



(12) **BREVET DE INVENȚIE**

Hotărârea de acordare a brevetului de invenție poate fi revocată
în termen de 6 luni de la data publicării

(21) Nr. cerere: 95-00888	(61) Perfecționare la brevet: Nr.
(22) Data de depozit: 12.11.1993	(62) Divizată din cererea: Nr.
(30) Prioritate: 13.11.1992 US 07/ 978 891; 03.11.1993 US 08/ 149, 099	(86) Cerere internațională PCT: Nr. US 93/10953 12.11.1993
(41) Data publicării cererii: BOPI nr.	(87) Publicare internațională: Nr. WO 94/11026 26.05.1994
(42) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 30.06.2003 BOPI nr. 6/2003	(56) Documente din stadiul tehnicii: EP 0274394; Alvin Y. Liu et. al., J. of Immunology, 139:10, 15 noe. 1987
(45) Data eliberării și publicării brevetului: BOPI nr.	

(71) Solicitant:	IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US
(73) Titular:	IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US
(72) Inventatori:	ANDERSON DARRELL R., ESCONDIDO, CALIFORNIA, US; RASTETTER WILLIAM H, RANCHO SANTA FE, CALIFORNIA, US; HANNA NABIL, OLIVENHAIN, CALIFORNIA, US; LEONARD JOHN E, ENCINITAS, CALIFORNIA, US; NEWMAN ROLAND A, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US; REFF MITCHELL E, SAN DIEGO, CALIFORNIA, US
(74) Mandatar:	CABINET ENPORA S.R.L., BUCUREȘTI

(54) **METODĂ PENTRU TRATAREA UNEI TULBURĂRI
LEGATĂ DE CELULELE B**

(57) **Rezumat:** Invenția se referă la o metodă pentru tratarea unei tulburări legate de celulele B și constă în aceea că aceasta cuprinde administrarea parenterală, la un pacient care are nevoie de asemenea tratament, a unei cantități de dozare eficientă terapeutic a unui prim anticorp himeric anti-CD20, având o secvență variabilă cu catenă ușoară substanțial la fel cu secvența arătată în fig. 4, o secvență variabilă cu catenă grea substanțial la fel cu secvența arătată în fig. 5 și

domenii constante IgG1 umane, sau un al doilea anticorp himeric anti CD-20 având substanțial aceeași activitate de epuizare a celulelor B ca primul anticorp himeric anti-CD20 menționat, în care o cantitate eficientă terapeutic este în domeniul 0,001...30 mg/kg greutate corporală, administrată pe o perioadă de 1...7 zile.

Revendicări: 9
Figuri: 14

RO 118524 B1



RO 118524 B1

Invenția se referă la o metodă pentru tratarea unei tulburări legată de celulele B.

Este cunoscut că pentru tratamentul limfomului celulei B se folosesc anticorpi himerici și radiomarcați pentru antigenul de suprafață Bp35("CD 20") al celulei B.

5 Sistemul imun al vertebratelor (de exemplu, primate care includ oameni, maimuțe antropoide, alte maimuțe, etc), constă dintr-un număr de organe și tipuri de celule care trebuie să contribuie la recunoașterea specifică și cu precizie a microorganismelor străine ("antigen") care invadează gazda vertebrată, legarea specifică la asemenea microorganisme străine și eliminarea/distrugerea unor astfel de microorganisme străine.

10 Printre altele, pentru sistemul imun limfocitele sunt critice. Limfocitele sunt produse în timus, splină și măduva osoasă (la adult) și reprezintă circa 30% din totalul celulelor sanguine albe prezente în sistemul circulator al oamenilor (adulti). Există două sub-populații principale de limfocite: celule T și celule B.

Celulele T sunt responsabile pentru imunitatea mediată celular, în timp ce, celulele B sunt responsabile pentru producerea anticorpului (imunitate umorală).

