciación de las células plasmáticas. Específicamente, la molécula de CD20 puede regular una etapa del proceso de activación que se requiere para el inicio del ciclo celular y para la diferenciación y se expresa habitualmente a niveles muy elevados en células B neoplásicas (“tumores”). El CD20, por definición, está presente en células B “normales” así como en células B “malignas”, es decir, en las células B cuya proliferación no detenida puede conducir a linfoma de células B. Por tanto, el antígeno de superficie CD20 tiene el potencial de servir como un candidato para “convertir en diana” los linfomas de células B.

En esencia, tal conversión en diana se puede generalizar del siguiente modo: anticuerpos específicos para el antígeno de superficie CD20 de células B se inyectan, por ejemplo, a un paciente. Estos anticuerpos anti-CD20 se unen específicamente al antígeno de superficie celular CD20 de (ostensiblemente) células B normales y malignas; el anticuerpo anti-CD20 unido al antígeno de superficie CD20 puede conducir a la destrucción y a la disminución de células B neoplásicas. Adicionalmente, agentes químicos o marcadores radioactivos que tengan el potencial para destruir el tumor se pueden conjugar al anticuerpo anti-CD20 de tal manera que el agente se “suministre” específicamente a, por ejemplo, las células B neoplásicas. Independientemente de la estrategia, un objetivo primario es destruir el tumor: la estrategia específica se puede determinar por el anticuerpo anti-CD20 particular que se utilice y, por tanto, las estrategias disponibles para dirigir el antígeno CD20 pueden variar considerablemente.

Por ejemplo, se han descrito intentos para tal conversión en diana del antígeno de superficie CD20. Según se ha descrito, el anticuerpo monoclonal murino (ratón) 1F5 (un anticuerpo anti-CD20) se administró mediante infusión intravenosa continua a pacientes con linfoma de células B. Según se ha descrito, se requerían niveles extremadamente elevados (>2 gramos) de 1F5 para disminuir las células tumorales circulantes y los resultados se describieron como “transitorios”. Press *et al.*, “Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas”. Blood 69/2: 584-591 (1987). Un problema potencial con esta estrategia es que los anticuerpos monoclonales no humanos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales murinos) carecen típicamente de funcionalidad efectora humana, es decir, son incapaces de, entre otras cosas, mediar en la lisis dependiente de complemento o de lisar células diana humanas por toxicidad celular dependiente de anticuerpos o de fagocitosis mediada por receptor Fc. Además, los anticuerpos monoclonales no humanos se pueden reconocer por el hospedador humano como una proteína extraña; por tanto, inyecciones repetidas de tales anticuerpos extraños pueden conducir a la inducción de respuestas inmunes que conducen a reacciones peligrosas de hipersensibilidad. Para los anticuerpos monoclonales con base murina, la misma se denomina frecuentemente respuesta de Anticuerpos Humanos Anti-Ratón o respuesta “HAMA”. Adicionalmente, estos anticuerpos “extraños” pueden ser atacados por el sistema inmune del hospedador de tal manera que, en efecto, se neutralizan antes de que alcancen su lugar diana.

Los linfocitos y las células de linfoma son inherentemente sensibles a radioterapia por varias razones: la emisión local de radiación ionizante de anticuerpos radiomarcados puede destruir células con o sin el antígeno diana (por ejemplo, CD20) en estrecha proximidad al anticuerpo unido al antígeno; la radiación penetrante puede obviar el problema

del acceso limitado al anticuerpo en tumores voluminosos o poco vascularizados; y, puede reducirse la cantidad total de anticuerpo requerida. El radionúclido emite partículas radioactivas que pueden dañar el ADN celular hasta el punto en el que los mecanismos de reparación celular son incapaces de permitir que la célula continúe viviendo; por tanto, si las células diana son tumores, el marcador radioactivo destruye beneficiosamente las células tumorales. Los anticuerpos radiomarcados, por definición, incluyen el uso de una sustancia radioactiva que puede requerir la necesidad de precauciones tanto para el paciente (es decir, posible trasplante de médula ósea) como para el asistente sanitario (es decir, la necesidad de ejercer un alto grado de precaución cuando se trabaja con radioactividad).

Por tanto, una estrategia para mejorar la capacidad de anticuerpos monoclonales murinos con el fin de que sean eficaces en el tratamiento de trastornos de células B, ha sido el conjugar un marcador radioactivo o una toxina al anticuerpo de tal modo que el marcador o la toxina se localice en el lugar del tumor. Por ejemplo, el anticuerpo IF5 que se ha mencionado anteriormente se ha "marcado" con yodo-131 (^{131}I) y según se ha descrito, se evaluó para determinar su biodistribución en dos pacientes. Véase Eary, J. F. *et al.*, "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" *J. Nuc. Med.* 31/8: 1257-1268 (1990); véase también, Press, O. W. *et al.*, "Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody" *J. Clin. Onc.* 7/8: 1027-1038 (1989) (indicación de que un paciente tratado con IF5 marcado con ^{131}I consiguió una "respuesta parcial"); Goldenberg, D. M. *et al.*, "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" *J. Clin. Onc.* 9/4: 548-564 (1991) (se describió que tres de ocho pacientes que recibieron inyecciones múltiples habían desarrollado una respuesta HAMA); Appelbaum, F. R. "Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" *Hem./Onc. Clinics of N. A.* 5/5: 1013-1025 (1991) (artículo de revisión); Press, O. W. *et al.* "Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support" *New England Journal of Medicine* 329/17: 1219-1223 (1993) (anticuerpos IF5 y B1 anti-CD20 marcados con yodo-131); y Kaminski, M. G. *et al.* "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with [^{125}I] Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody" *MEJM* 329/7 (1993) (anticuerpo B1 anti-CD20 marcado con yodo-131; de aquí en adelante "Kaminski").

Se han conjugado también toxinas (es decir, agentes quimioterapéuticos tales como doxorrubicina o mitomicina C) a anticuerpos. Véase, por ejemplo, la solicitud de PCT publicada WO 92/07466 (publicada el 14 de mayo de 1992).

Se han desarrollado anticuerpos "quiméricos", es decir, anticuerpos que comprenden porciones de dos o más especies diferentes (por ejemplo, ratón y ser humano) como una alternativa a anticuerpos "conjugados". Por ejemplo, Liu, A. Y. *et al.* "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity" *J. Immun.* 139/10: 3521-3526 (1987), describe un anticuerpo quimérico ratón/humano dirigido contra el antígeno CD20. Véase también la Publicación de PCT N° WO 88/04936. Sin embargo, no se proporciona información con respecto a la capacidad, la eficacia o la practicabilidad del uso de tales anticuerpos quiméricos para el tratamiento de trastornos de células B. Se señala que en ensayos funcionales *in vitro* (por ejemplo, lisis dependiente de complemento ("CDC"); citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos ("ADCC"), etc.) no pueden predecir inherentemente la capacidad *in vivo* de un anticuerpo quimérico para destruir o reducir las células diana que expresan el antígeno específico. Véase, por ejemplo, Robinson, R. D. *et al.*, "Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities", *Hum. Antib. Hybridomas* 2: 84-93 (1991) (anticuerpos quiméricos ratón-ser humano que tienen actividad ADCC indetectable). Por tanto, la eficacia terapéutica potencial de un anticuerpo quimérico se puede determinar solamente de manera exacta mediante experimentación *in vivo*.

Lo que se necesita y lo que sería un gran avance en la técnica, son estrategias terapéuticas que conviertan en diana el antígeno CD20 para el tratamiento de linfomas de células B en primates, incluyendo, pero sin limitación, seres humanos.

En el presente documento se describen métodos terapéuticos diseñados para el tratamiento de trastornos de células B y en particular, de linfomas de células B. Estos protocolos están basados en la administración de anticuerpos anti-CD20 quiméricos inmunológicamente activos para la reducción de células B de sangre periférica, incluyendo células B asociadas con linfoma; administración de anticuerpos anti-CD20 radiomarcados para convertir en diana tumores localizados y asociados con células B periféricas; y administración de anticuerpos anti-CD20 quiméricos y de anticuerpos anti-CD20 radiomarcados en una estrategia terapéutica cooperativa.

En resumen, la presente invención un anticuerpo anti-CD20 quimérico inmunológicamente activo para el uso como se indica en las reivindicaciones.

La presente invención se describirá con más detalle con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La Figura 1 es una representación en forma de diagrama de un vector de expresión del anticuerpo quimérico en tándem útil para la producción de anticuerpos anti-CD20 quiméricos inmunológicamente activos ("TCAE 8");

Las Figuras 2A a 2E son la secuencia de ácido nucleico del vector de la Figura 1;

Las Figuras 3A a 3F son la secuencia de ácido nucleico del vector de la Figura 1 conteniendo además regiones variables de cadena ligera y pesada murinas ("anti-CD20 en TCAE 8");

La Figura 4 son las secuencias de ácido nucleico y de aminoácidos (incluyendo las regiones CDR y flanqueantes) de la región variable de la cadena ligera murina obtenida del anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8;

La Figura 5 es la secuencia de ácido nucleico y de aminoácidos (incluyendo las regiones CDR y flanqueantes) de la región variable de la cadena pesada murina obtenida del anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8;

La Figura 6 son los resultados de la citometría de flujo que muestran la unión de Clq humano marcado con fluorescencia al anticuerpo quimérico anti-CD20, incluyendo como controles Clq marcado; Clq marcado y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8; y Clq marcado e IgG1,k humana;

La Figura 7 representa los resultados de la lisis relacionada con el complemento comparando el anticuerpo anti-CD20 quimérico y el anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8;

La Figura 8 representa los resultados de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos con células efectoras humanas *in vivo* que comparan el anticuerpo quimérico anti-CD20 y 2B8;

Las Figuras 9A, 9B y 9C proporcionan los resultados de la disminución de linfocitos B de sangre periférica en primates no humanos después de la infusión de 0,4 mg/kg (A); 1,6 mg/kg (B); y 6,4 mg/kg (C) de anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo;

La Figura 10 proporciona los resultados de, entre otras cosas, la disminución de linfocitos B de sangre periférica en primates no humanos después de la infusión de 0,01 mg/kg de anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo;

La Figura 11 proporciona los resultados del impacto tumoricida de Y2B8 en un modelo xenográfico de ratón utilizando un tumor linfoblástico de células B;

La Figura 12 proporciona el resultado del impacto tumoricida de C2B8 en un modelo xenográfico de ratón utilizando un tumor linfoblástico de células B;

La Figura 13 proporciona los resultados del impacto tumoricida de una combinación de Y2B8 y C2B8 en un modelo xenográfico de ratón utilizando un tumor linfoblástico de células B; y

Las Figuras 14A y 14B proporcionan los resultados de un análisis clínico de Fase I/II de C2B8 que demuestran la disminución de la población de células B a lo largo del tiempo para pacientes que muestran una remisión parcial de la enfermedad (14A) y una remisión menor de la enfermedad (14B).

De manera general, los anticuerpos están formados por dos moléculas de cadenas ligeras y dos moléculas de cadenas pesadas; estas cadenas tienen una forma general de "Y", formando ambas cadenas ligeras y pesadas los brazos de la Y y formando las cadenas pesadas la base de la Y. Las cadenas ligeras y pesadas están divididas en dominios de homología estructural y funcional. Los dominios variables de las cadenas ligeras ("V_L") y de las cadenas pesadas ("V_H") determinan el reconocimiento y la especificidad. Los dominios de la región constante de las cadenas ligeras ("C_L") y de las cadenas pesadas ("C_H") confieren propiedades biológicas importantes, por ejemplo, la asociación de cadenas de los anticuerpos, secreción, movilidad a través de la placenta, unión al receptor Fc, unión al complemento, etc. La serie de acontecimientos que conducen a la expresión de los genes de las inmunoglobulinas en las células productoras de anticuerpos es compleja. Las secuencias génicas de las regiones de dominio variable están situadas en segmentos génicos de líneas germinales separadas denominados "V_H", "D" y "J_H" o "V_L" y "J_L". Estos segmentos génicos se unen por reordenaciones del ADN para formar las regiones V completas expresadas en la cadena pesada y en la cadena ligera, respectivamente. Los segmentos V unidos, reordenados, (V_L-J_L y V_H-D-J_H) codifican entonces las regiones variables completas o los dominios de unión al antígeno de las cadenas ligeras y pesadas, respectivamente.

La sueroterapia de linfomas de células B humanos usando un anticuerpo monoclonal murino anti-CD20 (1F5) se ha descrito por Presa *et al.* (69 Blood 584, 1987, anteriormente); las respuestas terapéuticas descritas fueron, desgraciadamente, transitorias. Adicionalmente, según se informó, el 25% de los pacientes ensayados desarrolló una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) a la sueroterapia. Press *et al.* sugieren que estos anticuerpos, conjugados a toxinas o a radioisótopos, podrían proporcionar un beneficio clínico más duradero que el anticuerpo sin conjugar.

Debido a los efectos debilitantes del linfoma de células B y a la necesidad muy real de proporcionar estrategias de tratamientos viables para esta enfermedad, se han establecido diferentes estrategias que tienen un anticuerpo particular, 2B8, como el nexo común entre las estrategias. Una de tales estrategias aprovecha de manera ventajosa la capacidad de los sistemas de mamífero para recuperar fácilmente y eficazmente células B de sangre periférica; usando esta estrategia, se intenta, en esencia, eliminar o disminuir las células B en sangre periférica y en tejido linfático como un medio para eliminar también los linfomas de células B. Esto se realiza mediante el uso de, entre otras cosas, anticuerpos anti-CD20 quiméricos, inmunológicamente activos. En otra estrategia, se intenta convertir en diana células tumorales para su destrucción con marcadores radioactivos.

Según se usa en este documento, el término "anticuerpo anti-CD20" es un anticuerpo que reconoce específicamente una fosfoproteína de 35.000 Dalton no glucosilada de superficie celular, denominada típicamente antígeno de diferenciación restringido a linfocitos B humanos Bp35, indicado comúnmente por CD20. Como se usa en este documento, el término "quimérico" cuando se usa con referencia a anticuerpos anti-CD20, abarca anticuerpos que se obtienen muy preferiblemente usando técnicas de ácido desoxirribonucleico recombinante y que comprenden com-

ponentes humanos (incluyendo especies inmunológicamente “relacionadas”, por ejemplo, chimpancé) y no humanos: la región constante del anticuerpo quimérico es muy preferiblemente sustancialmente idéntica a la región constante de un anticuerpo humano natural; la región variable del anticuerpo quimérico procede muy preferiblemente de una fuente no humana y tiene la antigenicidad y especificidad deseadas hacia el antígeno de superficie celular CD20. La fuente no humana puede ser cualquier fuente vertebrada que se pueda usar para generar anticuerpos contra un antígeno de superficie celular CD20 humano o contra material que comprenda un antígeno de superficie celular CD20 humano. Tal fuente no humana incluye, pero sin limitación, roedores (por ejemplo, conejo, rata, ratón, etc.) y primates no humanos (por ejemplo, Monos del Viejo Mundo, Simios, etc.). Muy preferiblemente, el componente no humano (región variable) procede de una fuente murina. Como se usa en este documento, la frase “inmunológicamente activo” cuando se usa con referencia a anticuerpos anti-CD20 quiméricos, significa un anticuerpo quimérico que se une a Clq humano, que media la lisis dependiente de complemento (“CDC”) de líneas celulares linfoides B humanas y que lisa células diana humanas por la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (“ADCC”). Como se usan en este documento, las frases “marcaje indirecto” y “estrategia de marcaje indirecto” significan ambas que un agente quelante se une covalentemente a un anticuerpo y que al menos un radionúclido está insertado en el agente quelante. Los agentes quelantes y los radionúclidos preferidos están descritos en Srivagtava, S. C. y Mease, R. C., “Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies”, Nucl. Med. Bio. 18/6: 589-603 (1991) (“Srivagtava”). Un agente quelante particularmente preferido es el ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentacético (“MX-DTPA”); los radionúclidos particularmente preferidos para el marcaje indirecto incluyen indio [111] e itrio [90]. Como se usan en este documento, las frases “marcaje directo” y “estrategia de marcaje directo” significan ambas que un radionúclido se une covalentemente directamente a un anticuerpo (típicamente por un resto aminoácido). Los radionúclidos preferidos se proporcionan en Srivagtava; un radionúclido particularmente preferido para el marcaje directo es yodo [131] unido covalentemente por restos de tirosina. Se prefiere particularmente la estrategia de marcaje indirecto.

Las estrategias terapéuticas descritas en este documento están basadas en la capacidad del sistema inmune de los primates para recuperar o rejuvenecer rápidamente las células B de sangre periférica. Adicionalmente, debido a que la respuesta inmune principal de los primates está producida por células T, cuando el sistema inmune tiene una deficiencia de células B de sangre periférica, no se precisa la necesidad de precauciones “extraordinarias” (es decir, aislamiento del paciente, etc.). Como resultado de estos y otros matices de los sistemas inmunes de los primates, la estrategia terapéutica para los trastornos de células B permite la eliminación de células B de sangre periférica usando anticuerpos anti-CD20 quiméricos inmunológicamente activos.

Debido a que los trastornos de células B de sangre periférica, por definición, pueden indicar una necesidad de acceso a la sangre para el tratamiento, la vía de administración de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos y de los anticuerpos anti-CD20 radiomarcados es preferiblemente parenteral; como se usa en este documento, el término “parenteral” incluye la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, rectal, vaginal o intraperitoneal. De éstas, la más preferida es la administración intravenosa.

Los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos y los anticuerpos anti-CD20 radiomarcados se proporcionarán típicamente mediante la técnica convencional en un tampón farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, solución salina estéril, agua tamponada estéril, propilenglicol, combinaciones de los anteriores, etc. Los métodos para preparar agentes administrables por vía parenteral están descritos en Pharmaceutical Carriers & Formulations, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Ed. (Mack Pub. Co., Easton, PA 1975). La cantidad específica, terapéuticamente eficaz de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos útil para producir un único efecto terapéutico en cualquier paciente dado se puede determinar mediante técnicas convencionales bien conocidas por los especialistas en la técnica.

Las dosificaciones eficaces (es decir, las cantidades terapéuticamente eficaces) de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos varían de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 25 mg/kg de peso corporal y muy preferiblemente de aproximadamente 0,4 a aproximadamente 20,0 mg/kg de peso corporal. Otras dosificaciones son viables; los factores que influyen sobre la dosificación incluyen, pero sin limitación, la gravedad de la enfermedad, las estrategias de tratamiento previas, la salud global del paciente, otras enfermedades presentes, etc. El especialista está capacitado fácilmente para valorar a un paciente particular y determinar una dosificación adecuada que entre dentro de los intervalos o, si es necesario, esté fuera de los intervalos.

La introducción de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos en estos intervalos de dosis puede llevarse a cabo como un único tratamiento o a lo largo de una serie de tratamientos. Con respecto a los anticuerpos quiméricos, se prefiere que tal introducción se lleve a cabo a lo largo de una serie de tratamientos; esta estrategia preferida se postula sobre la metodología del tratamiento asociada con esta enfermedad. Aunque no se desea quedar ligado a ninguna teoría particular, debido a que los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos son inmunológicamente activos y se unen a CD20, después de la introducción inicial en el individuo de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos, comenzará la disminución de las células B de sangre periférica; se ha observado una reducción casi completa en el intervalo de aproximadamente 24 horas después de la infusión del tratamiento. Debido a esto, la(s) introducción(es) posterior(es) de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos (o de anticuerpos anti-CD20 radiomarcados) en el paciente pretende(n): a) eliminar las células B de sangre periférica restantes; b) comenzar la reducción de células B de los ganglios linfáticos; c) comenzar la reducción de células B de otras fuentes tisulares, por ejemplo, médula ósea, tumor, etc. Dicho de nuevo, mediante el

uso de introducciones repetidas de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos tiene lugar una serie de acontecimientos, considerándose cada acontecimiento importante para el tratamiento eficaz de la enfermedad. El primer “acontecimiento” se puede por tanto considerar como dirigido principalmente a la reducción sustancial de las células B de sangre periférica del paciente; los “acontecimientos” posteriores se pueden considerar como dirigidos principalmente a eliminar simultáneamente o en serie las células B restantes del sistema, a eliminar las células B de los ganglios linfáticos o a eliminar las células B de otros tejidos.

En efecto, aunque una dosificación única proporciona beneficios y se puede utilizar eficazmente para el tratamiento/control de la enfermedad, un ciclo de tratamiento preferido puede tener lugar a lo largo de varias etapas; muy preferiblemente, entre aproximadamente 0,4 y aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos se introducen en el paciente una vez a la semana durante entre aproximadamente 2 y 10 semanas, muy preferiblemente durante aproximadamente 4 semanas.

Con referencia al uso de anticuerpos anti-CD20 radiomarcados, una preferencia es que el anticuerpo no sea quimérico; esta preferencia está basada en la semivida de circulación significativamente más larga de los anticuerpos quiméricos con relación a los anticuerpos murinos (es decir, con una semivida de circulación más larga, el radionúclido está presente en el paciente durante extensos periodos). Sin embargo, los anticuerpos quiméricos radiomarcados se pueden utilizar de manera beneficiosa con dosificaciones de mili-Curies (“mCi”) más bajas usadas junto con el anticuerpo quimérico con relación al anticuerpo murino. Este protocolo permite una disminución de la toxicidad para la médula ósea hasta un nivel aceptable, mientras que se mantiene la utilidad terapéutica.