15 Cu toate acestea, celulele T și celulele B pot fi considerate ca interdependente într-un răspuns imun tipic. Celulele T sunt activate când receptorul celulei T se leagă la fragmentele unui antigen care a fost legat la glicoproteinele complexului de histocompatibilitate principală ("MHC") pe suprafața unei celule care prezintă un antigen. Asemenea activare produce eliberarea de mediatori biologici ("interleukine") care, în esență, stimulează celulele B să se diferențieze și să producă anticorpul ("imunoglobuline") împotriva antigenului.

20 Fiecare celulă B din gazdă exprimă pe suprafața sa un anticorp diferit, astfel, o celulă B va exprima anticorpul specific pentru antigen, în timp ce altă celulă B va exprima anticorpul specific pentru un antigen diferit.

25 Pentru conformitate, celulele B sunt în totalitate deosebite și această diversitate este critică pentru sistemul imunitar.

La oameni, fiecare celulă B poate produce un număr enorm de molecule anticorp (adică, circa 10^7 până la 10^8). Asemenea producere de anticorpi, cel mai adesea încetează (sau descrește substanțial) când antigenul străin a fost neutralizat. Ocazional totuși, proliferarea unei anume celule B va continua fără întrerupere; asemenea proliferare poate avea ca rezultat un cancer denumit "limfomul celulei B".

30 Ambele celule T și B, cuprind proteine celulare de suprafață care pot fi utilizate ca "markeri" pentru diferențiere și identificare. Un asemenea marker de celulă B umană este antigenul uman Bp35, B limfocitar diferențiat restrictiv, cunoscut ca "CD20".

35 CD20 este exprimat în timpul dezvoltării timpurii a pre-celulei B și rămâne până când se diferențiază plasma celulară. Molecula CD20 poate regla în mod specific o etapă în procesul de activare, care este necesar pentru inițierea ciclului celular și diferențiere și de obicei, este exprimat la niveluri foarte ridicate pe celule neoplastice (tumori).

40 Prin definiție, CD20 este prezent pe ambele celule B, a căror proliferare nelimitată poate duce la limfomul celulei B. Astfel, antigenul de suprafață CD20 are potențialul de a servi drept candidat pentru "țintirea" limfoamelor celulei B.

45 În esență, asemenea țintire se poate generaliza astfel: anticorpii specifici la antigenul de suprafață CD20 al celulelor B sunt de exemplu, injectați într-un pacient. Acești anticorpi anti-CD20 se leagă specific la antigenul celular de suprafață CD20, atât a celulelor B normale, cât și maligne; anticorpul anti-CD20 legat la antigenul de suprafață CD20 poate duce la distrugerea și reducerea celulelor B neoplastice. Suplimentar, se pot conjuga la anticorpul anti-CD20 agenți chimici sau marcaje radioactive care au potențialul de a distruge tumoarea, astfel, încât antigenul este "eliberat" specific spre de exemplu, celulele B neoplazice.

RO 118524 B1

Fără a avea legătură cu o circumstanță anume, un obiectiv inițial este distrugerea tumorii; abordarea specifică se poate determina printr-un anticorp anti-CD20 anume care se utilizează și astfel, abordări accesibile spre țintirea antigenului CD20 pot varia considerabil. 50

De exemplu, au fost raportate asemenea încercări de țintire a antigenului de suprafață CD20. S-a raportat administrarea prin infuzie intravenoasă continuă la pacienții cu limfom celular B, a anticorpului monoclonal murin (șoarece) 1F5 (un anticorp anti-CD20). 55

S-au raportat niveluri extrem de ridicate (>2 g) de 1F5 necesare pentru reducerea celulelor tumorale din circulație și rezultatele s-au descris ca fiind "pasagere". Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas" Blood 69/2 : 584-591 (1987).

O problemă potențială legată de această abordare este cea a faptului că anticorpul monoclonal non-umani (de exemplu, anticorpi monoclonali murini) de obicei sunt lipsiți de funcționalitate umană eficientă, adică ei sunt incapabili, *inter alia*, să medieze liza dependentă de complement sau liza celulelor umane țintă, prin toxicitate celulară dependentă de anticorp sau fagocitoza mediată de receptorul Fc. 60

Mai mult decât atât, anticorpul monoclonal non-umani pot fi recunoscuți de către gazda umană ca o proteină străină; prin urmare, injecții repetate, de asemenea, anticorpi străini pot duce la inducerea de răspunsuri imune, care conduc la hipersensibilizare dăunătoare. 65

Pentru anticorpul monoclonal pe bază de murină, aceasta este adesea cunoscută ca un răspuns anticorp uman anti-șoarece sau răspuns "HAMA". În plus, acești anticorpi "străini" pot fi atacați de către sistemul imunitar al gazdei, astfel, încât ei sunt ca urmare neutralizați înainte să atingă locul lor de țintă. 70

Limfocitele și celulele limfomului sunt inerent, sensibile la radioterapie din câteva motive: emisia locală de radiații ionizante ale anticorpilor radiomarcați, poate omorî celulele cu sau fără antigenul țintă (de exemplu, CD20) în imediata vecinătate la anticorpul legat la antigen. Radiația penetrantă poate preveni problema accesului limitat pentru anticorpi în tumorile bogate sau sărace vascularizate și cantitatea totală de anticorp necesar poate fi redusă. 75

Radionuclizii emit particule radioactive care pot deteriora ADN-ul celular, la punctul unde mecanismele de reparație celulară sunt incapabile să permită celulei să continue să trăiască; prin urmare, dacă celulele țintă sunt tumori, marcajul radioactiv omorâ benefic celulele tumorale. 80

Anticorpul radiomarcant, prin definiție, include utilizarea unei substanțe radioactive care poate cere precauții, atât pentru pacient (adică posibilitatea transplantului de măduvă osoasă), cât și pentru cadrul medical care-l îngrijește (adică, este nevoie să se exercite un grad înalt de precauție când se lucrează cu radioactivitate). 85

De aceea, abordarea îmbunătățirii abilității anticorpilor monoclonali murini de a fi eficienți în tratamentul tulburărilor celulei B a fost conjugarea unui marcaj radioactiv sau toxină la anticorp, astfel, încât marcajul sau toxina să se localizeze la locul tumorii.

De exemplu, anticorpul IF5 la care s-a făcut referire mai sus, a fost "marcat" cu iod-131 (^{131}I) și s-a raportat evaluarea pentru biodistribuția la doi pacienți, conform: J.F. et al., "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" J. Nuc. Med. 31/8:1257-1268 (1990). 90

Vezi, de asemenea, 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), (cu indicația că un pacient tratat cu ^{131}I marcat IF-5 a atins un "răspuns parțial"); 95

Goldberg, 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), (trei din opt pacienți primind injecții multiple au fost raportați ca dezvoltând un răspuns HAMA);

100 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), (articol de revistă);
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), (iodine-131-labeled anti-CD20 antibody IF5 and B1);

105 Kaminski, M.G. et al., "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with (¹³¹I) anti-B1 (Anti-CD20) Antibody". *NEJM* 329/7(1993), (iodine-131 labeled anti-CD20 antibody B1; hereinafter "Kaminski").

110 La anticorpi s-au conjugat, de asemenea, toxine (adică, agenți chemoterapeuți, precum doxorubicina sau mitomicina C). Vezi, de exemplu, descrierea PCT publicată **WO 92/07466** (publicată în 14 mai 1992).

115 Anticorpul "himeric", adică anticorpul care cuprinde porțiuni de la două sau mai multe specii diferite (de exemplu, șoarece și om) au fost dezvoltate ca o alternativă pentru anticorpi "conjugați". De exemplu, 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), descrie un anticorp himeric direcționat împotriva antigenului CD20, de asemenea, publicația PCT nr. **WO 88/04936**.