Una diversidad de radionúclidos se puede aplicar en la presente invención y los especialistas en la técnica están dotados de la capacidad para determinar fácilmente qué radionúclido es el más apropiado en una diversidad de circunstancias. Por ejemplo, el yodo [131] es un radionúclido bien conocido utilizado para inmunoterapia dirigida. Sin embargo, la utilidad clínica del yodo [131] puede estar limitada por varios factores incluyendo: semivida física de ocho días; deshalogenación del anticuerpo yodado en la sangre y en los lugares tumorales; y características de emisión (por ejemplo, un gran componente gamma) que pueden ser subóptimas para deposición de dosis localizada en el tumor. Con la llegada de agentes quelantes superiores, la oportunidad para unir grupos quelantes de metales a proteínas ha incrementado las ocasiones para utilizar otros radionúclidos tales como indio [111] e itrio [90]. El itrio [90] proporciona varios beneficios para el uso en aplicaciones radioinmunoterapéuticas: la semivida de 64 horas de itrio [90] es lo suficientemente larga para permitir la acumulación de los anticuerpos en el tumor y, a diferencia del yodo [131], por ejemplo, el itrio [90] es un emisor beta puro de alta energía sin irradiación gamma acompañante en su desintegración, con un intervalo en el tejido de 100 a 1000 diámetros celulares. Además, la cantidad mínima de radiación penetrante permite la administración de anticuerpos marcados con itrio [90] a pacientes ambulatorios. Además, no se requiere la internalización del anticuerpo marcado para la célula y la emisión local de radiación ionizante debe ser letal para las células tumorales adyacentes que carecen del antígeno diana. Una limitación no terapéutica del itrio [90] está basada en la ausencia de radiación gamma significativa, haciendo difícil la formación de imágenes con el mismo. Para evitar este problema, puede utilizarse un radionúclido para “formación de imágenes” de diagnóstico, tal como indio [111], para determinar la posición y el tamaño relativo de un tumor antes de la administración de dosis terapéuticas de anti-CD20 marcado con itrio [90]. El indio [111] se prefiere particularmente como el radionúclido de diagnóstico debido a que: pueden administrarse de manera segura de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mCi sin toxicidad detectable; y los datos de formación de imágenes son generalmente predictivos de la distribución posterior del anticuerpo marcado con itrio [90]. La mayoría de los estudios de formación de imágenes utilizan 5 mCi de anticuerpo marcado con indio [111] debido a que esta dosis es segura y tiene una eficacia de formación de imágenes aumentada en comparación con dosis más bajas, teniendo lugar la producción óptima de imágenes de tres a seis días después de la administración del anticuerpo. Véase, por ejemplo, Murray, J. L., 26 J. Nuc. Med. 3328 (1985) y Carraguillo, J. A. *et al.*, 26 J. Nuc. Med. 67 (1985).

Las dosificaciones de tratamiento únicas eficaces (es decir, las cantidades terapéuticamente eficaces) de anticuerpos anti-CD20 marcados con itrio [90] varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 75 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones de tratamiento únicas eficaces que no producen ablación de la médula de anticuerpos anti-CD20 marcados con yodo [131] varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 70 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi. Las dosificaciones de tratamiento únicas eficaces con ablación (es decir, se puede requerir trasplante de médula ósea autóloga) de anticuerpos anti-CD20 marcados con yodo [131] varían entre aproximadamente 30 y aproximadamente 600 mCi, más preferiblemente entre aproximadamente 50 y menos de aproximadamente 500 mCi. Junto con un anticuerpo quimérico anti-CD20, debido a la semivida circulante más larga con respecto a los anticuerpos murinos, una dosificación de tratamiento única eficaz sin ablación de médula de anticuerpos quiméricos anti-CD20 marcados con yodo [131] varían entre aproximadamente 5 y aproximadamente 40 mCi, más preferiblemente menos de aproximadamente 30 mCi. Los criterios para la formación de imágenes para el marcador de indio [111] por ejemplo, son típicamente menores de aproximadamente 5 mCi.

Con respecto a anticuerpos anti-CD20 radiomarcados, la terapia con los mismos puede tener lugar también usando un único tratamiento terapéutico o usando tratamientos múltiples. Debido al componente radionúclido, se prefiere que antes del tratamiento se “recojan” células madre periféricas (“PSC”) o médula ósea (“BM”) para los pacientes que experimenten una toxicidad de la médula ósea potencialmente mortal resultante de la radiación. La BM y/o las PSC se recogen usando técnicas convencionales y posteriormente se purifican y congelan para una posible reinfusión. Adicionalmente, se prefiere enormemente que antes del tratamiento se lleve a cabo en el paciente un estudio de dosimetría de diagnóstico usando un anticuerpo marcado para el diagnóstico (por ejemplo, usando indio [111]), uno de

cuyos fines es asegurar que el anticuerpo marcado terapéuticamente (por ejemplo, usando itrio [90]) no se “concentre” innecesariamente en cualquier órgano o tejido normal. Se han descrito anticuerpos quiméricos ratón/ser humano. Véase, por ejemplo, Morrison, S. L. *et al.*, PNAS 11: 6851-6854 (noviembre de 1984); Publicación de Patente Europea N° 173404; Beulianne, C. L. *et al.*, Nature 312: 642 (diciembre de 1984); Neubeiger, M. S. *et al.*, Nature 314: 268 (marzo de 1985); Publicación de Patente Europea N° 125023; Tan *et al.*, J. Immunol. 135: 8564 (noviembre de 1985); Sun, L. K. *et al.*, Hybridoma 5/1: 517 (1986); Sahagan *et al.*, J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986). Véase, de manera general, Muron, Nature 312: 597 (diciembre de 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5/3 (marzo de 1985); Marx, Science 229: 455 (agosto de 1985); y Morrison Science 229: 1202-1207 (septiembre de 1985). Robinson *et al.* en la Publicación de PCT Número WO 88/04936 describen un anticuerpo quimérico con una región constante humana y una región variable murina, que tiene especificidad para un epítipo de CD20; la porción murina del anticuerpo quimérico de la referencia de Robinson procede del anticuerpo monoclonal murino 2H7 (gamma 2b, kappa). Aunque la referencia señala que el anticuerpo quimérico descrito es un “candidato excelente” para el tratamiento de trastornos de células B, esta afirmación puede considerarse como no más que una sugerencia para que los especialistas en la técnica determinen si esta sugerencia es o no exacta para este anticuerpo particular, particularmente porque la referencia carece de datos para apoyar la afirmación de eficacia terapéutica y, los que es aún más importante, de datos que utilicen mamíferos de orden superior tales como primates o seres humanos.

Las metodologías para producir anticuerpos quiméricos están disponibles para los especialistas en la técnica. Por ejemplo, las cadenas ligeras y pesadas pueden expresarse separadamente usando, por ejemplo, la cadena ligera de inmunoglobulina y las cadenas pesadas de inmunoglobulina en plásmidos separados. Éstas se pueden purificar posteriormente y ensamblar *in vitro* para formar anticuerpos completos; se han descrito metodologías para realizar tal ensamblaje. Véase, por ejemplo, Scharff, M., Harvey Lectures 69: 125 (1974). Se han descrito también parámetros de reacción *in vitro* para la formación de anticuerpos IgG a partir de cadenas ligeras y pesadas aisladas reducidas. Véase, por ejemplo, Beychok, S., Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, pág. 69, 1979. Es también posible la coexpresión de cadenas ligeras y pesadas en las mismas células para conseguir la asociación y la unión intracelular de las cadenas pesadas y ligeras para formar anticuerpos IgG H₂L₂ completos. Tal coexpresión se puede realizar usando el mismo o diferentes plásmidos en la misma célula hospedadora.

Otra estrategia y una que la estrategia más preferida para desarrollar un anticuerpo anti-CD20 quimérico no humano/humano, está basada en el uso de un vector de expresión que incluye, desde el principio, ADN que codifica las regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de una fuente humana. Tal vector permite la inserción de ADN que codifica una región variable no humana de tal manera que puede producirse una diversidad de anticuerpos anti-CD20 no humanos, someter a selección y analizar para determinar diferentes características (por ejemplo, el tipo de especificidad de unión, las regiones de unión a epítipo, etc.); posteriormente, puede incorporarse al vector ADNc que codifique las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de un anticuerpo anti-CD20 preferido o deseado. Estos tipos de vectores se denominan vectores para Expresión de Anticuerpos Quiméricos en Tándem (“TCAE”). Un vector TCAE muy preferido que se utilizó para producir anticuerpos anti-CD20 quiméricos inmunológicamente activos para el tratamiento terapéutico de linfomas es TCAE 8. El TCAE 8 es un derivado de un vector propiedad del cesionario de este documento de patente, denominado TCAE 5.2, estando la diferencia en que en TCAE 5.2, el sitio de inicio de la traducción del marcador de selección dominante (neomicina fosfotransferasa, “NEO”), es una secuencia consenso de Kozak, mientras que para TCAE 8, esta región es una secuencia consenso de Kozak parcialmente alterada. Los detalles concernientes al impacto del sitio de inicio de la traducción del marcador de selección dominante de los vectores TCAE (denominados también “vector ANEX”) con respecto a la expresión de proteínas están descritos con detalle en la solicitud en trámite junto con la presente presentada con el presente documento.

El TCAE 8 contiene cuatro (4) casetes transcripcionales y estos están en orden de tándem, es decir, una cadena ligera de inmunoglobulina humana a la que le falta una región variable; una cadena pesada de inmunoglobulina humana a la que le falta una región variable; DHFR y NEO. Cada casete transcripcional contiene su propio promotor eucariota y su región de poliadenilación (se hace referencia a la Figura 1, que es una representación en forma de diagrama del vector TCAE 8). Específicamente:

- 1) el promotor/potenciador de CMV que está delante de la cadena pesada de inmunoglobulina es una versión truncada del promotor/potenciador que está delante de la cadena ligera, desde el sitio Nhe I en -350 al sitio Sst I en -16 (véase, 41 Cell 521, 1985);
- 2) una región constante de la cadena ligera de inmunoglobulina humana se obtuvo mediante amplificación de ADNc por una reacción de PCR. En TCAE 8, ésta era la región constante kappa de la cadena ligera de inmunoglobulina humana (numeración de Kabat, aminoácidos 108-214, alotipo Km 3, (véase, Kabat, E. A. “Sequences of proteins of immunological interest”, NIH Publication, Quinta Ed. N° 91-3242, 1991)) y la región constante gamma 1 de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana (numeración de Kabat, aminoácidos 114-478, alotipo Gmlz). La cadena ligera se aisló de sangre humana normal (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA); el ARN de la misma se utilizó para sintetizar ADNc que después se amplificó usando técnicas de PCR (los cebadores se obtuvieron con relación a la secuencia consenso de Kabat). La cadena pesada se aisló (usando técnicas de PCR) del ADNc preparado a partir del ARN, que procedía a su vez de células transfectadas con un vector de IgG1 humana (véase, 3 Prot. Eng. 531, 1990; vector pN₇₁ 62). Se cambiaron dos aminoácidos en la IgG 1 humana aislada para que coincidiera con la secuencia de aminoácidos consenso de Kabat, a saber: el aminoácido 225 se cambió de valina a alanina (GTT a GCA) y el aminoácido 287 se cambió de metionina a lisina (ATG a AAG);

ES 2 321 567 T3

- 3) los casetes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana contienen secuencias señal sintéticas para la secreción de las cadenas de inmunoglobulina;
- 4) los casetes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina humana contienen sitios de restricción específicos en el ADN que permiten la inserción de regiones variables de inmunoglobulina ligera y pesada que mantienen la fase de lectura transicional y no alteran los aminoácidos encontrados normalmente en las cadenas de inmunoglobulina;
- 5) el casete de DHFR contenía su propio promotor eucariota (promotor principal de la beta globina de ratón, "BETA") y su región de poliadenilación (poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina, "BGH"); y
- 6) el casete de NEO contenía su propio promotor eucariota (BETA) y su región de poliadenilación (poliadenilación temprana de SV40, "SV").

Con respecto al vector TCAE 8 y al casete de NEO, la región de Kozak era una secuencia consenso de Kozak parcialmente alterada (que incluía un sitio Cla I cadena arriba):

ClaI -3 +1

GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt

(En el vector TCAE 5.2, el cambio está entre las regiones de Cla I y ATG, esto es: ccAcc).

La lista de secuencias completa de TCAE 8 (incluyendo los componentes específicos de los cuatro casetes transcripcionales) se muestra en la Figura 2 (SEC ID N° 1). Según se comprenderá por los especialistas en la técnica, los vectores TCAE permiten de manera beneficiosa la reducción sustancial del tiempo para producir los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos. La producción y el aislamiento de regiones variables de cadena ligera y pesada no humanas, seguido de la incorporación de las mismas al casete transcripcional constante de la cadena ligera humana y al casete transcripcional constante de la cadena pesada humana, permite la producción de anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos.

Se ha obtenido una región variable no humana muy preferida con especificidad para el antígeno CD20 usando una fuente murina y la tecnología de hibridoma. Usando las técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa ("PCR"), las regiones variables ligera y pesada murinas se clonaron directamente en el vector TCAE 8 -ésta es la vía más preferida para incorporar la región variable no humana en el vector TCAE. Esta preferencia está basada principalmente en la eficacia de la reacción de PCR y en la exactitud de la inserción. Sin embargo, están disponibles otros procedimientos equivalentes para realizar esta tarea. Por ejemplo, usando TCAE δ (o un vector equivalente), puede obtenerse la secuencia de la región variable de un anticuerpo anti-CD20 no humano, seguido de la síntesis oligonucleotídica de porciones de la secuencia o, si es apropiado, de la secuencia completa, posteriormente, las porciones o la secuencia sintética completa pueden insertarse en las posiciones apropiadas dentro del vector. Se atribuye a los especialistas en la técnica la capacidad para realizar esta tarea.

Los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos más preferidos procedían del uso del vector TCAE 8 que incluía regiones variables murinas procedentes de un anticuerpo monoclonal para CD20; este anticuerpo (se discutirá con detalle, más adelante), se denomina "2B8". La secuencia completa de las regiones variables obtenidas de 2B8 en TCAE 8 ("anti-CD20 en TCAE 8") se muestra en la Figura 3 (SEC ID N° 2).

La línea celular hospedadora utilizada para la expresión de las proteínas es muy preferiblemente de origen mamífero; se atribuye a los especialistas en la técnica la capacidad para determinar preferentemente líneas de células hospedadoras particulares que sean las más adecuadas para que se exprese en ellas el producto génico deseado. Las líneas de células hospedadoras ejemplares incluyen, pero si limitación, DG44 y DUXBII (líneas de Ovario de Hámster Chino, DHFR negativas), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con el antígeno T de SV40), R1610 (fibroblastos de hámster chino), BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/0 (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-lcIBPT (células endoteliales bovinas), RAJI (linfocitos humanos) y 293 (riñón humano). Las líneas de células hospedadoras están disponibles típicamente en servicios comerciales, en la Colección Americana de Cultivos Tisulares o en la bibliografía publicada.

Preferiblemente, la línea celular hospedadora es DG44 ("CHO") o SP2/0. Véase, Urland, G. *et al.*, "Effect of gamma rays and the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions" *Som. Cell & Mol. Gen.* 12/6: 555-566 (1986) y Shulman, M. *et al.*, "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies" *Nature* 276: 269 (1978), respectivamente. Muy preferiblemente, la línea celular hospedadora es DG44. La introducción por transfección del plásmido en la célula hospedadora puede realizarse por cualquier técnica disponible para los especialistas en la técnica. Éstas incluyen, pero si limitación, transfección (incluyendo electroforesis y electroporación), fusión celular con ADN envuelto, microinyección e infección con virus intacto. Véase, Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression

Vectors”, Capítulo 24.2, págs. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds. (Butterworths, Boston, MA, 1988). Muy preferiblemente, la introducción del plásmido en el hospedador es por electroporación.

F. Ejemplos

Los siguientes ejemplos no tienen por objeto ser, ni deben ser considerados como limitantes de la invención. Los ejemplos están destinados a evidenciar: la dosis-formación de imágenes usando un anticuerpo anti-CD20 radiomarcado (“I2B8”); el anticuerpo anti-CD20 radiomarcado (“Y2B8”); y el anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo (“C2B8”) obtenido usando un vector específico (“TCAE 8”) y las regiones variables obtenidas del anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino (“2B8”).

I. Anticuerpo anti-CD20 2B8 radiomarcado

A. Producción del Anticuerpo Monoclonal (Murino) Anti-CD20 (“2B8”)

Ratones BALB/C se inmunizaron repetidamente con la línea celular linfoblastoide humana SB (véase, Adams, R. A. *et al.*, “Direct Implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2” Cancer Res. 28: 1121-1125 (1968); esta línea celular está disponible en la Colección Americana de Cultivos Tisulares, Rockville, MD, con el número de acceso ATCC CCL 120), con inyecciones semanales a lo largo de un periodo de 3-4 meses. Se identificaron los ratones que evidenciaban títulos elevados en suero de anticuerpos anti-CD20, según se determinó por la inhibición de anticuerpos específicos para CD20 conocidos (los anticuerpos anti-CD20 utilizados fueron Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA, N° Cat. 7670; y B1, Coulter Corp., Hialeah, FL, N° Cat. N° 6602201); se extrajeron posteriormente los bazo de tales ratones. Se fusionaron células esplénicas con el mieloma de ratón SP2/0 de acuerdo con el protocolo descrito en Einfeld, D. A. *et al.* (1988) EMBO 7: 711 (SP2/0 tiene el N° de acceso de la ATCC, ATCC CRL 8006).

Los ensayos para determinar la especificidad para CD20 se realizaron mediante radioinmunoensayo. En resumen, el B1 anti-CD20 purificado se radiomarcó con I^{125} por el método de las yodoperlas como se describe en Valentine, M. A. *et al.*, (1989) J. Biol. Chem. 264: 11282. (I^{125} -Yoduro de Sodio, ICN, Irvine, CA, N° Cat. 28665H). Los hibridomas se sometieron a selección mediante coincubación de 0,05 ml de medio de cada uno de los pocillos de fusión junto con 0,05 ml del B1 anti-CD20 marcado con I^{125} (10 ng) en BSA al 1%, PBS (pH 7,4) y 0,5 ml del mismo tampón que contenía 100.000 células SB. Después de la incubación durante 1 h a temperatura ambiente, las células se recogieron por transferencia a placas de titulación de 96 pocillos (V&P Scientific, San Diego, CA) y se lavaron completamente. Los pocillos duplicados que contenían B1 anti-CD20 no marcado y pocillos que no contenían anticuerpo inhibidor se utilizaron como controles positivo y negativo, respectivamente. Los pocillos que contenían más de un 50% de inhibición se expandieron y clonaron. El anticuerpo que demostró la inhibición más elevada procedía de la línea celular clonada denominada en este documento “2B8”.

B. Preparación del Conjugado 2B8-MX-DTPA

i. MX-DTPA

Se utilizó ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietileno triaminopentaacético marcado con carbono-14 (“MX-DTPA marcado con carbono-14”) como agente quelante para la conjugación del radiomarcador a 2B8. Las manipulaciones de MX-DTPA se realizaron para mantener condiciones libres de metal, es decir, se utilizaron reactivos sin metales y, cuando fue posible, se utilizaron de forma similar recipientes de plástico de polipropileno (matraces, vasos de precipitados, probetas, puntas de pipeta) lavados con Alconox y aclarados con agua Milli-Q. El MX-DTPA se obtuvo en forma de un sólido seco del Dr. Otto Gansow (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD) y almacenado desecado a 4°C (protegido de la luz), preparándose soluciones madre en agua Milli-Q a una concentración de 2-5 mM, con almacenamiento a -70°C. El MX-DTPA se obtuvo también en Coulter Immunology (Hialeah, Florida) como la sal disódica en agua y almacenado a -70°C.

ii. Preparación de 2B8

Se preparó 2B8 purificado para conjugación con MX-DTPA transfiriendo el anticuerpo a bicina-NaOH 50 mM libre de metales, pH 8,6, que contenía NaCl 150 mM, usando intercambio de tampón repetitivo con filtros de centrifuga CENTRICON 30™ (30.000 D, PMCO; Amicon). Generalmente se añadieron a la unidad de filtración 50-200 μ l de proteína (10 mg/ml), seguido de 2 ml de tampón bicina. El filtro se centrifugó a 4°C en un rotor Sorval SS-34 (6.000 rpm, 45 min). El volumen retenido era de aproximadamente 50-100 μ l; este proceso se repitió dos veces usando el mismo filtro. El volumen retenido se transfirió a un tubo de polipropileno de 1,5 ml con tapón de rosca, se analizó para determinar proteínas, se diluyó hasta 10,0 mg/ml y almacenado a 4°C hasta su uso; la proteína se transfirió de manera similar a citrato de sodio 50 mM, pH 5,5, que contenía NaCl 150 mM y azida sódica al 0,05%, usando el anterior protocolo.

iii. Conjugación de 2B8 con MX-DTPA

La conjugación de 2B8 con MX-DTPA se realizó en tubos de polipropileno a temperatura ambiente. Las soluciones madre de MX-DTPA congeladas se descongelaron inmediatamente antes de su uso. Se hicieron reaccionar con MX-

ES 2 321 567 T3

5 DTPA 50-200 ml de proteína a 10 mg/ml a una relación molar de MX-DTPA con respecto a 2B8 de 4:1. Las reacciones se iniciaron añadiendo la solución madre de MX-DTPA y mezclando suavemente; la conjugación se dejó proceder durante una noche (14 a 20 horas), a temperatura ambiente. El MX-DTPA no reaccionado se separó del conjugado mediante diálisis o ultrafiltración repetitiva, como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo I.B.ii, en solución salina normal (0,9% p/v) libre de metales que contenía un 0,05% de azida sódica. La concentración de proteínas se ajustó a 10 mg/ml y se almacenó a 4°C en un tubo de polipropileno hasta que se radiomarcó.

iv. Determinación de la Incorporación de MX-DTPA

10 La incorporación de MX-DTPA se determinó mediante recuento de centelleo y comparando el valor obtenido con el conjugado purificado y la actividad específica del MX-DTPA marcado con carbono-[14]. Para ciertos estudios, en los que se utilizó MX-DTPA no radioactivo (Coulter Immunology), la incorporación de MX-DTPA se evaluó incubando el conjugado con un exceso de una solución portadora radioactiva de itrio-[90] de concentración y actividad específica conocidas.