120 Totuși, nu este furnizată nici o informație precum abilitatea, eficacitatea sau utilizarea practică de astfel de anticorpi himerici pentru tratamentul tulburărilor celulei B în aceste referințe. Este de notat că în cercetările funcționale *in vitro* (de exemplu, liză de complement dependentă ("CDC"), citotoxicitate celulară dependentă de anticorpi ("ADCC"), etc., nu se poate prezice capacitatea inerentă *in vivo* a unui anticorp himeric de a distruge sau reduce celulele țintă care exprimă antigenul specific.

125 Vezi, de exemplu, Robinson, R.D. et al., "Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities", *Hum. Antibod. Hibridomas* 2:84-93 (1991), (anticorp himeric șoarece-uman având activitate ADCC nedetectabilă). Prin urmare, potențialul eficacității terapeutice al anticorpului himeric poate fi cercetat numai prin experimentare *in vivo*.

130 De ceea ce este nevoie și ceea ce ar fi un avantaj mare în domeniu, sunt abordările terapeutice țintind antigenul CD20 pentru tratamentul limfoamelor celulei B la primate, inclusiv, dar fără să se limiteze la oameni.

135 Metoda conform invenției constă în aceea că, cuprinde administrarea parenterală la un pacient care are nevoie de un asemenea tratament, a unei cantități de dozare eficientă terapeutică a unui prim anticorp himeric anti-CD20 având o secvență variabilă cu catenă ușoară, substanțial la fel cu secvența arătată în fig.4, o secvență variabilă cu catenă grea, substanțial la fel cu secvența arătată la fig.5, și domenii constante IgG1 umane, sau un al doilea anticorp himeric anti-CD20 având substanțial aceeași activitate de epuizare a celulelor B ca primul anticorp himeric anti-CD20 menționat, în care o cantitate eficientă terapeutică este în domeniul 0,001...30 mg/kg greutate corporală, administrată pe o perioadă de 1...7 zile.

140 Invenția prezintă următoarele avantaje pentru tratarea unei tulburări legate de celulele B, în special, a limfoamelor celulei B:

145 - protocoalele terapeutice se bazează pe administrarea anticorpilor himerici anti-CD20 imunologic activi, pentru reducerea celulelor B din sângele periferic, inclusiv celulele B asociate cu limfom;

- se administrează anticorpi anti-CD20 radiomarcați pentru țintirea celulelor B localizate periferic și a celor asociate tumorilor;

- administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici și a anticorpilor anti-CD20 radiomarcați se efectuează într-o strategie terapeutică asociată.

RO 118524 B1

În condițiile prezentei invenții se folosesc termeni care au următoarele semnificații:

Așa cum s-a folosit aici termenul "anticorp anti-CD20" este un anticorp care recunoaște specific o fosfoproteină celulară de suprafață neglicozilată de 35000 Da, de obicei denumită ca antigenul Bp35, limfocitar B uman diferențiat restrictiv, denumit în mod uzual CD20. 150

Termenul "himeric" când s-a folosit cu referire la anticorpul anti-CD20, cuprinde anticorpi care sunt derivați mai ales folosind tehnici acid dezoxiribonucleic recombinant și tehnici care cuprind, atât componente umane, cât și non umane (incluzând specii "înrudite" imunologic, de exemplu, cimpanzeu), regiunea variabilă a anticorpului himeric este cel mai adesea derivată de la o sursă non-umană și are antigenitatea și specificitatea dorită față de antigenul celular de suprafață CD20. Sursa non-umană poate fi orice sursă vertebrată care se poate folosi pentru a genera anticorpi față de antigenul celular de suprafață CD20 uman sau un alt material care cuprinde un antigen celular de suprafață CD20 uman. Asemenea surse non-umane includ fără însă a se limita rozătoare, de exemplu: șoarece, șobolan, iepure, etc.), și primat non-umane (Old World Monkey, maimuțe, etc). În special, componenta non-umană (regiunea variabilă) este derivată dintr-o sursă murină. 155

Așa cum s-a folosit aici denumirea "imunologic activă" când s-a folosit cu referire la anticorpi himerici anti-CD20, înseamnă un anticorp himeric care se leagă la C1q uman, care mediatizează liza dependentă de complement ("CDC") a liniei celulare umane B limfoide și lizează celulele țintă umane prin citotoxicitate celulară dependentă de anticorp ("ADCC"). 160

Expresiile "marcare indirectă" și "abordare de marcare indirectă", ambele înseamnă că un agent chelator este atașat covalent la un anticorp și că cel puțin un radionuclid este inserat în agentul de chelare. De preferință, agenții de chelare și radionuclizii sunt cei enumerați de Srivavatava, S. C. și Mease, R. C.; "Progress in Research on Ligands, Nuclides and Technique for Labeling Monoclonal Antibodies", Nucl. Med. Bio. 18/6: 589-603 (1991), ("Srivagtava") care este încorporat aici pentru referință. 165

Un agent de chelare preferat în mod deosebit este acidul 1-izotiocicmatobenzil-3-metilidiotelen triaminepent acetic ("MX-DTPA"); radionuclizii preferați în mod special pentru marcare indirectă includ indiu (111) și ytriu (90). 170

Expresiile "marcare directă" și "abordare de marcare directă" înseamnă că un radionuclid este atașat covalent direct la un anticorp (de obicei, pe calea unui rest aminoacid). Radionuclizii preferați sunt prezentați în Srivagtava; un radionuclid preferat în mod deosebit pentru marcare directă este iodul (131) atașat covalent pe calea resturilor tirozinice. În mod special, este preferată abordarea marcării indirecte. 175

Abordările terapeutice descrise aici se bazează pe capacitatea sistemului imunitar al primatelor de a recupera rapid sau de a reține celulele B din sângele periferic. În plus, datorită răspunsului imun principal al primatelor, ocazionat de celulele T, când sistemul imunitar are o deficiență a celulelor B din sângele periferic, nevoia pentru precauții "extra-ordinare" (adică, izolarea pacientului, etc) nu este necesară. Ca o consecință a acestora și a altor nuanțe ale sistemului imunitar al primatelor, abordarea terapeutică pentru tulburările celulei B permite înlăturarea celulelor B din sângele periferic folosind anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi. 180

Din cauza tulburărilor celulelor B din sângele periferic, prin definiție, se poate indica o necesitate de acces la sânge pentru tratament, ruta administrării anticorpilor himerici anti-CD20 imunologic activi și anticorpi anti-CD20 radiomarcați fiind de preferință parenterală. 185

Așa cum s-a folosit termenul "parenteral", acesta include: administrarea intravenoasă, intramusculară, subcutanată, rectală, vaginală sau intraperitoneală. Dintre acestea, calea cea mai preferată este cea intravenoasă. 190

195

În condițiile prezentei invenții se folosesc figuri care au următoarele semnificații:

- fig.1, este o reprezentare diagramatică a unui tandem anticorp himeric vector de expresie, util în producerea de anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi ("TCAE");

200 - fig.2A până la 2B reprezintă secvența acidului nucleic a vectorului din fig.1;

- fig.3A până la 3F reprezintă secvența acidului nucleic a vectorului din fig.1, cuprinzând în plus regiunile variabile ale catenelor ușoară și grea murine ("anti-CD20 în TCAE 8");

- fig.4, este acidul nucleic și secvențele aminoacide (inclusiv CDR și regiunile în cadru) ale regiunii variabile ale catenei ușoare murine derivată de la anticorpul monoclonal murin anti-CD20 2B8;