15 Se preparó una solución madre de cloruro de itrio de concentración conocida en HCl 0,05 N libre de metales a la que se añadió itrio-[90] (sal de cloruro) sin vehículo. Una alícuota de esta solución se analizó mediante recuento de centelleo líquido para determinar una actividad específica exacta de este reactivo. Se añadió a un tubo de polipropileno un volumen del reactivo cloruro de itrio igual a 3 veces el número de moles de quelato que se esperaba que se uniera al anticuerpo, (típicamente 2 moles/mol de anticuerpo) y se ajustó el pH a 4,0-4,5 con acetato de sodio 2 M. Se añadió posteriormente el anticuerpo conjugado y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15-30 min. La reacción se detuvo por la adición de EDTA 20 mM a una concentración final de 1 mM y el pH de la solución se ajustó a aproximadamente pH 6 con acetato de sodio 2 M.

25 Después de una incubación de 5 min, el volumen total se purificó mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (descrita más adelante). Las fracciones eluidas que contenían proteína se combinaron, se determinó la concentración de proteínas y se ensayó una alícuota para determinar la radioactividad. La incorporación del quelato se calculó usando la actividad específica de la preparación de cloruro de itrio [90] y la concentración de proteínas.

30 v. Inmunorreactividad del 2B8-MX-DTPA

La inmunorreactividad del 2B8 conjugado se determinó usando ELISA de células completas. Células SB en fase logarítmica media se recogieron del cultivo por centrifugación y se lavaron dos veces con HBSS 1X. Las células se diluyeron hasta $1-2 \times 10^6$ células/ml en HBSS y se dividieron en alícuotas en placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos a 50.000-100.000 células/pocillo. Las placas se secaron al vacío durante 2 h a 40-45°C para fijar las células al plástico; las placas se almacenaron secas a -20°C hasta su uso. Para el ensayo, las placas se calentaron a temperatura ambiente inmediatamente antes de su uso, posteriormente se bloquearon con PBS 1X, pH 7,2-7,4 que contenía un BSA al 1% (2 horas). Las muestras para el ensayo se diluyeron en PBS 1X/BSA al 1%, se aplicaron a las placas y se diluyeron de manera seriada (1:2) en el mismo tampón. Después de incubar las placas durante 1 h a temperatura ambiente, las placas se lavaron tres veces con PBS 1X. Se añadió a los pocillos el anticuerpo secundario (50 µl de conjugado de HRP con anti-IgG1 de ratón específico de cabra) (dilución 1:1500 en PBS 1X/BSA al 1%) y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS 1X seguido de la adición de la solución de sustrato ABTS (citrate de sodio 50 mM, pH 4,5 que contenía ATBS al 0,01% y H₂O₂ al 0,001%). Las placas se leyeron a 405 nm después de 15-30 minutos de incubación. Se incluyeron en los ensayos células HSB negativas para antígeno para controlar la unión no específica. La inmunorreactividad del conjugado se calculó representando gráficamente los valores de absorbancia frente al factor de dilución respectivo y comparando los mismos con los valores obtenidos usando anticuerpo nativo (que representaba el 100% de inmunorreactividad) ensayado en la misma placa; se compararon varios valores de la porción lineal del perfil de titulación y se determinó un valor medio (datos no mostrados).

50 vi. Preparación de 2B8-MX-DTPA Marcado con Indio-[111] ("I2B8")

Los conjugados se radiomarcaron con indio [111] libre de vehículo. Una alícuota del isótopo (0,1-2 mCi/mg de anticuerpo) en HCl 0,05 M se transfirió a un tubo de polipropileno y se añadió aproximadamente un décimo de volumen de HCl 2 M libre de metales. Después de incubar durante 5 min, se añadió acetato de sodio 2 M libre de metales para ajustar la solución a pH 4,0-4,4. Se añadieron aproximadamente 0,5 mg de 2B8-MX-DTPA de una solución madre de 10,0 mg/ml de DTPA en solución salina normal o en citrato de sodio 50 mM/NaCl 150 mM que contenía azida sódica al 0,05% de y la solución se mezcló suavemente inmediatamente. El pH de la solución se comprobó con papel de pH para verificar un valor de 4,0-4,5 y la mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 15-30 min. Posteriormente, la reacción se detuvo por la adición de EDTA 20 mM a una concentración final de 1 mM y la mezcla de reacción se ajustó a aproximadamente pH 6,0 usando acetato de sodio 2 M.

Después de una incubación de 5-10 minutos, el radioisótopo que no había formado complejos se eliminó mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La unidad de HPLC consistía en un sistema de suministro de disolvente Waters Modelo 6000 o TosoHaas Modelo TSK-6110 equipado, respectivamente, con una válvula de inyección Waters U6K o Rheodyne 700. Las separaciones cromatográficas se realizaron usando una columna de permeación en gel (BioRad SEC-250; 7,5 x 300 mm o una columna TosoHaas comparable) y una pre-columna SEC-250 (7,5 x 100 mm). El sistema estaba equipado con un colector de fracciones (Pharmacia Frac200) y un supervisor UV equipado con un

filtro de 280 nm (Pharmacia modelo UV-1). Las muestras se aplicaron y eluyeron de forma isocrática usando PBS 1X, pH 7,4, a un caudal de 1,0 ml/min. Se recogieron fracciones de medio mililitro en tubos de vidrio y se recontaron alícuotas de las mismas en un contador gamma. Las ventanas inferior y superior se ajustaron en 100 y 500 KeV, respectivamente.

La radioincorporación se calculó sumando la radioactividad asociada con el pico de proteína eluido y dividiendo este número por la radioactividad total eluida de la columna; este valor se expresó después como un porcentaje (datos no mostrados). En algunos casos, la radioincorporación se determinó usando cromatografía en capa fina instantánea ("ITLC"). El conjugado radiomarcado se diluyó 1:10 ó 1:20 en PBS 1X o en PBS 1X/DTPA 1 mM, posteriormente 1 µl se depositó a 1,5 cm de un extremo de una tira de 1 x 5 cm de papel para ITLC SG. El papel se procesó mediante cromatografía ascendente usando acetato de amonio al 10% en metanol:agua (1:1; v/v). La tira se secó, se cortó por la mitad transversalmente y se determinó la radioactividad asociada con cada sección mediante recuento gamma. La radioactividad asociada con la mitad inferior de la tira (radioactividad asociada con la proteína) se expresó como un porcentaje de la radioactividad total, determinada sumando los valores de la mitad superior y de la mitad inferior (datos no mostrados).

Las actividades específicas se determinaron midiendo la radioactividad de una alícuota apropiada del conjugado radiomarcado. Este valor se corrigió por la eficacia de recuento (típicamente el 75%) y se relacionó con la concentración de proteínas del conjugado, determinada previamente por absorbancia a 250 nm y el valor resultante se expresó como mCi/mg de proteína.

Para algunos experimentos, el 2B8-MX-DTPA se radiomarcó con indio [111] siguiendo un protocolo similar al descrito anteriormente pero sin purificación por HPLC; éste se denominó protocolo de "mezcla y descarga".

vii. Preparación de 2B8-MX-DTPA Marcado con Itrio [90] ("Y2B8")

Para la preparación del conjugado 2B8-MX-DTPA marcado con itrio [90] ("Y2B8") se siguió el mismo protocolo descrito para la preparación de I2B8, excepto por que no se utilizaron 2 ng de HCl; todas las preparaciones de conjugados marcados con itrio se purificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño como se ha descrito anteriormente.

C. Estudios en Animales no Humanos

i. Biodistribución del 2B8-MX-DTPA Radiomarcado

El I2B8 se evaluó para determinar su biodistribución en tejidos de ratones BALB/c de seis a ocho semanas de edad. El conjugado radiomarcado se preparó usando 2B8-MX-DTPA de calidad clínica siguiendo el protocolo de "mezcla y descarga" que se ha descrito anteriormente. La actividad específica del conjugado era de 2,3 mCi/mg y el conjugado se formuló en PBS, pH 7,4, que contenía 50 mg/ml de HSA. A los ratones se inyectaron por vía intravenosa 100 µl de I2B8 (aproximadamente 21 µCi) y grupos de tres ratones se sacrificaron por dislocación cervical a las 0, 24, 48 y 72 horas. Después de la eutanasia, se extrajeron la cola, el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, el bazo, músculo y fémur, se lavaron y pesaron; se extrajo también una muestra de sangre para análisis. La radioactividad asociada con cada muestra se determinó mediante recuento gamma y se determinó posteriormente el porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido. No se intentó restar la contribución a la actividad representada por la sangre asociada con los órganos individuales.

En un protocolo separado, alícuotas de 2B8-MX-DTPA incubadas a 4°C y a 30°C durante 10 semanas se radiomarcaron con indio-[111] hasta una actividad específica de 2,1 mCi/mg para ambas preparaciones. Estos conjugados se usaron posteriormente en estudios de biodistribución en ratones como se ha descrito anteriormente.

Para determinaciones de dosimetría, el 2B8-MX-DTPA se radiomarcó con indio-[111] a una actividad específica de 2,3 mCi/mg y aproximadamente 1,1 µCi se inyectaron en cada uno de 20 ratones BALB/c. Posteriormente, grupos de cinco ratones cada uno se sacrificaron a 1, 24, 48 y 72 horas y sus órganos se extrajeron y prepararon para análisis. Además, se extrajeron porciones de piel, músculo y hueso y se procesaron para análisis; la orina y las heces también se recogieron y analizaron para los puntos de tiempo de 24-72 horas.

Usando una estrategia similar, el 2B8-MX-DTPA también se radiomarcó con itrio [90] y se evaluó su distribución biológica en ratones BALB/c durante un periodo de tiempo de 72 horas. Después de la purificación por cromatografía de exclusión por tamaño de HPLC, a cuatro grupos de cinco ratones cada uno se inyectó por vía intravenosa aproximadamente 1 µCi de conjugado formulado clínicamente (actividad específica: 12,2 mCi/mg); los grupos se sacrificaron posteriormente a 1, 24, 48 y 72 horas y sus órganos y tejidos se analizaron como se ha descrito anteriormente. La radioactividad asociada con cada muestra tisular se determinó midiendo la energía de la radiación de frenado con un contador de centelleo gamma. Los valores de actividad se expresaron después como porcentaje de dosis inyectada por gramo de tejido o como porcentaje de la dosis inyectada por órgano. Aunque los órganos y los demás tejidos se lavaron repetidamente para eliminar la sangre superficial, los órganos no se perfundieron. Por tanto, a los valores de actividad de los órganos no se les restó la contribución a la actividad representada por la sangre asociada internamente.

ii. Localización de I2B8 en Tumores

La localización del 2B8-MX-DTPA radiomarcado se determinó en ratones atímicos portadores de tumores de células B Ramos. Se inyectaron subcutáneamente (flanco trasero izquierdo) a ratones atímicos de seis a ocho semanas de edad 0,1 ml de RPMI-1640 que contenía $1,2 \times 10^7$ células de tumor Ramos que se habían adaptado previamente para su crecimiento en ratones atímicos. Se produjeron tumores en dos semanas y variaban en peso de 0,07 a 1,1 gramos. A los ratones se inyectaron por vía intravenosa 100 μ l de 2B8-MX-DTPA marcado con indio [111] (16,7 μ Ci) y grupos de tres ratones se sacrificaron por dislocación cervical a las 0, 24, 48 y 72 horas. Después del sacrificio, se extrajeron la cola, el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, el bazo, músculo, fémur y tumor, se lavaron y se pesaron; se extrajo también una muestra de sangre para análisis. Se determinó la radioactividad asociada con cada muestra mediante recuento gamma y se determinó el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tejido.

iii. Estudios de Biodistribución y de Localización de Tumores con 2B8-MX-DTPA Radiomarcado

Después del experimento de biodistribución preliminar que se ha descrito anteriormente (Ejemplo I.B.viii.a.), el 2B8 conjugado se radiomarcó con indio-[111] a una actividad específica de 2,3 mCi/mg y se inyectaron aproximadamente 1,1 μ Ci a cada uno de veinte ratones BALB/c para determinar la biodistribución del material radiomarcado. Posteriormente, grupos de cinco ratones cada uno se sacrificaron a 1, 24, 48 y 72 horas y se extrajeron sus órganos y una porción de piel, músculo y hueso y se procesaron para análisis. Además, se recogieron la orina y las heces y se analizaron para los puntos de tiempo de 24-72 horas. El nivel de radioactividad en sangre cayó desde el 40,3% de la dosis inyectada por gramo a 1 hora, hasta el 18,9% a las 72 horas (datos no mostrados). Los valores del corazón, riñones, músculo y bazo permanecían en el intervalo del 0,7-9,5% a lo largo del experimento. Los niveles de radioactividad encontrados en los pulmones disminuyeron del 14,2% a 1 hora hasta el 7,6% a las 72 horas; de manera similar, los valores respectivos de la dosis inyectada por gramo en el hígado eran del 10,3% y del 9,9%. Estos datos se usaron para determinar las estimaciones de dosis de radiación absorbida para I2B8 que se describen más adelante.

La biodistribución del conjugado marcado con itrio [90], con una actividad específica de 12,2 mCi/mg de anticuerpo, se evaluó en ratones BALB/c. Se obtuvieron radioincorporaciones de >90% y el anticuerpo radiomarcado se purificó por HPLC. La acumulación de radioactividad en los tejidos se evaluó en los órganos principales y en la piel, músculo, hueso y orina y heces a lo largo de 72 horas y se expresó como porcentaje de la dosis inyectada/g de tejido. Los resultados (no mostrados) mostraban que aunque los niveles de radioactividad asociada con la sangre caían desde aproximadamente el 39,2% de la dosis inyectada por gramo a 1 hora hasta aproximadamente el 15,4% después de 72 horas, los niveles de radioactividad asociados con la cola, el corazón, los riñones, el músculo y el bazo permanecían bastante constantes a un 10,2% o menos a lo largo del curso del experimento. Lo que es aún más importante, la radioactividad asociada con el hueso variaba desde el 4,4% de la dosis inyectada por gramo de hueso a 1 hora hasta el 3,2% a las 72 horas. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que poco itrio libre estaba asociado con el conjugado y que poco radiometal libre se liberó durante el curso del estudio. Estos datos se usaron para determinar las estimaciones de dosis de radiación absorbida para Y2B8 que se describen más adelante.

Para los estudios de localización de tumores, se preparó 2B8-MX-DTPA y se radiomarcó con 111 Indio a una actividad específica de 2,7 mCi/mg. Cien microlitros de conjugado marcado (aproximadamente 24 μ Ci) se inyectaron posteriormente en cada uno de 12 ratones atímicos portadores de tumores de células B Ramos. Los tumores variaban en peso de 0,1 a 1,0 gramos. En los puntos de tiempo de 0, 24, 48 y 72 horas después de la inyección, se extrajeron 50 μ l de sangre por punción retro-orbital, se sacrificaron los ratones por dislocación cervical y se extrajeron la cola, el corazón, los pulmones, el hígado, los riñones, el bazo, músculo, fémur y el tumor. Después de procesar y pesar los tejidos, se determinó la radioactividad asociada con cada muestra tisular usando un contador gamma y los valores se expresaron como porcentaje de la dosis inyectada por gramo.

Los resultados (no mostrados) mostraban que las concentraciones del 111 In-2B8-MX-DTPA en el tumor aumentaban uniformemente a lo largo del curso del experimento. El trece por ciento de la dosis inyectada se acumuló en el tumor después de 72 horas. Los niveles sanguíneos, por el contrario, cayeron durante el experimento desde más de un 30% a tiempo cero hasta el 13% a las 72 horas. Todos los demás tejidos (excepto músculo) contenían entre el 1,3 y el 6,0% de la dosis inyectada por gramo de tejido al final del experimento; el tejido muscular contenía aproximadamente el 13% de la dosis inyectada por gramo.

D. Estudios en Seres Humanos

i. 2B8 y 2B8-MX-DTPA: Estudios de Inmunohistología con Tejidos Humanos

Se evaluó la reactividad tisular del anticuerpo monoclonal murino 2B8 usando un panel de 32 tejidos humanos diferentes fijados con acetona. El anticuerpo 2B8 reacciona con el antígeno anti-CD20 que tenía un patrón muy restringido de distribución tisular, observándose solamente en un subconjunto de células de tejidos linfoides incluyendo los de origen hematopoyético.

En el ganglio linfático, se observó inmunorreactividad en una población de linfocitos B corticales maduros así como en células en proliferación de los centros germinales. Se observó también reactividad positiva en la sangre periférica, en áreas de células B de las amígdalas, en la pulpa blanca del bazo y en un 40-70% de los linfocitos medulares encontrados en el timo. Se observó también reactividad positiva en los folículos de la lámina propia (Placas

de Peyer) del intestino grueso. Finalmente, agregados o células linfoides dispersas en el estroma de diversos órganos, incluyendo vejiga, mama, cuello del útero, esófago, pulmón, parótida, próstata, intestino delgado y estómago, fueron también positivos con el anticuerpo 2B8 (datos no mostrados).

Se encontró que todas las células epiteliales simples, así como los epitelios estratificados y los epitelios de diferentes órganos, no eran reactivos. De manera similar, no se observó reactividad en células neuroectodérmicas, incluyendo las del cerebro, médula espinal y nervios periféricos. Se encontró también que los elementos mesenquimales, tales como células de músculo esquelético y de músculo liso, fibroblastos, células endoteliales y células inflamatorias polimorfonucleares, eran negativos (datos no mostrados).

La reactividad tisular del conjugado 2B8-MX-DTPA se evaluó usando un panel de dieciséis tejidos humanos que se habían fijado con acetona. Según se demostró previamente con el anticuerpo nativo (datos no mostrados), el conjugado 2B8-MX-DTPA reconocía el antígeno CD20 que mostraba un patrón de distribución altamente restringido, encontrándose solamente en un subgrupo de células de origen linfóide. En el ganglio linfático, se observó inmunorreactividad en la población de células B. Se vio una potente reactividad en la pulpa blanca del bazo y en los linfocitos medulares del timo. Se observó también inmunorreactividad en linfocitos dispersos de la vejiga, corazón, intestino grueso, hígado, pulmón y útero y se atribuyó a la presencia de células inflamatorias presentes en estos tejidos. Igual que con el anticuerpo nativo, no se observó reactividad en células neuroectodérmicas o con elementos mesenquimales (datos no mostrados).

ii. Análisis Clínico de I2B8 (Producción de Imágenes) y de Y2B8 (Terapia)

a. Estudio Terapéutico con una Única Dosis en Ensayos Clínicos de Fase I/II

Se está llevando a cabo actualmente un análisis clínico de Fase I/II de I2B8 (producción de imágenes) seguido de tratamiento con una única dosis terapéutica de Y2B8. Para el estudio de una sola dosis, se está siguiendo el esquema siguiente:

1. Recogida de Células Madre Periféricas (PSC) o de Médula Ósea (BM) con Purificación;
2. Estudios de Imagen con I2B8;
3. Terapia con Y2B8 (tres Niveles de Dosis); y
4. Trasplante de PSC o de BM Autóloga (basado, si es necesario, en un recuento absoluto de neutrófilos inferior a $500/\text{mm}^3$ durante tres días consecutivos o de plaquetas inferior a $20.000/\text{mm}^3$ sin evidencia de recuperación de médula en el examen de médula ósea).

Los Niveles de Dosis de Y2B8 son los siguientes:

Nivel de Dosis	Dosis (mCi)
1.	20
2.	30
3.	40

Tres pacientes se tienen que tratar a cada uno de los niveles de dosis con el fin de determinar una Dosis Máxima Tolerada ("DMT").

Los Estudios de Formación de Imágenes (Dosimetría) se realizan del siguiente modo: cada paciente está implicado en dos estudios de biodistribución *in vivo* usando I2B8. En el primer estudio, se administran 2 mg de I2B8 (5 mCi) como infusión intravenosa (i.v.) durante una hora; una semana más tarde se administra 2B8 (es decir, el anticuerpo no conjugado) i.v. a una velocidad que no supera 250 mg/h seguido inmediatamente de 2 mg de I2B8 (5 mCi) administrados i.v. durante una hora. En ambos estudios, inmediatamente después de la infusión de I2B8, se toman imágenes de cada paciente y la toma de imágenes se repite en el momento $t = 14-18$ h (si está indicado), $t = 24$ h; $t = 72$ h y $t = 96$ h (si está indicado). Se determinan los tiempos de retención medios del cuerpo completo para el marcador indio [111]; se realizan también tales determinaciones para los órganos reconocibles o para las lesiones tumorales ("regiones de interés").

Las regiones de interés se comparan con las concentraciones del marcador en el cuerpo completo; sobre la base de esta comparación, puede determinarse un cálculo de la localización y de la concentración de Y2B8 usando protocolos convencionales. Si la dosis acumulativa estimada de Y2B8 es mayor de ocho (8) veces la dosis de cuerpo entero calculada o si la dosis acumulativa estimada para el hígado supera 1500 cGy, no debe tener lugar el tratamiento con Y2B8.

Si los estudios de formación de imágenes son aceptables, se administran 0,0 ó 1,0 mg/kg de peso corporal del paciente de 2B8 por infusión i.v. a una velocidad que no debe superar 250 mg/h. Esto va seguido de la administración de Y2B8 (10, 20 ó 40 mCi) a una velocidad de infusión i.v. de 20 mCi/hora.

b. *Ensayo Clínico de Fase I/II: Estudio Terapéutico de Dosis Múltiples*

Actualmente se está llevando a cabo un análisis clínico de Fase I/II de Y2B8. Para el estudio de múltiples dosis, se está siguiendo el esquema siguiente:

1. Recogida de PSC o de BM;
2. Estudios de Imagen con I2B8;
3. Terapia con Y2B8 (tres Niveles de Dosis) para cuatro dosis o para una dosis acumulativa total de 80 mCi; y
4. Trasplante de PSC o de BM Autóloga (basado en la decisión del médico asistente).