205 - fig.5, este acidul nucleic și secvențele aminoacide (inclusiv CDR și regiunile din cadru) ale regiunii variabile ale catenei grele murine derivate de la anticorpul monoclonal anti-CD20 murin, 2B8;

210 - fig.6, reprezintă rezultatele ratei citometrice, care evidențiază legarea lui C1q uman marcat prin fluorescență la anticorpul himeric anti-CD20, incluzând controale C1q marcate; C1q marcat și anticorp monoclonal anti-CD20 murin 2B8, C1q marcat și IgG1, k uman;

- fig.7, reprezintă rezultatele lizei legate de complement, prin comparație cu anticorpul himeric anti-CD20 și anticorpul monoclonal anti-CD20 murin 2B8;

215 - fig.8, reprezintă rezultatele citotoxicității celulare mediată de anticorp cu celule efectoare umane *in vivo* prin comparație cu anticorpul himeric anti-CD20 și 2B8;

- fig.9A, 9B și 9C, furnizează rezultatele distrugerii limfocitelor B în sângele periferic la primate non-umane, după infuzia a 0,4 mg/kg (A), 1,6 mg/kg (B) și 6,4 mg/kg (C) de anticorp himeric anti-CD20 imunologic activ;

220 - fig.10, reprezintă rezultatele a, *inter alia*, distrugerii limfocitului B în sângele periferic la primate non-umane, după infuzia a 0,01 mg/kg anticorp himeric anti-CD-20 imunologic activ;

- fig.11, arată rezultatele impactului tumoricid al lui Y2B8 într-un model șoarece xenografic, utilizând o tumoră limfoblastoidă de celulă B;

225 - fig.12, prezintă rezultatele impactului tumoricid al lui C2B8 într-un model șoarece xenografic, utilizând o tumoră limfoblastoidă de celule B;

- fig.13, furnizează rezultatele impactului tumoricid a unei combinații Y2B8 și C2B8 într-un model șoarece xenografic, utilizând o tumoră limfoblastoidă de celulă B;

230 - fig.4A și 14B dau rezultatele de la analiza clinică a fazei I/II a lui C2B8, evidențiind distrugerea populației de celule B, peste timp, pentru pacienți care evidențiază o emisie parțială a bolii (14A) și o remisie minoră a bolii (14B).

Informații privind depozitul

235 Anti-CD20 în TCAE 8 (transformat în *E. Coli* în vederea depozitării) s-a depozitat în colecția americană de de tipuri de culturi (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, în condițiile tratatului de la Budapesta pentru Recunoașterea Internațională a Depozitului Microorganismelor în vederea Procedurii de Brevetare ("Tratatul de la Budapesta").

Microrganismul a fost testat de către ATCC pe 9 noiembrie 1992 și s-a determinat ca fiind viabil la aceea dată. ATCC-ul a acordat acestui organism următorul număr de depozit: ATCC 69119 (anti-CD20 în TCAE 8).

240 Hibridomul 2B8 s-a depozitat la ATCC pe 22 iunie 1993, în condițiile Tratatului de la Budapesta. Viabilitatea culturii s-a determinat pe 25 iunie 1993 și ATCC a acordat acestui hibridom următorul număr de depozit: HB 1138.

245 În general, anticorpul sunt compuși din molecule cu două catene ușoare și două catene grele; aceste catene au forma generală a literei "Y", cu ambele catene ușoară și grea formând brațele Y - ului și catenele grele formând baza Y - ului. Catenelile ușoare și grele

RO 118524 B1

sunt divizate în domenii de homologie structurală și funcțională. Domeniile variabile, atât ale catenei ușoare ("V_L") și grea ("V_H") determină recunoașterea și specificitatea. Domeniile regiunii constante ale catenelor ușoară ("C_L") și grea ("C_H") conferă proprietăți biologice importante, de exemplu, asocierea catenei anticorpului, secretarea, mobilitatea transplacentară, legarea la complementul receptorului Fc de legare, etc.,

250

Seriile evenimentelor duc la expresia genei imunoglobinei în celulele care produc anticorp și sunt complexe. Secvențele genetice ale regiunii domeniului variabil sunt localizate în segmente genetice de linie germinală separată, cunoscute ca: "V_H", "D" și "J_H", sau "V_L" și "J_L". Aceste segmente genetice sunt legate prin rearanjamente AND, pentru a forma regiuni V complete, exprimate în catene grele și, respectiv în ușoare. Segmentele (V_L - J_L și V_H - D - J_H), rearanjate legate V, codifică apoi regiunile variabile complete sau domeniile de legare antigenică ale catenelor ușoare, respectiv grele.

255

Seroterapia limfoamelor celulelor B umane folosind un anticorp monoclonal murin anti-CD20 (1F5) a fost descrisă de către Press et al., (69 Blood 584, 1987, de mai sus); răspunsurile terapeutice raportate din nefericire au fost pasagere. În plus, la 25 % din pacienții testați s-a raportat dezvoltarea prin seroterapie a unui răspuns anticorp uman anti-șoarece (HAMA). Press et al., sugerează că acești anticorpi conjugați la toxine sau radioizotopi pot permite un beneficiu clinic, în cele din urmă mai mare decât anticorpul neconjugat.

260

Datorită efectelor de slăbire a limfomului celulei B și a unei necesități foarte reale de a asigura abordarea tratamentului viabil pentru această boală, s-a pornit la drum printr-o abordare diferită, având ca trăsătură comună între cele două abordări un anticorp anume 2B8. O asemenea abordare exploatează avantajos capacitatea sistemelor de la mamifere de a recunoaște cu ușurință și eficient celule sanguine periferice B. Folosind această abordare s-a căutat în esență, înlăturarea sau reducerea celulelor B din sângele periferic și țesutul limfatic și mijloace de îndepărtare a limfoamelor celulei B. Aceasta s-a realizat prin utilizarea, *inter alia*, a anticorpilor himerici anti-CD20 imunologic activi.

265

270

Într-o altă abordare s-a căutat țintirea celulelor tumorale pentru distrugerea cu marcaje radioactive.

Anticorpii himerici anti-CD20 imunologic activi și anticorpii anti-CD20 radiomarcați vor fi de obicei asigurați prin tehnică standard într-un tampon acceptabil farmaceutic, de exemplu, soluție salină sterilă, apă sterilă tamponată, propilenglicol, combinații ale celor dinainte, etc.,

275

Metode pentru prepararea agenților administrabili parenteral sunt descrise în Pharmaceutical Carriers & Formulations, Martin, Remington's Pharmaceuticals Sciences, 15th Ed. (Mack Pub. Co., Easton, PA 1975) și este încorporat aici pentru referință.

280

Cantitatea eficientă terapeutic, specifică anticorpilor anti-CD20 himerici activi imunologic, este utilă pentru producerea unui efect terapeutic unic la orice pacient, dar poate fi determinată prin tehnici standard binecunoscute pentru cei cu pregătire obișnuită în domeniu.

285

Dozele eficiente (adică, cantitățile eficiente terapeutic) ale anticorpilor himerici anti-CD20 activi imunologic, sunt în domeniul de la circa 0,01 până la circa 30 mg/kg greutate corporală, de preferință, de la circa 0,01 până la circa 25 mg/kg greutate corporală, și cel mai bine, de la circa 0,4 până la circa 20,0 mg/kg greutate corporală.

Sunt viabile și alte dozaje, factorii care influențează dozajul, includ însă nu se limitează la severitatea bolii, tratamentele anterioare, starea globală de sănătate a pacientului, alte boli prezente, etc. Specialistul în domeniu este în stare să analizeze cu ușurință un pacient anume și să determine un dozaj corespunzător, care intră sub incidența domeniilor sau, dacă este necesar, iese în afara domeniilor.