Los Niveles de Dosis de Y2B8 son los siguientes:

Nivel de Dosis	Dosis (mCi)
1.	10
2.	15
3.	20

Tres pacientes se tienen que tratar a cada uno de los niveles de dosis con el fin de determinar una DMT.

Los Estudios de Formación de Imágenes (Dosimetría) se realizan del siguiente modo: una dosis preferida para los estudios de imagen del anticuerpo no marcado (es decir, 2B8) se determinará en los dos primeros pacientes. Los dos primeros pacientes recibirán 100 mg de 2B8 no marcado en 250 cc de solución salina normal a lo largo de 4 horas seguido de 0,5 mCi de I2B8 -se tomarán muestras de sangre para determinar los datos de biodistribución en los momentos $t = 0$, $t = 10$ min, $t = 120$ min, $t = 24$ h y $t = 48$ h. Los pacientes se explorarán con imágenes de gamma cámara regional múltiples en los momentos $t = 2$ h, $t = 24$ h y $t = 48$ h. Después de la exploración a $t = 48$ horas, los pacientes recibirán 250 mg de 2B8 según se ha descrito, seguido de 4,5 mCi de I2B8 -seguirán entonces la toma de sangre y la exploración como se ha descrito. Si 100 mg de 2B8 producen una mayor formación de imágenes, entonces los dos pacientes siguientes recibirán 50 mg de 2B8 como se ha descrito, seguido de 0,5 mCi de I2B8, seguido 48 horas después de 100 mg de 2B8 y posteriormente de 4,5 mCi de I2B8. Si 250 mg de 2B8 producen una mayor formación de imágenes, entonces los dos pacientes siguientes recibirán 250 mg de 2B8 como se ha descrito, seguido de 0,5 mCi de I2B8, seguido 48 horas más tarde de 500 mg de 2B8 y posteriormente de 4,5 mCi de I2B8. Los pacientes siguientes se tratarán con la cantidad más baja de 2B8 que proporciona una formación de imágenes óptima. La formación de imágenes óptima estará definida por: (1) la mejor formación de imágenes eficaz con la desaparición más lenta del anticuerpo; (2) la mejor distribución que minimice la compartimentalización en un órgano individual; y (3) la mejor resolución subjetiva de la lesión (comparación tumor/fondo).

Para los primeros cuatro pacientes, la primera dosis terapéutica de Y2B8 comenzará 14 días después de la última dosis de I2B8; para los pacientes posteriores, la primera dosis terapéutica de Y2B8 comenzará entre dos a siete días después del I2B8.

Antes del tratamiento con Y2B8, para los pacientes distintos de los cuatro primeros, se administrará 2B8 como se ha descrito, seguido de infusión i.v. de Y2B8 durante 5-10 min. Se tomarán muestras de sangre para determinar la biodistribución en los momentos $t = 0$, $t = 10$ min, $t = 120$ min, $t = 24$ h y $t = 48$ h. Los pacientes recibirán dosis repetitivas de Y2B8 (la misma dosis administrada que con la primera dosis) aproximadamente cada seis a ocho semanas durante un máximo de cuatro dosis o una dosis acumulativa total de 80 mCi. Se prefiere enormemente que los pacientes no reciban una dosis posterior de Y2B8 hasta que el número de leucocitos del paciente sea mayor que/igual a 3.000 y el de RAN sea mayor que/igual a 100.000.

Después de la finalización del estudio con tres niveles de dosis, se definirá una DMT. Se inscribirán entonces pacientes adicionales en el estudio y estos recibirán la DMT.

II. Producción del anticuerpo quimérico anti-CD20 ("C2B8")

A. Construcción del Vector de Expresión del ADN de Inmunoglobulina Quimérica Anti-CD20

Se aisló ARN de células de hibridoma de ratón 2B8 (como se describe en Chomczynski, P. *et al.*, "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction", Anal. Biochem. 162: 156-

ES 2 321 567 T3

159 (1987)) y se preparó ADNc a partir del mismo. Se aisló el ADN de la región variable de la cadena ligera de la inmunoglobulina de ratón a partir del ADNc mediante la reacción en cadena de la polimerasa, usando un conjunto de cebadores de ADN con homología con las secuencias señal de la cadena ligera de ratón en el extremo 5' y con la región J de la cadena ligera de ratón en el extremo 3'. Las secuencias de los cebadores eran las siguientes:

1. V_L con Sentido (SEC ID N° 3)

5' ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG

ATT ATC AGC TTC 3'

(La porción subrayada es un sitio Bgl II; la porción con una línea por encima es el codón de inicio).

2. V_L Antisentido (SEC ID N° 4)

5' TGC AGC ATC CGTACG TTT GAT TTC CAG CTT 3'

(La porción subrayada es un sitio Bsi WI).

Véase las Figuras 1 y 2 para los sitios Bgl II y Bsi WI correspondientes en TCAE 8 y la Figura 3 para los sitios correspondientes en el anti-CD20 en TCAE 8.

Este fragmento de ADN resultante se clonó directamente en el vector TCAE 8 delante del dominio constante de la cadena ligera kappa humana y se secuenció. La secuencia de ADN determinada para la región variable de la cadena ligera murina se muestra en la Figura 4 (SEC ID N° 5); véase también la Figura 3, nucleótidos 978 a 1362. La Figura 4 proporciona además la secuencia de aminoácidos de esta región variable murina y de las regiones CDR y flanqueantes. La región variable de la cadena ligera de ratón de 2B8 está en la familia de kappa VI de ratón. Véase, Kabat, anteriormente.

La región variable de la cadena pesada de ratón se aisló de manera similar y se clonó delante de los dominios constantes de la IgG1 humana. Los cebadores fueron los siguientes:

1. V_g con Sentido (SEC ID N° 6)

5' GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC CAG 3'

(La porción subrayada es un sitio Mlu I).

2. V_H Antisentido (SEC ID N° 7)

5' GG(G/C) TGT TGT GCTAGC TG(A/C) (A/G)GA GAC

(G/A)GT GA 3'

(La región subrayada es un sitio Nhe I).

Véase las Figuras 1 y 2 para los sitios de Mlu I y Nhe I correspondientes en TCAE 8 y la Figura 3 para los sitios correspondientes en el anti-CD20 en TCAE 8.

La secuencia de esta cadena pesada de ratón se muestra en la Figura 5 (SEC ID N° 8); véase también la Figura 3, nucleótidos 2401 a 2820. La Figura 5 proporciona también la secuencia de aminoácidos de esta región variable murina y de las regiones CDR y flanqueantes. La región variable de la cadena pesada de ratón de 2B8 está en la familia VH 2B de ratón. Véase, Kabat, anteriormente.

B. Creación de Transfectomas de CHO y SP2/0 Productores de Anti-CD20 Quimérico

Células DG44 de ovario de hámster chino ("CHO") se cultivaron en medio SSFM II sin hipoxantina ni timidina (Gibco, Grand Island, NY, N° de Formulario 91 0456PK); células de mieloma de ratón SP2/0 se cultivaron en Medio de Eagle Modificado por Dulbecco ("DMEM") (Irvine Scientific, Santa Ana, CA, N° de Cat. 9024) al que se añadió suero fetal bovino al 5% y 20 ml/l de glutamina. Cuatro millones de células se sometieron a electroporación con 25 µg de ADN plasmídico de CHO o 50 µg de ADN plasmídico de SP2/0 que se había cortado con enzimas de restricción

con Not I usando un sistema de electroporación BTX 600 (BTX, San Diego, CA) en cubetas desechables de 0,4 ml. Las condiciones fueron 210 voltios para CHO o 180 voltios para SP2/0, 400 microfaradays, 13 ohmios. Cada electroporación se sembró en seis placas de 96 pocillos (aproximadamente 7.000 células/pocillo). Se añadió a las placas medio que contenía G418 (GENETICIN, Gibco, N° de Cat. 860-1811) a 400 µg/ml de compuesto activo para CHO (el medio incluía además hipoxantina 50 µM y timidina 8 µM) o a 800 µg/ml para SP2/0, dos días después de la electroporación y posteriormente 2 ó 3 días hasta que se produjeron las colonias. El sobrenadante de las colonias se ensayó para determinar la presencia de inmunoglobulina quimérica mediante un ELISA específico para anticuerpos humanos. Las colonias que producían la cantidad más elevada de inmunoglobulina se expandieron y sembraron en placas de 96 pocillos que contenían medio más metotrexato (25 nM para SP2/0 y 5 nM para CHO) y se alimentaron cada dos o tres días. Los sobrenadantes se ensayaron igual que anteriormente y se examinaron las colonias que producían la cantidad más elevada de inmunoglobulina. El anticuerpo quimérico anti-CD20 se purificó del sobrenadante usando cromatografía de afinidad con proteína A.

El anti-CD20 quimérico purificado se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida y se estimó que tenía más de aproximadamente el 95% de pureza. Se determinaron la afinidad y la especificidad del anticuerpo quimérico sobre la base de 2B8. El anticuerpo quimérico anti-CD20 analizado en ensayos de unión directa y competitiva, cuando se comparó con el anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8, mostró una afinidad y una especificidad comparables en varias líneas de células B positivas para CD20 (datos no presentados). La constante de afinidad aparente ("K_{ap}") del anticuerpo quimérico se determinó por la unión directa del anti-CD20 quimérico radiomarcado con I¹²⁵ y se comparó con la de 2B8 radiomarcado mediante la representación gráfica de Scatchard; la K_{ap} estimada para el anti-CD20 quimérico producido por CHO fue de $5,2 \times 10^{-9}$ M y para el anticuerpo producido por SP2/0, $7,4 \times 10^{-9}$ M. La K_{ap} calculada para 2B8 era de $3,5 \times 10^{-9}$ M. Se utilizó la competición directa por radioinmunoensayo para confirmar la especificidad y la retención de inmunorreactividad del anticuerpo quimérico comparando su capacidad para competir eficazmente con 2B8. Se requerían cantidades sustancialmente equivalentes del anticuerpo quimérico anti-CD20 y del anticuerpo 2B8 para producir el 50% de inhibición de la unión a los antígenos CD20 de las células B (datos no presentados), es decir, había una pérdida mínima de actividad inhibidora de los anticuerpos anti-CD20, debido presumiblemente a la formación de quimeras.

Los resultados del Ejemplo II.B. indican, entre otras cosas, que se produjeron anticuerpos quiméricos anti-CD20 a partir de los transfectomas de CHO y SP2/0 usando los vectores TCAE 8 y que estos anticuerpos quiméricos tenían sustancialmente la misma especificidad y la misma capacidad de unión que el anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8.

C. Determinación de la Actividad Inmunológica de los Anticuerpos Quiméricos Anti-CD20

i. Análisis del C1q Humano

Los anticuerpos quiméricos anti-CD20 producidos por las líneas celulares CHO y SP2/0 se evaluaron para determinar la unión al C1q humano en un ensayo de citometría de flujo usando C1q marcado con fluoresceína (el C1q se obtuvo de Quidel, Mira Mesa, CA, N° de Prod. A400 y el marcador FITC de Sigma, St. Louis, MO, N° de Prod. F-7250; FITC). El marcaje de C1q se realizó de acuerdo con el protocolo descrito en Selected Methods In Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed. (W. H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, pág. 292). Los resultados analíticos se obtuvieron usando un citómetro de flujo FACScanTM de Becton Dickinson (fluoresceína medida a lo largo de un intervalo de 515-545 nm). Cantidades equivalentes de anticuerpo quimérico anti-CD20, de IgG1 humana, de proteína de mieloma K (Binding Site, San Diego, CA, N° de Prod. BP078) y de 2B8 se incubaron con un número equivalente de células SB positivas para CD20, seguido de una etapa de lavado con tampón FACS (BSA al 0,2% en PBS, pH 7,4, azida sódica al 0,02%) para eliminar el anticuerpo no unido, seguido de incubación con C1q marcado con FITC. Después de una incubación de 30-60 minutos, las células se lavaron de nuevo. Las tres condiciones, incluyendo C1q marcado con FITC como control, se analizaron en el FACScanTM siguiendo las instrucciones del fabricante. Los resultados se presentan en la Figura 6.

Según muestran los resultados de la Figura 6, se observó un incremento significativo de la fluorescencia solamente para la condición del anticuerpo quimérico anti-CD20; es decir, solamente las células SB con anticuerpo quimérico anti-CD20 adherente eran positivas para C1q, mientras que las demás condiciones produjeron el mismo patrón que el control.

ii. Lisis Celular Dependiente de Complemento

Los anticuerpos quiméricos anti-CD20 se analizaron para determinar su capacidad para lisar líneas celulares de linfoma en presencia de suero humano (fuente de complemento). Células SB positivas para CD20 se marcaron con ⁵¹Cr mezclando 100 µCi de ⁵¹Cr con 1×10^6 células SB durante 1 h a 37°C; las células SB marcadas se incubaron después en presencia de cantidades equivalentes de complemento humano y de cantidades equivalentes (0-50 µg/ml) de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 o de 2B8 durante 4 h a 37°C (véase, Brunner, K. T. *et al.*, "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labeled allogeneic target cells *in vitro*", Immunology 14: 181-189 (1968)). Los resultados se presentan en la Figura 7.

Los resultados de la Figura 7 indican, entre otras cosas, que los anticuerpos quiméricos anti-CD20 producían una lisis significativa (49%) en estas condiciones.

iii. Ensayo Efectador de Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos

Para este estudio, se utilizaron células positivas para CD20 (SB) y células negativas para CD20 (línea HSB de leucemia de células T; véase, Adams, Richard, "Formal Discussion", Can. Res. 27: 2479-2482 (1967); N° de depósito de la ATCC, ATCC CCL 120.1); ambas se marcaron con ^{51}Cr . El análisis se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito en Brunner, K. T. *et al.*, "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labeled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and drugs", Immunology 14: 181-189 (1968); se observó una lisis sustancial mediada por células dependiente del anticuerpo quimérico anti-CD20 de células diana SB positivas para CD20 (marcadas con ^{51}Cr) al final de una incubación a 37°C durante 4 h y este efecto se observó para los anticuerpos producidos por CHO y SP2/0 (las células efectoras eran linfocitos periféricos humanos; la proporción de células efectoras: diana fue de 100:1). La lisis eficaz de las células diana se obtuvo a 3,9 $\mu\text{g/ml}$. En contraste, en las mismas condiciones, el anticuerpo monoclonal anti-CD20 murino 2B8 tenía un efecto estadísticamente no significativo y las células HSB negativas para CD20 no se lisaron. Los resultados se presentan en la Figura 8.

Los resultados del Ejemplo II indican, entre otras cosas, que los anticuerpos quiméricos anti-CD20 del Ejemplo I eran inmunológicamente activos.

III. Reducción de células B *in vivo* usando anti-CD20 quimérico

A. Estudio en Primates No Humanos

Se llevaron a cabo tres estudios separados en primates no humanos. Por comodidad, los mismos se denominan en este documento "Anti-CD20 Quimérico: CHO y SP2/0"; "Anti-CD20 Quimérico: CHO"; y "Dosificación Elevada de Anti-CD20 Quimérico". Las condiciones fueron las siguientes:

Anti-CD20 Quimérico: CHO y SP2/0

Seis monos cinomolgos que variaban de 4,5 a 7 kilogramos de peso (White Sands Research Center, Alamogordo, NM) se dividieron en tres grupos de dos monos cada uno. Ambos animales de cada grupo recibieron la misma dosis del anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo. Un animal de cada grupo recibió anticuerpo purificado producido por el transfectoma de CHO; el otro recibió anticuerpo producido por el transfectoma de SP2/0. Los tres grupos recibieron dosificaciones de anticuerpo que correspondían a 0,1 mg/kg, 0,4 mg/kg y 1,6 mg/kg cada día durante cuatro (4) días consecutivos. El anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo, que se mezcló con solución salina estéril, se administró mediante infusión intravenosa; se extrajeron muestras de sangre antes de cada infusión. Se extrajeron muestras de sangre adicionales comenzando 24 h después de la última inyección (T=0) y posteriormente en los días 1, 3, 7, 14 y 28; se tomaron también muestras de sangre posteriormente a intervalos quincenales hasta la finalización del estudio el día 90.

Aproximadamente 5 ml de sangre completa de cada animal se centrifugaron a 2000 RPM durante 5 min. Se extrajo el plasma para el ensayo de los niveles de anticuerpo quimérico anti-CD20 soluble. El sedimento (que contenía leucocitos de sangre periférica y glóbulos rojos) se resuspendió en suero fetal de ternero para el análisis de anticuerpos marcados con fluorescencia (véase, "Marcado con Anticuerpo Fluorescente de Población de Células Linfoides", más adelante).

Anti-CD20 Quimérico: CHO

Seis monos cinomolgos que variaban de 4 a 6 kilogramos de peso (White Sands) se dividieron en tres grupos de dos monos cada uno. A todos los animales se inyectaron anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos producidos por el transfectoma de CHO (en solución salina estéril). Los tres grupos se separaron del siguiente modo: el subgrupo 1 recibió diariamente inyecciones intravenosas de 0,01 mg/kg del anticuerpo durante un periodo de cuatro (4) días; el subgrupo 2 recibió diariamente inyecciones intravenosas de 0,4 mg/kg del anticuerpo durante un periodo de cuatro (4) días; el subgrupo 3 recibió una única inyección intravenosa de 6,4 mg/kg del anticuerpo. Para los tres subgrupos, se obtuvo una muestra de sangre antes del inicio del tratamiento; adicionalmente, se extrajeron también muestras de sangre a T= 0, 1, 3, 7, 14 y 28 días después de la última inyección como se ha descrito anteriormente y estas muestras se procesaron para el análisis de anticuerpos marcados con fluorescencia (véase, "Marcado con Anticuerpo Fluorescente", más adelante). Además de la cuantificación de células B de sangre periférica, se tomaron biopsias de ganglios linfáticos los días 7, 14 y 28 después de la última inyección y se tiñó una preparación de células única para la cuantificación de las poblaciones de linfocitos mediante citometría de flujo.

Dosificación Elevada de Anti-CD20 Quimérico

Se administraron por infusión a dos monos cinomolgos (White Sands) 16,8 mg/kg de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos procedentes de los transfectomas de CHO (en solución salina estéril) semanalmente durante un periodo de cuatro semanas consecutivas. Al finalizar el tratamiento, ambos animales se anestesiaron para la extracción de médula ósea; se tomaron también biopsias de ganglios linfáticos. Ambos grupos de tejidos se tiñeron para determinar la presencia de linfocitos B usando Leu 16 mediante citometría de flujo siguiendo el protocolo descrito en Ling, N. R. *et al.*, "B-cell and plasma cell antigens", Leukocyte Typing III White Cell Differentiation Antigens, A. J. McMichael, Ed. (Oxford University Press, Oxford, RU, 1987), p. 302.

Marcaje de la Población de Células Linfoides con Anticuerpos Fluorescentes

Después de eliminar el plasma, los leucocitos se lavaron dos veces con Solución Salina Equilibrada de Hanks ("HBSS") y se resuspendieron en un volumen equivalente al plasma de suero bovino fetal (inactivado por calor a 56°C durante 30 min). Un volumen de 0,1 ml de la preparación celular se distribuyó en cada uno de seis (6) tubos de centrífuga cónicos de 15 ml; se añadieron a 3 de los tubos anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína con especificidad para los marcadores de superficie de linfocitos humanos CD2 (AMAC, Westbrook, ME), CD20 (Becton Dickinson) e IgM humana (Binding Site, San Diego, CA) para identificar las poblaciones de linfocitos T y B. Todos los reactivos habían resultado ser previamente positivos para los antígenos correspondientes de linfocitos de mono. En el cuarto tubo se midió el anticuerpo quimérico anti-CD20 unido al CD20 de la superficie de células B de mono usando anti-IgG humana de cabra policlonal acoplado con ficoeritrina (AMAC). Este reactivo se pre-adsorbió en una columna de Ig de mono-sepharose para evitar la reactividad cruzada con Ig de mono, permitiendo así la detección y la cuantificación específicas del anticuerpo quimérico anti-CD20 unido a las células. Un quinto tubo incluía reactivos anti-IgM y anti-IgG humana para la población de células B teñidas doblemente. Se incluyó una sexta muestra sin reactivos para la determinación de la autofluorescencia. Las células se incubaron con anticuerpos fluorescentes durante 30 min, se lavaron y fijaron con 0,5 ml de tampón de fijación (NaCl 0,15 M, paraformaldehído al 1%, pH 7,4) y se analizaron en un instrumento FACScan™ de Becton Dickinson. Las poblaciones linfocitarias se identificaron inicialmente mediante dispersión de la luz frontal frente a dispersión de la luz en ángulo recto en un mapa binario de una representación gráfica de manchas con leucocitos no marcados. La población total de linfocitos se aisló posteriormente discriminando todos los demás acontecimientos. Las medidas posteriores de fluorescencia reflejaban solamente acontecimientos específicos de los linfocitos seleccionados.

Reducción de Linfocitos B de Sangre Periférica

No se pudo determinar ninguna diferencia observable entre la eficacia de los anticuerpos producidos por CHO y por SP2/0 para reducir células B *in vivo*, aunque se observó un ligero incremento de la recuperación de células B que comenzaba después del día 7 para los monos inyectados con anticuerpos quiméricos anti-CD20 obtenidos de transfectomas de CHO a los niveles de dosis de 1,6 mg/kg y 6,4 mg/kg y para el mono inyectado con el anticuerpo producido por SP2/0 al nivel de dosis de 0,4 mg/kg. Las Figuras 9A, B y C proporcionan los resultados obtenidos del estudio anti-CD20 quimérico: CHO y SP2/0, con la Figura 9A dirigida al nivel de dosis de 0,4 mg/kg; la Figura 9B dirigida al nivel de dosis de 1,6 mg/kg y la Figura 9C dirigida al nivel de dosis de 6,4 mg/kg.

Como es evidente a partir de la Figura 9, hubo una espectacular disminución (>95%) de los niveles de células B periféricas después del tratamiento terapéutico a lo largo de todos los intervalos de dosis ensayados y estos niveles se mantuvieron hasta siete (7) días después de la infusión; después de este periodo, comenzó la recuperación de células B y el tiempo de inicio de la recuperación era independiente de los niveles de dosis.

En el estudio Anti-CD20 Quimérico: CHO, se utilizó una concentración de dosificación de anticuerpo 10 veces más baja (0,01 mg/kg) durante un periodo de cuatro inyecciones diarias (0,04 mg/kg en total). La Figura 10 proporciona los resultados de este estudio. Esta dosificación reducía la población de células B de sangre periférica hasta aproximadamente un 50% de los niveles normales estimados con el anti-IgM de superficie o con el anticuerpo Leu 16. Los resultados indican también que no se alcanzó la saturación del antígeno CD20 en la población de linfocitos B con el anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo a esta concentración de dosis durante este periodo de tiempo para primates no humanos; se detectaron linfocitos B revestidos con el anticuerpo en las muestras de sangre durante los tres días iniciales después del tratamiento terapéutico. Sin embargo, hacia el día 7, las células revestidas con anticuerpo eran indetectables.

La Tabla I resume los resultados de dosis individuales y múltiples del anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo sobre las poblaciones de sangre periférica; la condición de dosis única fue de 6,4 mg/kg; la condición de dosis múltiple fue de 0,4 mg/kg a lo largo de cuatro (4) días consecutivos (estos resultados procedían de los monos descritos anteriormente).

TABLA I

Población de sangre periférica del estudio en primates con C2B8

<u>Mono</u>	<u>Dosis</u>	<u>Día</u>	<u>CD2</u>	<u>Anti-IgG Hu</u>
A	0,4 mg/kg (4 dosis)	Sangre extraída antes de la inmunización	81,5	-

ES 2 321 567 T3

	<u>Mono</u>	<u>Dosis</u>	<u>Día</u>	<u>CD2</u>	<u>Anti-IgG Hu</u>
5			0	86,5	0,2
			7	85,5	0,0
			21	93,3	-
10	B	0,4 mg/kg (4 dosis)	28	85,5	-
15			Sangre extraída antes de la inmunización	81,7	-
			0	94,6	0,1
20			7	92,2	0,1
			21	84,9	-
			28	84,1	-
25	C	6,4 mg/kg (1 dosis)	Sangre	77,7	0,0
30			extraída antes de la inmunización		
			7	85,7	0,1
35			21	86,7	-
			28	76,7	-
40	D	6,4 mg/kg (1 dosis)	Sangre	85,7	0,1
45			extraída antes de la inmunización		
			7	94,7	0,1
			21	85,2	-
50			28	85,9	-

	<u>Mono</u>	<u>Anti-IgG Hu+</u> <u>Anti-IgM Hu*</u>	<u>Leu-16</u>	<u>% Reducción de</u> <u>Células B</u>
55	A	-	9,4	0
60		0,3	0,0	97
		0,1	1,2	99
		-	2,1	78
65		-	4,1	66

ES 2 321 567 T3

	<u>Mono</u>	<u>Anti-IgG Hu+</u> <u>Anti-IgM Hu*</u>	<u>Leu-16</u>	<u>% Reducción de</u> <u>Células B</u>
5	B	-	14,8	0
		0,2	0,1	99
10		0,1	0,1	99
		-	6,9	53
15	C	-	8,7	41
		0,2	17,0	0
		0,1	0,0	99
20		-	14,7	15
	D	-	8,1	62
25		0,1	14,4	0
		0,2	0,0	99
		-	9,2	46
30		-	6,7	53

35 *Población doblemente teñida que indica el grado de células B revestidas con anti-CD20 quimérico.

Los datos resumidos en la Tabla I indican que la reducción de células B en sangre periférica en las condiciones de un exceso de anticuerpos tenía lugar rápidamente y eficazmente, independientemente de los niveles de dosificación única o múltiple. Adicionalmente, la reducción se observó durante al menos siete (7) días después de la última inyección, observándose una recuperación parcial de células B el día 21.

La Tabla II resume el efecto de los anticuerpos quiméricos anti-CD20 inmunológicamente activos sobre poblaciones celulares de ganglios linfáticos usando el régimen de tratamiento de la Tabla I (4 dosis diarias de 0,4 mg/kg; 1 dosis de 6,4 mg/kg); se proporcionan también valores comparativos para ganglios linfáticos normales (mono de control, axilares e inguinales) y para médula ósea normal (dos monos).

50 (Tabla pasa a página siguiente)

55

60

65

ES 2 321 567 T3

TABLA II

Poblaciones celulares de los ganglios linfáticos

5	<u>Mono</u>	<u>Dosis</u>	<u>Día</u>	<u>CD2</u>	<u>Anti-IgM Hu</u>
	A	0,4 mg/kg (4 dosis)	7	66,9	-
10			14	76,9	19,6
			28	61,6	19,7
15	B	0,4 mg/kg (4 dosis)	7	59,4	-
			14	83,2	9,9
			28	84,1	15,7
20	C	6,4 mg/kg (1 dosis)	7	75,5	-
			14	74,1	17,9
25			28	66,9	23,1
	D	6,4 mg/kg (1 dosis)	7	83,6	-
30			14	74,1	17,9
			28	84,1	12,8
35					

TABLA II (continuación)

40	<u>Mono</u>	<u>Anti-IgG Hu+</u> <u>Anti-IgM Hu</u>	<u>Leu-16</u>	<u>% Reducción de</u> <u>Linfocitos</u>
	A	7,4	40,1	1
45		0,8	22,6	44
		-	26,0	36
50	B	29,9	52,2	0
		0,7	14,5	64
		-	14,6	64
55	C	22,3	35,2	13
		1,1	23,9	41
		-	21,4	47
60	D	12,5	19,7	51
		0,2	8,7	78
65		-	12,9	68

TABLA II (continuación)

	<u>CD2</u>	<u>Anti-IgG</u> <u>Hu+</u> <u>Anti-IgM</u> <u>Hu</u>	<u>Anti-IgM</u> <u>Hu</u>	<u>Leu-16</u>	<u>%</u> <u>Reducción</u> <u>de</u> <u>Linfocitos</u>	
5						
10						
	Ganglios					
	Linfáticos					
15	Normales					
	Control 1					
	Axilares	55,4	25,0	-	41,4	NA
20	Inguinales	52,1	31,2	-	39,5	NA
	Médula					
	Ósea					
25	Normal					
	Control 2	65,3	19,0	-	11,4	NA
30	Control 3	29,8	28,0	-	16,6	NA

Los resultados de la Tabla II demuestran la reducción eficaz de linfocitos B con ambos regímenes de tratamiento. La Tabla II indica además que en los primates no humanos, no se consiguió una saturación completa de las células B del tejido linfático con el anticuerpo quimérico anti-CD20 inmunológicamente activo; adicionalmente, se observaron células revestidas con el anticuerpo siete (7) días después del tratamiento, seguido de una notable reducción de las células B de los ganglios linfáticos, observada el día 14.

Sobre la base de estos datos, se llevó a cabo el estudio con una única Dosificación Elevada del Anti-CD20 Quimérico al que se ha hecho referencia anteriormente, principalmente con vistas a la determinación farmacológica/toxicológica. Es decir, este estudio se realizó para evaluar cualquier toxicidad asociada con la administración del anticuerpo quimérico, así como la eficacia de la reducción de células B de sangre periférica, de ganglios linfáticos y de médula ósea. Adicionalmente, debido a que los datos de la Tabla II indican que para ese estudio la mayoría de las células B de los ganglios linfáticos se redujeron entre los 7 y los 14 días después del tratamiento, un régimen de dosificación semanal podría mostrar resultados más eficaces. La Tabla III resume los resultados del estudio con Anti-CD20 Quimérico a Dosificación Elevada.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA III

Poblaciones celulares de ganglios linfáticos y de médula ósea

Poblaciones Linfocitarias (%)					
Mono	CD2	CD20 ^a	mIgM + anti-C2B8 ^b	C2B8 ^c	Día ^d
<i>Ganglio Linfático Inguinal</i>					
E	90,0	5,3	4,8	6,5	22
F	91,0	6,3	5,6	6,3	22
G	89,9	5,0	3,7	5,8	36
H	85,4	12,3	1,7	1,8	36
<i>Médula Ósea</i>					
E	46,7	4,3	2,6	2,8	22
F	41,8	3,0	2,1	12	22
G	35,3	0,8	1,4	1,4	36
H	25,6	4,4	4,3	4,4	36

^a Indica población teñida con Leu 16.^b Indica población con tinción doble, positiva para células con IgM en la superficie y para células revestidas con el anticuerpo quimérico.^c Indica tinción de la población total para el anticuerpo quimérico incluyendo células positivas para IgM en la superficie con doble tinción y células con una única tinción (negativas para IgM en la superficie).^d Días después de la inyección de la dosis final de 16,8 mg/kg.

Los dos animales evaluados a los 22 días después de la finalización del tratamiento contenían menos de un 5% de células B, en comparación con el 40% en los ganglios linfáticos de control (véase la Tabla II, anteriormente). De manera similar, en la médula ósea de los animales tratados con el anticuerpo quimérico anti-CD20, los niveles de células positivas para CD20 eran inferiores al 3% en comparación con el 11-15% de los animales normales (véase la Tabla II, anteriormente). En los animales evaluados a los 36 días después de la finalización del tratamiento, uno de los animales (H) tenía aproximadamente un 12% de células B en el ganglio linfático y un 4,4% de células B en la médula ósea, mientras que el otro (G) tenía aproximadamente un 5% de células B en el ganglio linfático y un 0,8% en la médula ósea -los datos son indicativos de una reducción significativa de células B.

Los resultados del Ejemplo III.A indican, entre otras cosas, que dosis bajas del anti-CD20 quimérico inmunológicamente activo conducen a una reducción de células B de sangre periférica de larga duración en primates. Los datos indican también que se alcanzaba una reducción significativa de las poblaciones de células B en los ganglios linfáticos periféricos y en la médula ósea cuando se administraban dosis elevadas repetidas del anticuerpo. El seguimiento continuado de los animales de ensayo ha indicado que incluso con tal importante reducción de los linfocitos B periféricos durante la primera semana de tratamiento, no se han observado efectos adversos para la salud. Además, como se observó una recuperación de la población de células B, una conclusión a extraer es que las células madre pluripotentes de estos primates no se vieron afectadas de manera adversa por el tratamiento.

B Análisis Clínico de C2B8

i. Ensayo Clínico de Fase I/II de C2B8: Estudio Terapéutico de Dosis Única

5 Quince pacientes que tenían linfoma de células B con recidiva histológicamente documentado se han tratado con C2B8 en un Ensayo Clínico de Fase I/II. Cada paciente recibió una dosis única de C2B8 en un estudio de dosis
 10 crecientes; había tres pacientes por dosis: 10 mg/m²; 50 mg/m²; 100 mg/m²; 250 mg/m² y 500 mg/m². El tratamiento fue mediante infusión a través de un filtro en línea de 0,22 micrómetros, siendo diluido el C2B8 en un volumen final de 250 cc o a una concentración máxima de 1 mg/ml de solución salina normal. La velocidad inicial fue de 50 cc/hora
 10 durante la primera hora; si no se observaba toxicidad, la velocidad de dosificación se podía incrementar hasta un máximo de 200 cc/h.

La toxicidad (según indicó el médico) varió desde “ninguna”, hasta “fiebre”, hasta “moderada” (dos pacientes), hasta “grave” (un paciente); todos los pacientes completaron el tratamiento terapéutico. Se analizaron los Linfocitos
 15 de Sangre Periférica para determinar, entre otras cosas, el impacto de C2B8 sobre las células T y sobre las células B. De manera constante para todos los pacientes, los Linfocitos B de Sangre Periférica se redujeron después de la infusión con C2B8 y tal reducción se mantuvo durante más de dos semanas.

Un paciente (que recibió 100 mg/m² de C2B8) manifestó una Respuesta Parcial al tratamiento con C2B8 (reducción
 20 de más del 50% de la suma de los productos de los diámetros perpendiculares de todas las lesiones indicadoras medibles que duraban más de cuatro semanas, durante las cuales no pueden aparecer nuevas lesiones y no pueden aumentar las lesiones existentes); al menos un paciente (que recibió 500 mg/m²) manifestó una Respuesta Menor al tratamiento con C2B8 (reducción de menos del 50% pero al menos de un 25% de la suma de los productos de los dos diámetros perpendiculares más largos de todas las lesiones indicadoras medibles). Para eficacia de la presentación,
 25 los resultados de los PBL se muestran en la Figura 14; los datos para el paciente que manifestó una RP se muestran en la Figura 14A; para el paciente que manifestó una RM, los datos se muestran en la Figura 14B. En la Figura 14, se puede aplicar lo siguiente: ■ = Linfocitos; □ = células CD3+ (células T); ▲ = células CD20+; ● = células CD19+; ⊕ = Kappa; △ = lambda y ◆ C2B8. Según se muestra, los marcadores de células B CD20 y CD19, Kappa y Lambda, se redujeron durante un periodo superior a dos semanas; aunque había una ligera reducción
 30 inicial en los recuentos de células T, estos volvieron a un nivel basal aproximado en un marco temporal relativamente rápido.

ii. Ensayo Clínico de Fase I/II de C2B8: Estudio Terapéutico con Dosis Múltiples

35 Pacientes que tenían linfoma de células B histológicamente confirmado con enfermedad progresiva medible se pueden seleccionar para estudio que está separado en dos partes: en la Fase I, que consiste en un incremento de dosis para caracterizar las toxicidades limitantes de la dosis y la determinación de un nivel de dosis tolerado biológicamente activo, grupos de tres pacientes recibirán semanalmente infusiones i.v. de C2B8 en un total de cuatro (4) infusiones se-
 40 paradas. La dosis acumulativa a cada uno de los tres niveles será del siguiente modo: 500 mg/m² (125 mg/m²/infusión); 1000 mg/m² (250 mg/m²/infusión); 1500 mg/m² (375 mg/m²/infusión). Se define una dosis tolerada biológicamente activa y se determinará, como la dosis más baja con toxicidad tolerable y actividad adecuada); en la Fase II, pacientes adicionales recibirán la dosis tolerada biológicamente activa, concediendo gran importancia a la determinación de la actividad de las cuatro dosis de C2B8.

45 IV. Terapia de combinación: C2B8 e Y2B8

Se investigó una estrategia terapéutica de combinación usando C2B8 e Y2B8 en un modelo xenográfico de ratón (ratones nu/nu, hembra, de aproximadamente 10 semanas de edad) usando un tumor linfoblástico de células B (células tumorales Ramos). Con fines comparativos, se trataron también ratones adicionales con C2B8 e Y2B8.
 50

Células tumorales Ramos (ATCC, CRL 1596) se mantuvieron en cultivo usando RPMI 1640 suplementado con un 10% de suero de ternero fetal y glutamina a 37°C y CO₂ al 5%. Los tumores se iniciaron en nueve ratones desnudos hembra de aproximadamente 7-10 semanas de edad, mediante inyección subcutánea de 1,7 x 10⁶ células Ramos en un volumen de 0,10 ml (HBSS) usando una jeringa de 1 cc con una aguja de 25 g acoplada. Todos los animales se
 55 manipularon en una campana de flujo laminar y todas las jaulas, lechos, alimento y agua se esterilizaron en autoclave. Las células tumorales se pasaron escindiendo los tumores y pasando estos a través de un tamiz de malla 40; las células se lavaron dos veces con HBSS 1X (50 ml) por centrifugación (1300 RPM), se resuspendieron en HBSS 1X a 10 x 10⁶ células/ml y se congelaron a -70°C hasta su uso.

60 Para las condiciones experimentales, se descongelaron células de varios lotes congelados, se sedimentaron por centrifugación (1300 RPM) y se lavaron dos veces con HBSS 1X. Las células se resuspendieron después a aproximadamente 2,0 x 10⁶ células/ml. A de aproximadamente 9 a 12 ratones se inyectaron 0,10 ml de la suspensión celular (s.c.) usando una jeringa de 1 cc con una aguja de 25 g acoplada; las inyecciones se realizaron en el lado izquierdo del animal, aproximadamente en la región media. Los tumores se desarrollaron en aproximadamente dos semanas. Los
 65 tumores se escindieron y procesaron como se ha descrito anteriormente. A los ratones en estudio se inyectaron como se ha descrito anteriormente 1,67 x 10⁶ células en 0,10 ml de HBSS.

Sobre la base de experimentos de dosificación preliminares, se determinó que se utilizarían para el estudio 200 mg de C2B8 y μCi de Y2B8. A noventa ratones nu/nu hembra (de aproximadamente 10 semanas de edad) se inyectaron las células tumorales. Aproximadamente diez días más tarde, 24 ratones se asignaron a cuatro grupos de estudio (seis ratones/grupo) mientras se intentaba mantener una distribución de tamaños de los tumores comparable en cada grupo (el tamaño medio del tumor, expresado como el producto de la longitud x la anchura del tumor, era de aproximadamente 80 mm²). Los grupos siguientes se trataron según se indica mediante inyecciones en la vena de la cola usando una jeringa Hamilton de 100 μl con una aguja de 25 g acoplada:

A. Solución Salina Normal

B. Y2B8 (100 μCi)

C. C2B8 (200 μg) y

D. Y2B8 (100 μCi) + C2B8 (200 μg)

Los grupos ensayados con C2B8 recibieron una segunda inyección de C2B8 (200 μg /ratón) siete días después de la inyección inicial. La medición de los tumores se realizó cada dos o tres días usando un calibre.

La preparación de los materiales de tratamiento se realizó de acuerdo con los protocolos siguientes:

A. Preparación de Y2B8

Cloruro de itrio [90] (6 mCi) se transfirió a un tubo de polipropileno y se ajustó a pH 4,1-4,4 usando acetato de sodio 2 M libre de metales. Se añadió 2B8-MX-DTPA (0,3 mg en solución salina normal; véase anteriormente para la preparación de 2B8-MX-DTPA) y se mezcló suavemente mediante agitación vortical. Después de 15 min de incubación, la reacción se inactivó por la adición de 0,05X volúmenes de EDTA 20 mM y de 0,05X volúmenes de acetato de sodio 2 M. La concentración de radioactividad se determinó diluyendo 5,0 μl de la mezcla de reacción en 2,5 ml de PBS 1X que contenía 75 mg/ml de HSA y DTPA 1 mM ("tampón de formulación"); el recuento se realizó añadiendo 10,0 μl a 20 ml de combinado de centelleo EcolumeTM. El resto de la mezcla reactiva se añadió a 3,0 ml de tampón de formulación, se filtró a esterilidad y se almacenó a 2-8°C hasta su uso. Se calculó la actividad específica (14 mCi/mg en el momento de la inyección) usando la concentración de radioactividad y la concentración de proteína calculada basada en la cantidad de anticuerpo añadida a la mezcla de reacción. Se determinó la radioactividad asociada a proteínas usando cromatografía en capa fina instantánea. La radioincorporación fue del 95%. El Y2B8 se diluyó en tampón de formulación inmediatamente antes de su uso y se filtró a esterilidad (la concentración de radioactividad final fue de 1,0 mCi/ml).

B. Preparación de C2B8

El C2B8 se preparó como se ha descrito anteriormente. El C2B8 se suministró como reactivo estéril en solución salina normal a 5,0 mg/ml. Antes de la inyección, el C2B8 se diluyó en solución salina normal hasta 2,0 mg/ml y se filtró a esterilidad.

C. Resultados

Después del tratamiento, el tamaño de los tumores se expresó como el producto de la longitud y la anchura y se tomaron las medidas los días indicados en la Figura 11 (Y2B8 frente a Solución Salina); en la Figura 12 (C2B8 frente a Solución Salina) y en la Figura 13 (Y2B8 + C2B8 frente a Solución Salina). Se determinó también el error típico.

Según se indica en la Figura 13, la combinación de Y2B8 y C2B8 mostraba efectos tumorocidas comparables a los efectos manifestados por Y2B8 o C2B8.

V. Estrategias alternativas de terapia

Las estrategias terapéuticas alternativas reconocidas a la vista de los ejemplos precedentes son evidentes. Una de tales estrategias emplea el uso de una dosis terapéutica de C2B8 seguida en una aproximadamente semana de una combinación de 2B8 y 2B8 radiomarcado (por ejemplo, Y2B8); o 2B8, C2B8 y, por ejemplo, Y2B8; o C2B8 y, por ejemplo, Y2B8. Una estrategia adicional es el uso de C2B8 radiomarcado -tal estrategia permite el uso de los beneficios de la porción inmunológicamente activa de C2B8 más los beneficios asociados con un radiomarcador. Los radiomarcadores preferidos incluyen itrio [90] dada la semivida de circulación mayor de C2B8 frente al anticuerpo murino 2B8. Debido a la capacidad de C2B8 para reducir las células B y a los beneficios obtenidos del uso de un radiomarcador, una estrategia alternativa es tratar al paciente con C2B8 (con una única dosis o con múltiples dosis) para que la mayoría de, si no todas, las células B periféricas sean reducidas. Esto estaría seguido posteriormente del uso de 2B8 radiomarcado; debido a la disminución de células B periféricas, el 2B8 radiomarcado tiene una probabilidad incrementada de dirigirse a las células tumorales. Se utiliza preferiblemente 2B8 marcado con yodo [131], dados los tipos de resultados descritos en la bibliografía con este marcador (véase Kaminski). Una preferencia alternativa implica el uso en primer lugar de 2B8 (o C2B8) radiomarcado en un esfuerzo para incrementar la permeabilidad de

un tumor, seguido de un único o múltiples tratamientos con C2B8; la intención de esta estrategia es incrementar las probabilidades de que C2B8 alcance el exterior y el interior de la masa tumoral. Una estrategia adicional implicó el uso de agentes quimioterapéuticos en combinación con C2B8. Estas estrategias incluyen los llamados tratamientos “escalonados”, es decir, el tratamiento con el agente quimioterapéutico seguido de tratamiento con C2B8, seguido de una repetición de este protocolo. Alternativamente, es viable el tratamiento inicial con una única dosis o con dosis múltiples de C2B8, seguido posteriormente por el tratamiento quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen, pero sin limitación: ciclofosfamida; doxorrubicina; vincristina y prednisona; véase Armitage, J. O. *et al.*, Cancer 50: 1695 (1982).

Las estrategias alternativas de terapia precedentes no tienen por objeto ser limitantes, sino que se presentan más bien como representativas.

VI. Información de depósito

El anti-CD20 en TCAE 8 (transformado en *E. coli* para fines de depósito) se depositó en la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, bajo las disposiciones del Tratado de Budapest para el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos al efecto de Procedimientos de Patente (“Tratado de Budapest”). El microorganismo se ensayó por la ATCC el 9 de noviembre de 1992 y se determinó que era viable en esa fecha. La ATCC ha asignado a este microorganismo el siguiente número de depósito de la ATCC: ATCC 69119 (anti-CD20 en TCAE 8). El hibridoma 2B8 se depositó en la ATCC el 22 de junio de 1993 bajo las disposiciones del Tratado de Budapest. La viabilidad del cultivo se determinó el 25 de junio de 1993 y la ATCC ha asignado a este hibridoma el siguiente número de depósito de la ATCC: HB 11388.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un anticuerpo anti-CD20 quimérico inmunológicamente activo en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de linfoma de células B, en el que el medicamento es para administración a un sujeto en una dosificación terapéuticamente eficaz única de dicho anticuerpo de 100-500 mg/m² o en dosificaciones semanales terapéuticamente eficaces múltiples de dicho anticuerpo de 100-500 mg/m².

2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 4.

3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada cuya secuencia de aminoácidos está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se muestra en la Figura 5.

4. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 4 y la región variable de cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 5.

5. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el anticuerpo comprende regiones constantes humanas.

6. Uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el anticuerpo comprende además un marcador radioactivo.

7. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el marcador radioactivo es itrio-[90].

8. Uso de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el marcador radioactivo es yodo-[131].

9. Un anticuerpo anti-CD20 quimérico inmunológicamente activo para el uso en un método para el tratamiento de linfoma de células B, comprendiendo el método la administración de dicho anticuerpo a un sujeto en una dosificación terapéuticamente eficaz única de dicho anticuerpo de 100-500 mg/m² o en dosificaciones semanales terapéuticamente eficaces múltiples de dicho anticuerpo de 100-500 mg/m².

10. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, donde el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 4.

11. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, donde el anticuerpo comprende la región variable de cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos está codificada por la secuencia de ácido nucleico como se muestra en la Figura 5.

12. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 9, donde el anticuerpo comprende la región variable de cadena ligera, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 4 y la región variable de cadena pesada, cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 5.

13. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el anticuerpo comprende regiones constantes humanas.

14. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde el anticuerpo comprende además un marcador radioactivo.

15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el marcador radioactivo es itrio-[90].

16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 14, en el que el marcador radioactivo es yodo-[131].

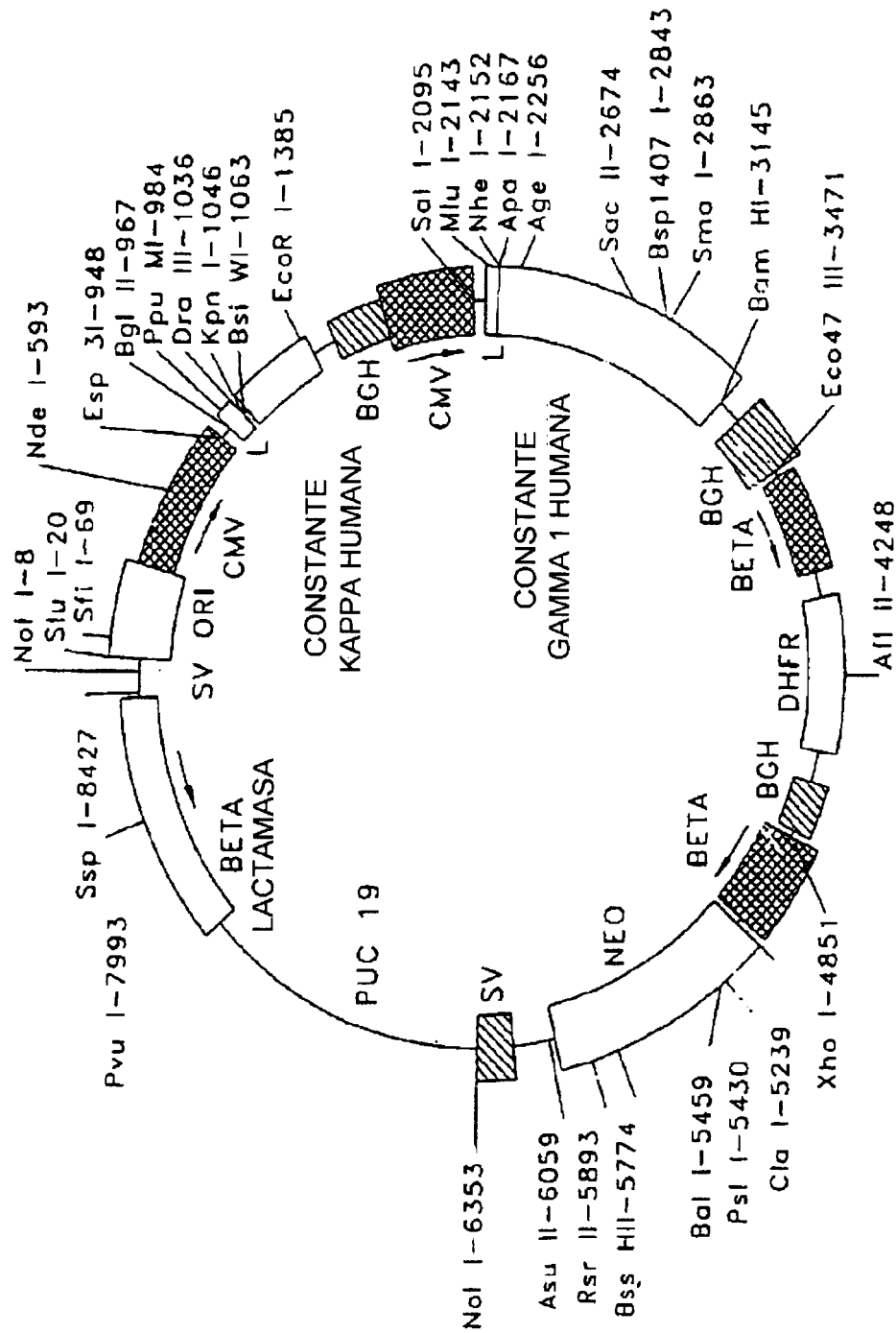


FIG. 1

ES 2 321 567 T3

ENLAZADOR #1 15 pb | ORIGEN SV40 = 332 pb

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60

AGGCCGAGGC GGCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCLA TGCATGGGCT 120

GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CGGAGTTAGG GGGGGGATG GGGGAGTTAG GGGCGGGACT 180

ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGAATAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300

GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAAT TAATTCCCTT 360

AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG 480

PROMOTOR-POTENCIADOR DE CMV = 567 pb

ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTTGGCAGTAC ATCAAGTSTA TCATATGCCA 600

AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660

ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACG 720

ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840

GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900

ENLAZADOR #3=78 pb

CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACCTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960

Bgl II

CATCACAGAT CTCTACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020

+1 101 102

CTCCAGGTG CACGATGTA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AAGTACGGT GGCTGCACCA 1080

1038 9 1062 3 Bsi VI

LÍDER = 60 pb

TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG 1140

TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC 1200

CONSTANTE KAPPA HUMANA 324 pb 107 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN

CTCCAATCGG GTAACCCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260

AGCCTCAGCA GCACCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320

TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CTTGAGCTCG CCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380

TERMINACIÓN DE CADENA

LIGERA | Eco RI

ENLAZADOR #4 = 85 pb

TGTGAAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTT GACAACATGC 1440

1386 7

GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500

1471 2

FIG. 2A

ES 2 321 567 T3

GTTTGCCCCC CCCCCGTGCC TTCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCTTTCC 1560
 BGH poli A = 231 pb
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1520
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680
 ENLAZADOR #5 = 15 pb
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC ACTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACC CCCCCTATTG 1740
 1702 13 1717 18
 ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCCGCCGTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800
 TTCTACTTGG CAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 1860
 PROMOTOR-POTENCIADOR DE CMV = 334 pb
 GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACC GGGATTTCCT AGTCTCCACC 1920
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 1980
 GTAACAATC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040
 ENLAZADOR #6 = 7 pb
 TAAGCAGAGC TGGGTACCTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCCGAC 2100
 2051 12 2058 19 Sal I
 ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCCTGTGTG CTACCGGTGT GCTAGCACC 2160
 LíDER = 51 pb Mlu I 2151 12 Nhe I
 INICIO DE CADENA PESADA -5 -4 -3 114 115
 AAGGGCCCAT CCGTCTTCCC CCGGCCACC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG 2220
 GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGAAGTACTT CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAATCA 2280
 GGGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCIC AGGACTC:AN 2340
 CONSTANTE GAMMA 1 HUMANA
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTCG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400
 993 pb = 330 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 AACGTGAATC ACAAGCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460
 GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAATC 2520
 TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACT 2580
 TGGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCGGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640
 GGGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700
 CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAATACAAG 2760
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820
 GGGCAGCCCC GAGAAACACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGGATGA GGTGACCAGG 2880
 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CCGCGTGGAG 2940
 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 3000

FIG. 2B

GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
 TERMINACIÓN DE CADENA PESADA Bam HI ENLAZADOR #7 = 81 pb
 CTCTCCCTGT CTCGGGTAA ATCAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
 TCGTGACAAC ATCGGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTGCACTGTG CTTTCTAGTT 3240
 GCCAGCCATC TGTSTTTGC CCGTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCCTGGAA GGTGCCACTC 3300
 REGIÓN DE POLIADENILACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA = 231 pb
 CCACTGTCTT TCCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360
 CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA 3420
 GGCATGCTGG GGATCGGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGA-TCT 3480
 ENLAZADOR #8 = 34 pb
 CCCGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTCTT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 3540
 AATTTTAAAC CCAATTCACT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
 PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATÓN = 366 pb
 AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
 GACTCCTAAG CCACTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTCCTT 3840
 ENLAZADOR #9 = 19 pb DHFR NO TRADUCIDO 5' = 82 pb
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCCGCC 3900
 CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCGGC TGCCATCATT 3960
 INICIO DE DHFR
 GTTCGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACCGA 4020
 GACCTACCCT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAA GACCACAACC 4080
 TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140
 DHFR DE RATÓN = 564 pb = 187 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200
 GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260
 GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGG TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
 TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
 GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
 GAATACCCAG GCGTCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

FIG. 2C

TERMINACIÓN DE DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGACTA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTECTAAAG 4560
 4521¹ 2

DHFR NO TRADUCIDA 3' = 82 pb
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCTT CGACTGTCTT 4620
 4603¹ 4 4613¹ 4

ENLAZADOR #10 = 10pb
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTCGAAGG 4680

REGIÓN DE POLIADENILACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA = 231 pb
 TGGCACTCCC ACTGTCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAAT GCATCGCAT GTCTGAGTAG 4740

GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800

ENLAZADOR #11 = 17 pb
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTGGAGCTAC 4860
 4844¹ 5

TAGCTTTGCT TCTCAATTC TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTTAAC 4920

ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980

PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATÓN = 366 pb
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040

GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATTC 5100

CGTAGAGCCA CACCTTGGA AGGCCCAATC TGCTACACA GGATAGAGAG GGCAGGAAGC 5160

AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220

ENLAZADOR #12 = 21 pb INICIO DE NEO
 TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GGTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTT 5280
 5227¹ 8 5248¹ 9

TCCGGCCGCT TGGGTGCAGA GGCTATTGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340

CTCTGATGCC GCGGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGGCG CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400

NEOMICINA FOSFOTRANSFERASA
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAAGTGA GGACGAGGA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460

795 pb = 264 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 CACGACGGGC GTTCCTTGGC CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAECGG GAAGGGACTG 5520

GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCCTGCCGA 5580

GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CCGCTACCTG 5640

CCCATTCCAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAECGG 5700

TCTTGTCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760

CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820

CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880

GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGAIA TTGCTGAAGA 5940

GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGTTTCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCGCGATTC 6000

FIG. 2D

TERMINACIÓN DE NEOI

GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC TGAAGCCGGAC TCTGGGGTTC 6060
 6043 4

GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCACGAG ATTTCGATTC CACCGCCGCC 6120

NEO NO TRADUCIDA 3' = 173 pb

TTCTATGAAA GGTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180

CCCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTATTATTC AGCTTATAAT 6240
 6216 7

GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT 6300

TEMPRANO DE POLIA DE SV40 = 133 pb

TCTAGTTGTG GTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGCTGGAT CGCGGCCGC 6360
 6349 50

ATCCCGTCCA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420
 6368 9

CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCC 6480

AATGAGTGAG CTAATCACA TTAATTGGCT TGGGCTCACT GCCCGCTTC CAGTCGGGA 6540

ACCTGTCTGT CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGGCG GGGGAGACCG GGTTTGCGTA 6600

PVC 19

TTGGGCGCTC TTCCGCTTC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTGT CCGCTGCGGC 6660

GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720

CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCCGCT 6780

6792 = ORIGEN DE REPLICACIÓN BACTERIANO

TGCTGGCGTT TTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCA 6840

GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT 6900

CCCTCGTGCG CTCTCTGTT CCGACCTGCG CGCTTACCG ATACCTGTCC GCCTTCTCC 6960

CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020

TCGTTGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCAGC AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCT 7080

TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140

CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200

AGTGGTGCC TAACACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTGTGCTGA 7260

AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG 7320

GTAGCGGTGG TTTTTTTTGT TGCAAGCAGC AGATTACCGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380

AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAA TCACGTTAAG 7440

GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

FIG. 2E

TERMINACIÓN DE BETA LACTAMASA

GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 7560
 TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCC TTCATCCATA GTTGCCTGAC 7620
 TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACCGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
 TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740
 BETA LACTAMASA = 861 pb
 GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800
 286 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGGCC 7860
 TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920
 CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
 TCGGTCTCTC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG 8040
 CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100
 AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGACAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCCG 8160
 CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220
 AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCCGATGT 8280
 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGGGT 8340
 GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 8400
 INICIO DE BETA LACTAMASA
 GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460
 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
 TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

FIG. 2F

ENLAZADOR #1 = 15 pb
 GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
 15 6
 AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCACCCA TGCATGGGG 120
 ORIGEN SV40 = 332 pb
 GGAGAATGGG CGGAACGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACACAAAT TAATTCCCT 360
 347 8 ENLAZADOR #2=13 pb
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCTATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
 PROMOTOR-POTENCIADOR DE CMV = 567 pb
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTAT TGGCCAGTAC 660
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
 ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
 TTTCGAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
 GACTTTCCAA AATGTCTGTA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
 CCGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGTTGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
 927 8 934 5 ENLAZADOR #3=7pb
 Bgl 2 INICIO DE CADENA LIGERA LÍDER NATURAL = 66 pb
 CATCACAGAT CTCTCACTAT GATTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCTT GCTAATCAGT 1020
 978 9
 GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGCAAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTET 1080
 1044 5 +1
 GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140
 CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GCATTTATGC CACATCCAAC 1200
 REGIÓN VARIABLE DE CADENA LIGERA 318 pb-106 AMINOÁCIDOS
 CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTA CTCTCTTC 1260
 ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
 AACCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACCTT GGCTGCACCA 1380
 1362 3 BsiWI
 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACATC CTCTGTGTGT 1440
 TGCTCTCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC 1500

FIG. 3A

ES 2 321 567 T3

CONSTANTE KAPPA HUMANA = 324 pb = 107 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1560
 AGCCTCAGCA GCACCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTAG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620
 TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCAAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1680
 TERMINACIÓN
 CADENA
 LIGERA) Eco RI ENLAZADOR #4 = 81 pb
 TGTTCGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1740
 1646 7
 GGGCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800
 1771 12
 GTTGTCCCTT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCCTTTCC 1860
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTTG CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGT 1920
 REGIÓN DE POLIADENILACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA = 231 pb
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1980
 ENLAZADOR #5 = 15 pb
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040
 2002 3 2017 8
 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGGTAT TACCATGGTG ATGGGGTTTT 2160
 PROMOTOR-POTENCIADOR DE CMV = 334 pb
 GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCAG GGGATTCCA AGTCTCCACC 2220
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280
 GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2340
 ENLAZADOR #6 = 7 pb
 TAAGCAGAGC TGGGTACCTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCCAC 2400
 INICIO DE 2351 2 2358 9
 CADENA PESADA LÍDER SINTÉTICO Y NATURAL Mlu I 2457 8
 ATGGGTGGGA GCCTCATCTT GCTCTTCTT GTGGCTGTG CTACCGGTGT CCTGTCCAG 2460
 2401 -5 -4 -3 -2 -1 +1
 GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520
 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580
 VARIABLE DE CADENA PESADA = 363 pb = 121 AMINOÁCIDOS
 GGTCGGGGCC TGGAAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2640
 CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700
 CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760
 TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 2820
Nhe I
 GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880
 GCCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCCTT GACGGTGTCG 2940
 CONSTANTE GAMMA 1 HUMANA = 993 pb
 TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCA 3000

FIG. 3B

330 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN

GGACTCTACT CCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060

TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAATAA AGCAGAGCCC 3120

AAATCTTGTG AAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180

CCGTCACTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240

GAGGTCACAT GCGTGGTGGT CGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300

TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360

AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCTTGACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420

GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480

AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG 3540

CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600

GCGGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660

CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720

CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780

TERMINACIÓN DE CADENA PESADA (Bam HI) ENLAZADOR #7 = 81 pb

CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840
3813'4

AGACTGGATT CGTGACAACA TCGGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TGCACTGTGC 3900
3894'5

CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960

GTGCCACTCC CACTGTCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020

REGIÓN DE POLIADENILACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA = 231 pb

GGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080

ENLAZADOR #8 = 34 pb

ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC 4140
4125'6

GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200

AGGAAAATTA ATTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260

PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATÓN = 366 pb

ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTGAG AGGGAGTACC 4320

CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380

ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGTAAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440

ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCTCA 4500

FIG. 3C

ES 2 321 567 T3

CATTTGCTTC TGACATAGTT ^{ENLAZADOR #9 = 19 pb} ^{DHFR NO TRADUCIDA 5' = 82 pb}
 GTGTGGGAG CTTGGATAC ^{4525 6} TTGGACAGCT CAGGGCTGCC 4560
 ATTTCGGCC AAACCTGACG GCAATCCTAG CGTGAAGGC ^{4544 5} GGTAGGATTT TATCCCCGCT 4620
^{INICIO DE DHFR}
 GCCATC ^{4526 7} ATCG TTCGACCATT GAACTGCATC GTCGCCGTGT CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680
 AAGAACGGAG ACCTACCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAAGAATG 4740
 ACCACAACCT CTTCACTGGA AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAAACCTGG 4800
^{DHFR = 564 pb = 187 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN}
 TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860
 GAACTCAAAG AACCACCACG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGGG TGATGCCTTA 4920
 AGACTTATTG AACAACCGGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980
 AGTCTCTTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040
 ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTGGG CAAATATAAA 5100
 CTTCTCCCAG AATACCCAGG CGTCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT 5160
^{TERMINACIÓN DE DHFR} ^{DHFR NO TRADUCIDA 3' = 82 pb}
 AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA ^{5140 1} CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220
^{ENLAZADOR #10}
 CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GGTGGCTTTA ^{5272 3} CATCAGCCTC 5280
^{= 10 pb}
 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTGTGCCC TCCCCGTGC CTTCTTGA 5340
^{POLIADENILACIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO BOVINA = 231 pb}
 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG 5400
 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460
^{ENLAZADOR #11}
 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGAAC ^{5513 4} CAGCTGGGGC 5520
^{= 17 pb}
 TCGAGCTACT ^{5530 1} AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTCCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 5580
 AATTTTAAAC CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 5640
^{PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATÓN = 366 pb}
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5700
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760
 GCCTGATTC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGC 5820
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCTC ACATTGCTT 5880
^{ENLAZADOR #12 = 21 pb} ^{INICIO DE NEO}
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA ^{5896 7} GCTTGGATCG ATCCTCTT ^{5917 8} GTTGAACAA ATGGATTGCA 5940
 CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

FIG. 3D

ES 2 321 567 T3

AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGTTCTTTT 6060
 NEOMICINA FOSFOTRANSFERASA = 795 pb = 264 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120
 GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGCG 6180
 AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC 6240
 TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300
 GGCTACCTGC CCATTGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360
 GGAAGCCCGT CTTGTGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420
 CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCGCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480
 TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTTCATCGA 6540
 CTGTGGCCCG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600
 TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660
 TCCCGATTCC CAGCCCATCG CTTCTATCG CTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGAAT 6720
 CTGGGGTTCG AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCAGGAGA TTTCGATTCC 6780
 NEO NO TRADUCIDA 3' = 173 pb
 ACCGCCGECT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG 6840
 ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCTAACTT GTTTATTGCA 6900
 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAATTC TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960
 REGIÓN DE POLIADENILACIÓN TEMPRANA SV40 = 133 pb
 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGCTGGATTC 7020
 ENLAZADOR #13 = 19 pb
 GCGGCGCGCA TCCCGTCCAG AGCTTGCGGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGGCTT 7140
 GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCT 7200
 AGTCGGGAAA CCTGTCTGTC CAGCTGCATT AATGAATGGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 7260
 GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGCTTC 7320
 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380
 GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440
 7461 = ORIGEN DE REPLICACIÓN BACTERIANO
 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

FIG. 3E

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAAG GCGTTTCCCC 7560
 CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
 CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACCGTGTAGG TATCTCAGTT 7580
 CCGTGTAGGT CGTTCCGCTC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCACC 7740
 GCTGCCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800
 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA CCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG GACAGTATTT GGTATCTCGG 7920
 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAAACAA 7980
 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGGC AGAAAAAAG 8040
 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 8100
 CACGTTAAGG GATTTTGGT ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCTTTTAA 8160
 ATTA AAAATG AAGTTT TAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 8220
 DE BETA LACTAMASA, TERMINACIÓN
 ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTCTGT TCATCCATAG 8280
 TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340
 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTATCA GCAATAAACC 8400
 BETA LACTAMASA = 861 pb = 286 AMINOÁCIDOS & CODÓN DE TERMINACIÓN
 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAACTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460
 CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCCCAACG 8520
 TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CAGGCTCGTC GTTGGTATG GCTTCATTCA 8580
 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640
 TTAGCTCCTT CGGTCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCCGAGTG TTATCACTCA 8700
 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCAAGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
 TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820
 CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880
 TCATTGGAAA ACCTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
 GGTGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000
 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060
 GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120
 ATTGTETCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTIACAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC 9180
 CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

FIG. 3F

LÍDER

															-20																-15																-10																																																
FASE 1 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Val																ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA GTC																																																																															
															987																996																1005																1014																1023																
															-5																-1	+1	FRI																														10																																
Ile Met Ser Arg Gly																CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA																ATC CTG TCT GCA TCT																																																															
															1038																1047																1056																1065																1074																1095
																														20																23	24	CDR1															27	29	30																34														
Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His																CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATC CAC																																																																															
															1095																1104																1113																1122																1131																1140
															35	FR2															40																45																49	50	CDR2																														
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn																TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC																																																																															
															1152																1161																1170																1179																1188																1197
															55	56	57																60	FR3															65																70																														
Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser																CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT																																																																															
															1209																1218																1227																1236																1245																1254
															75																80																85																88	89	90																														
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp																CTC ACC ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG																																																																															
															1266																1275																1284																1293																1302																1311
															CDR3															95	97	98	FR4															105															107																																
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys																ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA																																																																															
															1323																1332																1341																1350																1359																

LÍDER																			
-19					-15					-10					-5				
FASE 1	Met	Gly	Trp	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Arg	Val		
	ATG	GGT	TGG	AGC	CTC	ATC	TTG	CTC	TTC	CTT	GTC	GCT	GTT	GCT	ACG	CGT	GTC		
				2409			2418			2427			2436			2445			
-1					+1					10					15				
Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	
CTG	TCC	CAG	GTA	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCC	TCA	
		2460			2469			2478			2487			2496			2505		
20					25					30					31 CDR1				
Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp	
GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACA	TTT	ACC	AGT	TAC	AAT	ATG	CAC	TGG	
		2517			2526			2536			2544			2553			2562		
40 FR2					45					49					50 52 52A 53 54				
Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	
GTA	AAA	CAG	ACA	CCT	GGT	CGG	GGC	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	GCT	ATT	TAT	CCC	GGA	AAT	
		2574			2583			2592			2601			2610			2619		
55 CDR2					60					65					66 FR3				
Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	
GGT	GAT	ACT	TCC	TAC	AAT	CAG	AAG	TTC	AAA	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GCA	GAC	AAA	
		2631			2640			2649			2658			2667			2676		
75					80					82 82A 82B 82C 83					85				
Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	
TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC	
		2688			2697			2706			2715			2724			2733		
90					94 95 CDR3					100 100A 100B 100C 100D 101					102 103				
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly	
TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	TCC	ACT	TAC	TAC	GGC	GGT	GAC	TGG	TAC	TTC	AAT	GTC	TGG	GGC	
		2745			2754			2763			2772			2781			2790		
105 FR4					110					113									
Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala											
GCA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCT	GCA											
		2802			2811			2820											

FIG. 5

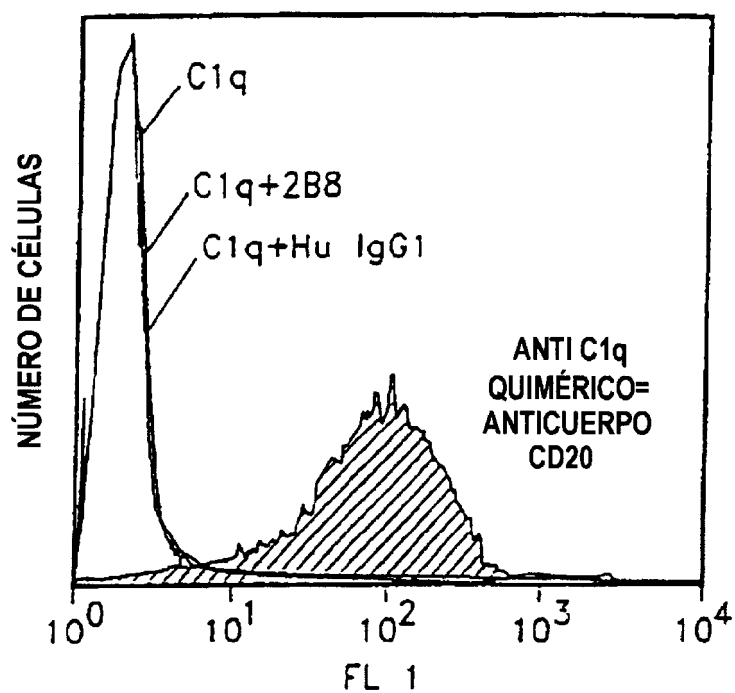


FIG. 6

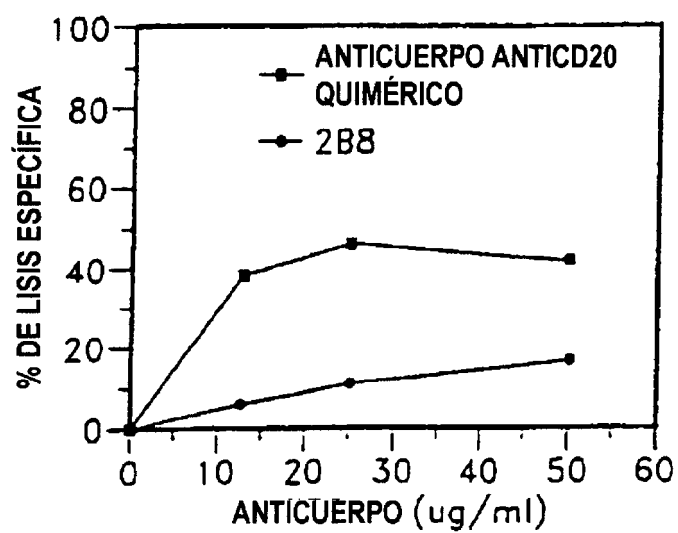


FIG. 7

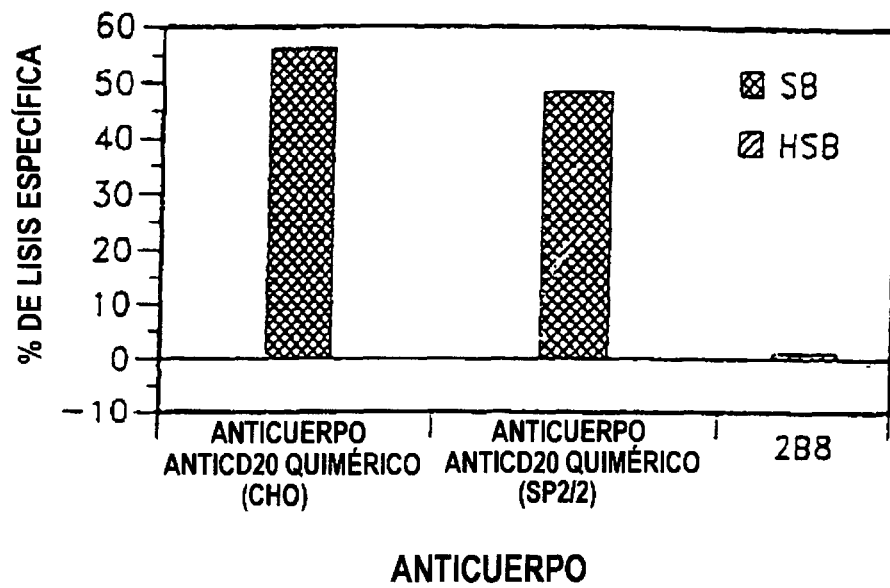


FIG. 8

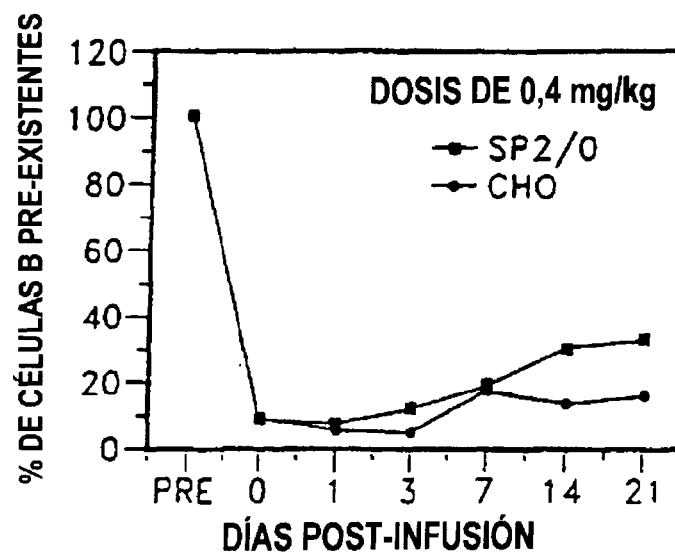


FIG. 9A

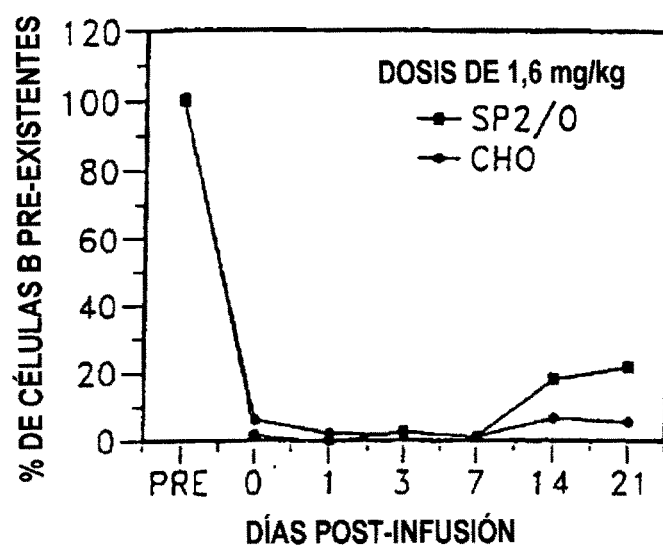


FIG. 9B

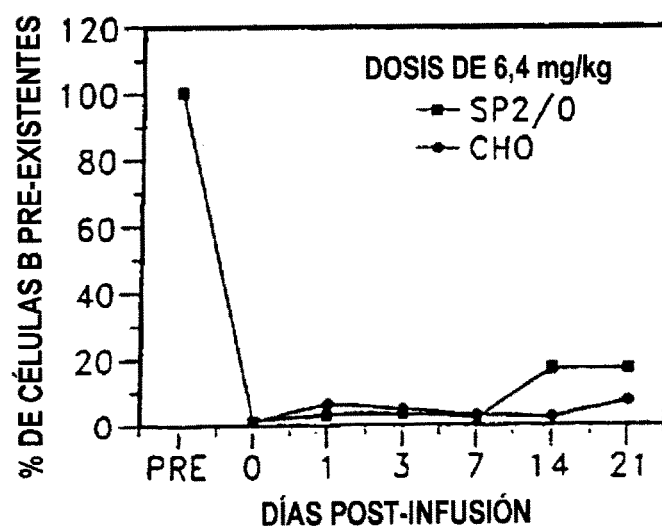


FIG. 9C

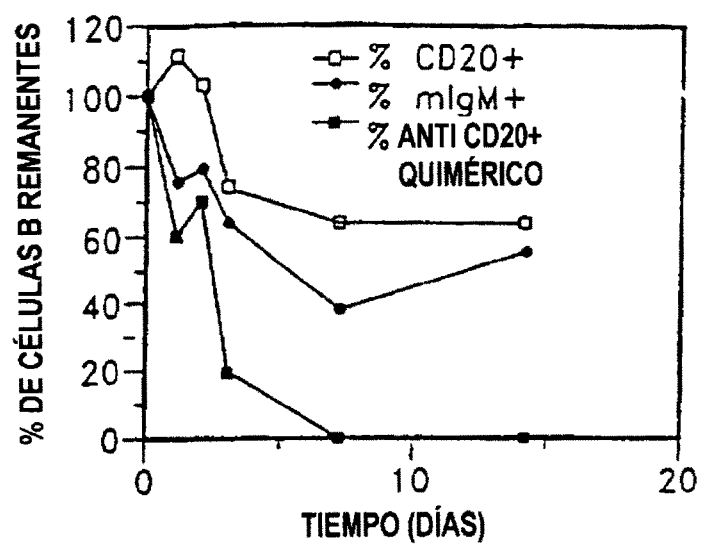


FIG. 10

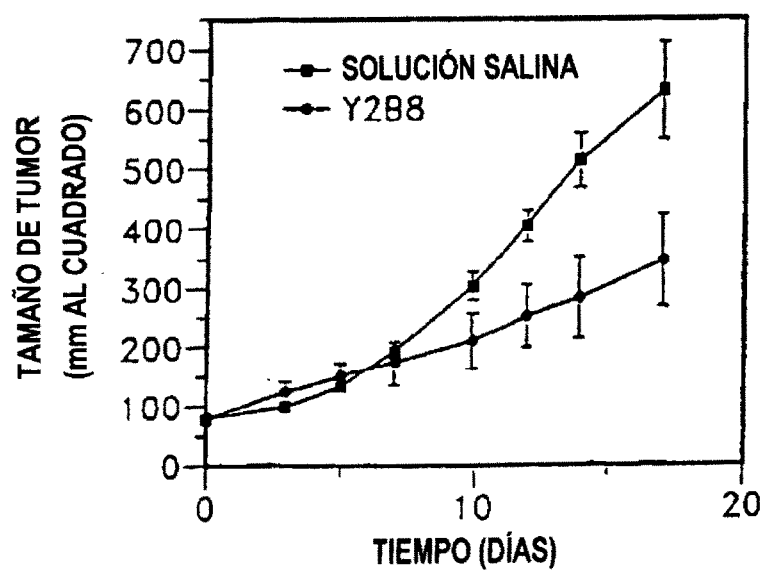


FIG. 11

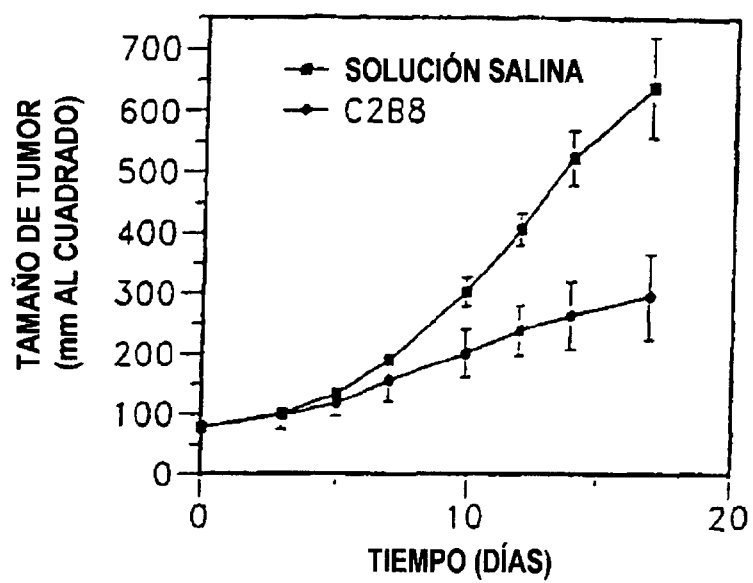


FIG. 12

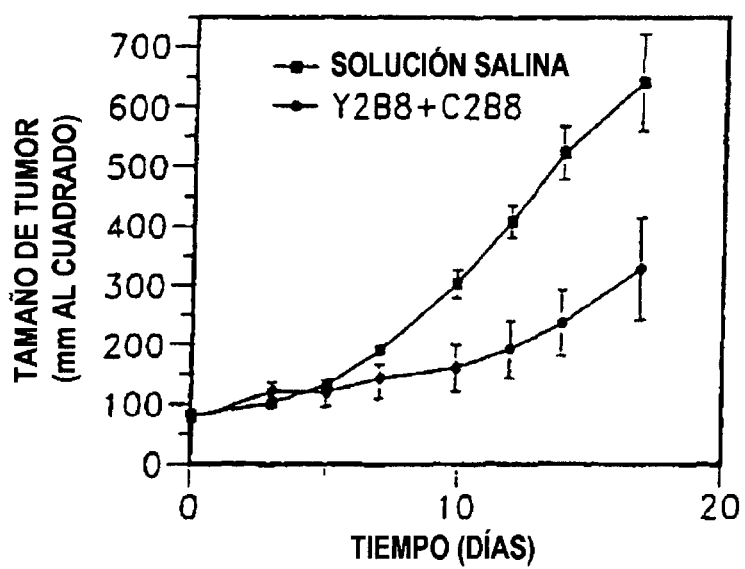


FIG. 13

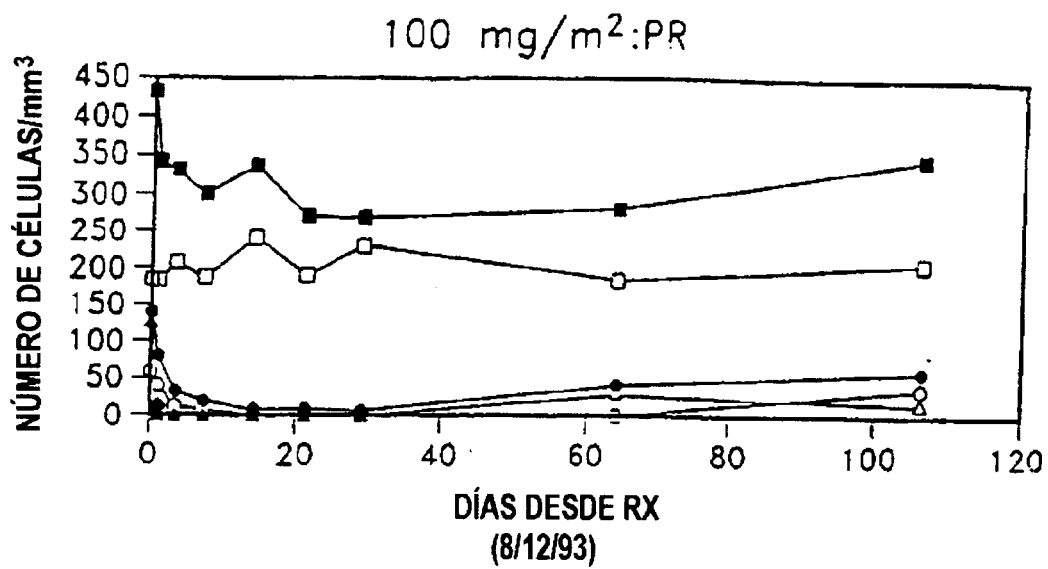


FIG. 14A

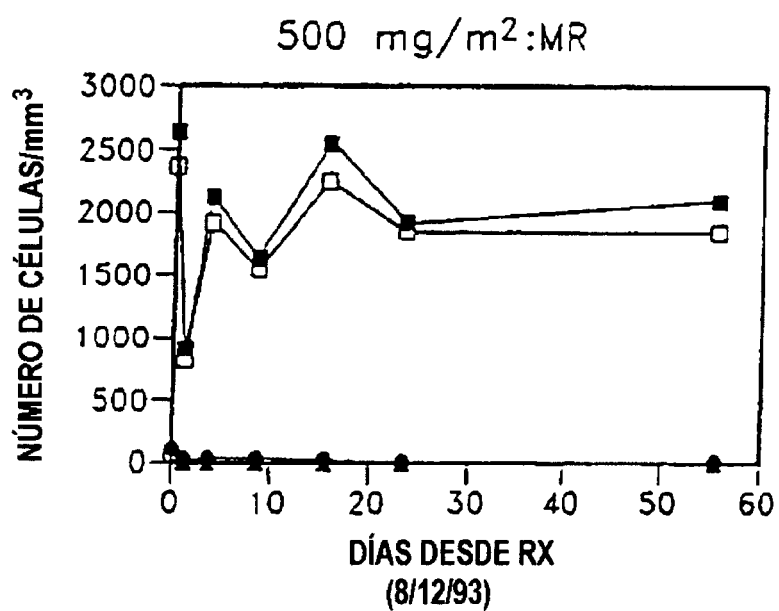


FIG. 14B

ES 2 321 567 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> IDEC Pharmaceuticals Corporation
 Anderson, Darrell R.
 5 Hanna, Nabil
 Leonard, John E.
 Newman, Roland A.
 Reff, Mitchell E.
 Rastetter, William H.
 10

<120> Aplicación Terapéutica de Anticuerpos Quiméricos a Antígeno de Diferenciación Restringido a Linfocitos B
 Humanos para el Tratamiento de Linfoma de Células B

15 <130> SMW/FP6240618

<140> EP 99123967.4
 <141> 12-11-1993

20 <150> EP 96200772.0
 <151> 12-11-1993

25 <150> EP 94901444.3
 <151> 12-11-1993

<150> PCT/US93/10953
 30 <151> 12-11-1993

<150> US 08/149.009
 <151> 03-11-1993

35 <150> US 07/978.891
 <151> 13-11-1992

40 <160> 11

<170> Patent In Release #1.0, Versión #1.30

45 <210> 1
 <211> 8540 pares de bases
 <212> ADN
 <213> Artificial

50 <223> ADN genómico, monocatenario, circular
 <400> 1

	GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG	60
55	AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC	120
	GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT	180
	ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	240
60	GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTGTCATACT TCTGCCTGCT	300
	GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT	360
	AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCGGC	420
65	GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG	480
	ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA	540

ES 2 321 567 T3

	TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA	600
	AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGGCCAGTAC	660
5	ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC	720
	ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA	780
10	TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG	840
	GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA	900
	CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC	960
15	CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG	1020
	CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA	1080
20	TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACTGC CTCTGTTGTG	1140
	TGCCTGTGTA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAGGT GGATAACGCC	1200
	CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC	1260
25	AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC	1320
	TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG	1380
30	TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC	1440
	GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT	1500
	GTTTGCCCTT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCTTTCC	1560
35	TAATAAAATG AGGAAATGTC ATCGCATTTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT	1620
	GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT	1680
40	GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG	1740
	ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT	1800
	TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT	1860
45	GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC	1920
	CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC	1980
50	GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA	2040
	TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC	2100
	ATGGGTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CGCTAGCACC	2160
55	AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG	2220
	GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTIONTCCC GAACCCGG TGACGGTGTC GTGGAACTCA	2280
60	GGCGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC	2340
	TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC	2400
65	AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT	2460

ES 2 321 567 T3

	GACAAACTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	2520
	TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	2580
5	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	2640
	GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	2700
10	CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGACTACAAG	2760
	TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	2820
	GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA	GCTGACCAGG	2880
15	AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG	2940
	TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC	3000
20	GACGGCTCCT	TCTTCCTCTA	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	3060
	AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	GCAGAAGAGC	3120
	CTCTCCCTGT	CTCCGGGTAA	ATGAGGATCC	GTTAACGGTT	ACCAACTACC	TAGACTGGAT	3180
25	TCGTGACAAC	ATGCGGCCGT	GATATCTACG	TATGATCAGC	CTCGACTGTG	CCTTCTAGTT	3240
	GCCAGCCATC	TGTTGTTTGC	CCCTCCCCCG	TGCCTTCCTT	GACCCTGGAA	GGTGCCACTC	3300
30	CCACTGTCCT	TTCCTAATAA	AATGAGGAAA	TTGCATCGCA	TTGTCTGAGT	AGGTGTCATT	3360
	CTATTCTGGG	GGGTGGGGTG	GGGCAGGACA	GCAAGGGGGA	GGATTGGGAA	GACAATAGCA	3420
	GGCATGCTGG	GGATGCGGTG	GGCTCTATGG	AACCAGCTGG	GGCTCGACAG	CGCTGGATCT	3480
35	CCCGATCCCC	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAATT	3540
	AATTTTAACA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	GATGCTTTAG	3600
40	AGACAGTGTT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	CCAGAGCTGA	3660
	GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	CATCACCGAA	3720
	GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	GATAGAGAGG	3780
45	GCAGGAGCCA	GGGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	ACATTTGCTT	3840
	CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATAG	CTTGGACAGC	TCAGGGCTGC	GATTTCCGCG	3900
50	CAAACCTTGAC	GGCAATCCTA	GCGTGAAGGC	TGGTAGGATT	TTATCCCCGC	TGCCATCATG	3960
	GTTTCGACCAT	TGAACTGCAT	CGTCGCCGTG	TCCCAAAATA	TGGGGATTGG	CAAGAACGGA	4020
	GACCTACCCT	GGCCTCCGCT	CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAAGAAT	GACCACAACC	4080
55	TCTTCAGTGG	AAGGTAAACA	GAATCTGGTG	ATTATGGGTA	GGAAAACCTG	GTTCTCCATT	4140
	CCTGAGAAGA	ATCGACCTTT	AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG	AGAACTCAAA	4200
60	GAACCACCAC	GAGGAGCTCA	TTTTCTTGCC	AAAAGTTTGG	ATGATGCCTT	AAGACTTATT	4260
	GAACAACCGG	AATTGGCAAG	TAAAGTAGAC	ATGGTTTGGG	TAGTCGGAGG	CAGTTCTGTT	4320

65

ES 2 321 567 T3

	TACCAGGAAG	CCATGAATCA	ACCAGGCCAC	CTTAGACTCT	TTGTGACAAG	GATCATGCAG	4380
	GAATTTGAAA	GTGACACGTT	TTTCCCAGAA	ATTGATTTGG	GGAAATATAA	ACTTCTCCCA	4440
5	GAATACCCAG	GCGTCCTCTC	TGAGGTCCAG	GAGGAAAAAG	GCATCAAGTA	TAAGTTTGAA	4500
	GTCTACGAGA	AGAAAGACTA	ACAGGAAGAT	GCTTTCAAGT	TCTCTGCTCC	CCTCCTAAAG	4560
10	TCATGCATTT	TTATAAGACC	ATGGGACTTT	TGCTGGCTTT	AGATCAGCCT	CGACTGTGCC	4620
	TTCTAGTTGC	CAGCCATCTG	TTGTTTGCCC	CTCCCCCGTG	CCTTCCTTGA	CCCTGGAAGG	4680
	TGCCACTCCC	ACTGTCCTTT	CCTAATAAAA	TGAGGAAATT	GCATCGCATT	GTCTGAGTAG	4740
15	GTGTCATTCT	ATTCTGGGGG	GTGGGGTGGG	GCAGGACAGC	AAGGGGGAGG	ATTGGGAAGA	4800
	CAATAGCAGG	CATGCTGGGG	ATGCGGTGGG	CTCTATGCAA	CCAGCTGGGG	CTCGACCTAC	4860
20	TAGCTTTGCT	TCTCAATTC	TTATTTGCAT	AATGAGAAAA	AAAGGAAAAT	TAATTTTAAC	4920
	ACCAATTCAG	TAGTTGATTG	AGCAAAATGCG	TTGCCAAAAA	GGATGCTTTA	GAGACAGTGT	4980
	TCTCTGCACA	GATAAGGACA	AACATTATTC	AGAGGGAGTA	CCCAGAGCTG	AGACTCCTAA	5040
25	GCCAGTGAGT	GGCACAGCAT	TCTAGGGAGA	AATATGCTTG	TCATCACCGA	AGCCTGATTC	5100
	CGTAGAGCCA	CACCTTG GTA	AGGGCCAATC	TGCTCACACA	GGATAGAGAG	GGCAGGAGCC	5160
30	AGGGCAGAGC	ATATAAGGTG	AGGTAGGATC	AGTTGCTCCT	CACATTTGCT	TCTGACATAG	5220
	TTGTGTTGGG	AGCTTGATC	GATCCTCTAT	GGTTGAACAA	GATGGATTGC	ACGCAGGTTC	5280
	TCCGGCCGCT	TGGGTGGAGA	GGCTATTCCG	CTATGACTGG	GCACAACAGA	CAATCGGCTG	5340
35	CTCTGATGCC	GCCGTGTTCC	GGCTGTCAGC	GCAGGGGCGC	CCGGTTCTTT	TTGTCAAGAC	5400
	CGACCTGTCC	GGTGCCCTGA	ATGAACTGCA	GGACGAGGCA	GCGCGGCTAT	CGTG GCTGGC	5460
40	CACGACGGGC	GTTCCCTTGC	CAGCTGTGCT	CGACGTTGTC	ACTGAAGCGG	GAAGGGACTG	5520
	GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGGCAGGA	TCTCCTGTCA	TCTCACCTTG	CTCCTGCCGA	5580
	GAAAGTATCC	ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGCTGCAT	ACGCTTGATC	CGGCTACCTG	5640
45	CCCATTGAC	CACCAAGCGA	AACATCGCAT	CGAGCGAGCA	CGTACTCGGA	TGGAAGCCGG	5700
	TCTTGTCGAT	CAGGATGATC	TGGACGAAGA	GCATCAGGGG	CTCGCGCCAG	CCGAACTGTT	5760
50	CGCCAGGCTC	AAGGCGCGCA	TGCCCCGACGG	CGAGGATCTC	GTCGTGACCC	ATGGCGATGC	5820
	CTGCTTGCCG	AATATCATGG	TGGAAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTCATCG	ACTGTGGCCG	5880
	GCTGGGTGTG	GCGGACCGCT	ATCAGGACAT	AGCGTTGGCT	ACCCGTGATA	TTGCTGAAGA	5940
55	GCTTGCGGGC	GAATGGGCTG	ACCGCTTCCT	CGTGCTTTAC	GGTATCGCCG	CTTCCCGATT	6000
	CGCAGCGCAT	CGCCTTCTAT	CGCCTTCTTG	ACGAGTTCTT	CTGAGCGGGA	CTCTGGGGTT	6060
60	CGAAATGACC	GACCAAGCGA	CGCCCAACCT	GCCATCACGA	GATTTGATT	CCACCGCCGC	6120
	CTTCTATGAA	AGGTTGGGCT	TCGGAATCGT	TTTCCGGGAC	GCCGGCTGGA	TGATCCTCCA	6180
65	GCGCGGGGAT	CTCATGCTGG	AGTTCTTCGC	CCACCCCAAC	TTGTTTATTG	CAGCTTATAA	6240

ES 2 321 567 T3

	TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTT TTTCAGTGCA	6300
5	TTCTAGTTGT GGTGGTCCA AACTCATCAA TCTATCTTAT CATGTCTGGA TCGCGGCCGC	6360
	GATCCCGTCG AGAGCTTGGC GTAATCATGG TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT	6420
	CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT	6480
10	AATGAGTGAG CTAAGTCACA TTAATTGCGT TCGGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA	6540
	ACCTGTCTGT CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTGGCGTA	6600
	TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC	6660
15	GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG	6720
	CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT	6780
20	TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA	6840
	GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCGTTTCCC CCTGGAAGCT	6900
	CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC	6960
25	CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG	7020
	TCGTTTCGTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT	7080
30	TATCCGTTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG	7140
	CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA	7200
	AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA	7260
35	AGCCAGTTAC CTTTCGGAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG	7320
	GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACCG CAGAAAAAA GGATCTCAAG	7380
40	AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAAG	7440
	GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT	7500
	GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT	7560
45	TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCTG TTCATCCATA GTTGCTGAC	7620
	TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA	7680
	TGATACCQCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG	7740
50	GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT	7800
	GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCCA	7860
55	TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGTTT	7920
	CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT	7980
	TCGGTCTTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG	8040
60	CAGCACTGCA TAATCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG	8100

ES 2 321 567 T3

	AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG	8160
	CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTTGGAA	8220
5	AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT	8280
	AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGCGGT	8340
10	GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT	8400
	GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA	8460
	TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT	8520
15	TTCCCCGAAA AGTGCCACCT	8540

<210> 2

<211> 9209 pares de bases

20 <212> ADN

<213> Murino

<223> ADN genómico, monocatenario, circular

25 <400> 2

	GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG	60
	AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC	120
30	GGAGAATGGG CGGAACTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT	180
	ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	240
35	GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT	300
	GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT	360
	AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC	420
40	GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG	480
	ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA	540
45	TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA	600
	AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC	660
	ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC	720
50	ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGCGGA	780
	TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG	840
55	GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA	900
	CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC	960
	CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT	1020
60	GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT	1080
	GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTCAAGTGT AAGTTACATC	1140

65

ES 2 321 567 T3

	CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC	1200
	CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTACTCTCTC	1260
5	ACAATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT	1320
	AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA	1380
10	TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG	1440
	TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT GGATAACGCC	1500
	CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTCTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC	1560
15	AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC	1620
	TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG	1680
	TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC	1740
20	GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT	1800
	GTTTGGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCTTTCC	1860
25	TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT	1920
	GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT	1980
	GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG	2040
30	ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT	2100
	TTCTACTTGG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT	2160
35	GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCOA AGTCTCCACC	2220
	CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC	2280
	GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA	2340
40	TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC	2400
	ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CCTGTCCCAG	2460
	GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC	2520
45	TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT	2580
	GGTCGGGGCC TGGAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT	2640
50	CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG	2700
	CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC	2760
	TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GCGCGAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA	2820
55	GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG	2880
	GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGG GACGGTGTGG	2940
60	TGGAAGTCA GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCCT ACAGTCCTCA	3000
	GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC	3060

65

ES 2 321 567 T3

	TACATCTGCA	ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	AGCAGAGCCC	3120
	AAATCTTGTG	ACAAAACCTCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	CCTGGGGGGA	3180
5	CCGTCACTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAAACCC	AAGGACACCC	TCATGATCTC	CCGACCCCTT	3240
	GAGGTCACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	3300
10	TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA	GCAGTACAAC	3360
	AGCACGTACC	GTGTGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCCTGCACC	AGGACTGGCT	GAATGGCAAG	3420
	GAGTACAAGT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGCC	CTCCCAGCCC	CCATCGAGAA	AACCATCTCC	3480
15	AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC	CCGGGATGAG	3540
	CTGACCAAGA	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	3600
	GCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA	TGGGCAGCCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCCGTG	3660
20	CTGGAATCCG	ACGGCTCCTT	CTTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	3720
	CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG	3780
25	CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGGTAAA	TGAGGATCCG	TTAACGGTTA	CCAACTACCT	3840
	AGACTGGATT	CGTGACAACA	TGCGGCCGTG	ATATCTACGT	ATGATCAGCC	TCGACTGTGC	3900
	CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTTGTTTGCC	CCTCCCCCGT	GCCTTCCTTG	ACCCTGGAAG	3960
30	GTGCCACTCC	CAGTGTCTT	TCCTAATAAA	ATGAGGAAAT	TGCATCGCAT	TGTCTGAGTA	4020
	GGTGTCTTTC	TATTCTGGGG	GGTGGGGTGG	GGCAGGACAG	CAAGGGGGAG	GATTGGGAAG	4080
35	ACAATAGCAG	GCATGCTGGG	GATGCGGTGG	GCTCTATGGA	ACCAGCTGGG	GCTCGACAGC	4140
	GCTGGATCTC	CCGATCCCCA	GCTTTGCTTC	TCAATTTCTT	ATTTGCATAA	TGAGAAAAAA	4200
	AGGAAAATTA	ATTTTAACAC	CAATTCAGTA	GTTGATTGAG	CAAATGCGTT	GCCAAAAAGG	4260
40	ATGCTTTAGA	GACAGTGTTT	TCTGCACAGA	TAAGGACAAA	CATTATTCAG	AGGGAGTACC	4320
	CAGAGCTGAG	ACTCCTAAGC	CAGTGAGTGG	CACAGCATTC	TAGGGAGAAA	TATGCTTGTC	4380
	ATCACCGAAG	CCTGATTCCG	TAGAGCCACA	CCTTGGTAAG	GGCCAATCTG	CTCACACAGG	4440
45	ATAGAGAGGG	CAGGAGCCAG	GGCAGAGCAT	ATAAGGTGAG	GTAGGATCAG	TTGCTCCTCA	4500
	CATTTGCTTC	TGACATAGTT	GTGTTGGGAG	CTTGGATAGC	TTGGACAGCT	CAGGGCTGCG	4560
50	ATTTGCGGCC	AAACTTGACG	GCAATCCTAG	CGTGAAGGCT	GGTAGGATTT	TATCCCCGCT	4620
	GCCATCATGG	TTGACCATTT	GAATGTCATC	GTCGCCGTGT	CCCAAAATAT	GGGGATTGGC	4680
	AAGAACGGAG	ACCTACCCTG	GCCTCCGCTC	AGGAACGAGT	TCAAGTACTT	CCAAAGAATG	4740
55	ACCACAACCT	CTTCAGTGGA	AGGTAAACAG	AATCTGGTGA	TTATGGGTAG	GAAAACCTGG	4800
	TTCTCCATTTC	CTGAGAAGAA	TCGACCTTTA	AAGGACAGAA	TTAATATAGT	TCTCAGTAGA	4860
60	GAACTCAAAG	AACCACCACG	AGGAGCTCAT	TTTCTTGCCA	AAAGTTTGGA	TGATGCCTTA	4920

ES 2 321 567 T3

	AGACTTATTG AACAAACCGGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC	4980
	AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG	5040
5	ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTGGG GAAATATAAA	5100
	CTTCTCCCAG AATACCCAGG CGTCCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT	5160
10	AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC	5220
	CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCCTC	5280
	GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCCTTGAC	5340
15	CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG	5400
	TCTGAGTAGG TGTCAATCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA	5460
	TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC	5520
20	TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT	5580
	AATTTTAAAC CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG	5640
25	AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA	5700
	GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA	5760
	GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG	5820
30	GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT	5880
	CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA	5940
35	CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC	6000
	AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT	6060
	TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC	6120
40	GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG	6180
	AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC	6240
	TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC	6300
45	GGCTACCTGC CCATTGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT	6360
	GGAAGCCGGT CTTGTGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC	6420
50	CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA	6480
	TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAATATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA	6540
	CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT	6600
55	TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC	6660
	TCCCGATTCT CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT	6720
	CTGGGGTTCT AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCCTG CATCACGAGA TTTCGATTCC	6780
60	ACCGCCGCCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG	6840

65

ES 2 321 567 T3

	ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA	6900
	GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTTT	6960
5	TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC	7020
	GCGGCCGCGA TCCCGTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA	7080
10	ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAAGCCT	7140
	GGGGTGCTTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC	7200
	AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG	7260
15	GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTTC	7320
	GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG	7380
	GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA	7440
20	AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC	7500
	GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC	7560
25	CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG	7620
	CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT	7680
	CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC	7740
30	GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACAC GACTTATCGC	7800
	CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG	7860
35	AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG	7920
	CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAGAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA	7980
	CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG	8040
40	GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGICTGA CGCTCAGTGG AACGAAACT	8100
	CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA	8160
	ATTAAAAATG AAGTTTTTAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT	8220
45	ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTTCG TCATCCATAG	8280
	TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA	8340
50	GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC	8400
	AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT	8460
	CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG	8520
55	TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA	8580
	GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG	8640
60	TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA	8700

65

ES 2 321 567 T3

5 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
 TGA CTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820
 CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
 10 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000
 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGCGGACAC 9060
 GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120
 15 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTGAAT GTATTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC 9180
 CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT 9209

<210> 3

<211> 47 pares de bases

<212> ADN

<213> Artificial

<223> ADN genómico, monocatenario, lineal

<400> 3

ATCACAGATC TCTCACCATG GATTTTCAGG TGCAGATTAT CAGCTTC

47

<210> 4

<211> 30 pares de bases

<212> ADN

<213> Artificial

<223> ADN genómico, monocatenario, lineal

<400> 4

TGCAGCATCC GTACGTTTGA TTTCCAGCTT

30

<210> 5

<211> 384 pares de bases

<212> ADN

<213> Murino

<223> ADN genómico, monocatenario, lineal

<400> 5

ATGGATTTTC AGGTGCAGAT TATCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC 60

AGAGGGCAAA TTGTCTCTC CCAGTCTCCA GCAATCCTGT CTGCATCTCC AGGGGAGAAG 120

GTCACAATGA CTTGCAGGGC CAGCTCAAGT GTAAGTTACA TCCACTGGTT CCAGCAGAAG 180

CCAGGATCCT CCCCCAAACC CTGGATTAT GCCACATCCA ACCTGGCTTC TGGAGTCCCT 240

GTTCGCTTCA GTGGCAGTGG GTCTGGGACT TCTTACTCTC TCACAATCAG CAGAGTGGAG 300

GCTGAAGATG CTGCCACTTA TTA CTGCCAG CAGTGGACTA GTAACCCACC CACGTTCCGA 360

GGGGGGACCA AGCTGGAAAT CAAA 384

ES 2 321 567 T3

	<210> 6	
	<211> 27 pares de bases	
	<212> ADN	
5	<213> Artificial	
	<223> ADN genómico, monocatenario, lineal	
	<400> 6	
10	GCGGCTCCCA CGCGTGTCTT GTCCCAG	27
	<210> 7	
15	<211> 29 pares de bases	
	<212> ADN	
	<213> Artificial	
20	<220> misc_feature "Nucleótido 3 es S donde S es G o C".	
	<222> 3	
25	<220> misc_feature "Nucleótido 18 es M donde M es A o C".	
	<222> 18	
	<220> misc_feature "Nucleótido 19 es R donde R es A o G".	
30	<222> 19	
	<220> misc_feature "Nucleótido 25 es R donde R es G o A".	
	<222> 25	
35	<223> ADN genómico, monocatenario, lineal, antisentido	
	<400> 7	
40	GGSTGTTGTG CTAGCTGMRG AGACRGTGA	29
	<210> 8	
	<211> 420 pares de bases	
45	<212> ADN	
	<213> Murino	
	<223> ADN genómico, monocatenario, lineal	
50	<400> 8	
	ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CCTGTCCCAG 60	
	GTACAAGTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 120	
55	TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 180	
	GGTCGGGGCC TGGAAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 240	
	CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 300	
60	CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 360	
	TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GGCAGCGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 420	
65	<210> 9	
	<211> 27 pares de bases	
	<212> ADN	

ES 2 321 567 T3

<213> Artificial

<223> ADN genómico, monocatenario, lineal

5 <400> 9

GGGAGCTTGG ATCGATCCTC TATGGTT

27

10 <210> 10

<211> 128 aminoácidos

<212> Péptido

<213> Murino

15 <223> Monocatenario, lineal

<400> 10

20	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile 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
25	Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
	35 40 45
	Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
30	50 55 60
	Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
	65 70 75 80
35	Val 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
40	Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
	115 120 125

<210> 11

45 <211> 140 aminoácidos

<212> Péptido

<213> Murino

50 <223> Monocatenario, lineal

55

60

65

ES 2 321 567 T3

<400> 11

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