290

295 Introducerea anticorpilor himerici anti-CD20 activi imunologic în aceste domenii doză, poate fi realizată ca un tratament unic sau ca o serie de tratamente. Având în vedere anticorpii himerici, este de preferat ca o asemenea introducere să fie realizată printr-o serie de tratamente.

300 Această abordare preferată este previzibilă pe baza metodologiei de tratament asociată cu această boală. Deși nu se dorește asocierea la o teorie anume, datorită activității imunologice, anticorpii himerici anti-CD20 sunt imunologic activi și se leagă la CD20. La introducerea inițială de anticorpi himerici anti-CD20 activi imunologic, va începe la individ reducerea celulelor B din sângele periferic. S-a observat o reducere aproape completă în circa 24 h după tratamentul prin infuzie.

305 Datorită acesteia, introducerea/introducerile ulterioare a anticorpilor himerici anti-CD20 activi imunologic (sau anticorpi anti-CD20 radiomarcați) la pacient se presupune:

- a) clarificarea celulelor B rămase în sângele periferic;
- b) începerea reducerii celulelor B din nodulii limfatici;
- c) începerea reducerii celulelor B din alte surse tisulare, de exemplu, măduvă osoasă, tumoare, etc.

310 Formulată din nou, prin folosirea introducerilor repetate ale anticorpilor himerici anti-CD20 activi imunologic, vor avea loc o serie de evenimente, fiecare eveniment fiind considerat de către noi ca important pentru tratamentul eficient al bolii. Primul "eveniment" poate fi considerat ca orientat în principal pentru reducerea substanțială a celulelor B din sângele periferic al pacientului.

315 Următoarele "evenimente" pot fi considerate, fie în principal orientate spre îndepărtarea simultană sau serială a celulelor B remanente din sistemul celulelor B din nodulii limfatici, fie ca îndepărtarea celulelor B din alte țesuturi.

320 Ca urmare, în timp ce un dozaj unic asigură beneficii și poate fi utilizat eficient, pentru tratarea/conducerea bolii, un tratament preferat de durată poate fi întâlnit în câteva etape; cel mai de dorit se introduce la pacient o dată pe săptămână, pentru circa 4 săptămâni, între circa 0,4 și circa 20 mg/kg greutate corporală de anticorpi himerici anti-CD20 activi imunologic.

325 Referitor la folosirea anticorpilor anti-CD20 radiomarcați, există o preferință deoarece anticorpii nu este himeric. Această preferință este dictată de timpul de înjumătățire în circulație, semnificativ mai lung al anticorpilor himerici față de anticorpi murini (adică, cu un timp de înjumătățire a vieții în circulație mai lung; radionuclidul este prezent în pacient pentru perioade mai lungi).

330 Anticorpii himerici radiomarcați pot fi utilizați benefic cu dozajele folosite mai scăzute în mili-Curie ("mCi") în legătură cu anticorpii himerici relativ la anticorpii murini. Acest scenariu permite o descreștere a toxicității în măduva osoasă până la un nivel acceptabil, menținând în același timp utilitatea terapeutică.

335 La prezenta invenție sunt aplicabili o multitudine de radionuclizi și specialiștii în domeniu sunt acreditați cu abilitatea de a determina cu ușurință ce radionuclid este cel mai adecvat într-o multitudine de împrejurări. De exemplu, iodul (131) este un radionuclid binecunoscut pentru imunoterapie. Cu toate acestea, utilitatea chimică deplină a iodului (131) poate fi limitată prin câțiva factori incluzând înjumătățirea vieții fizice de 8 zile, dehalogenarea anticorpului iodat, atât în sânge, cât și la locul de situare al tumorilor și emisia caracteristică (de exemplu, componentul gama mare) care poate fi suboptimal pentru depozitul dozei localizate în tumoare.

340 Cu apariția agenților chelatori superiori, oportunitatea atașării grupărilor chelatoare metalice la proteine a mărit posibilitățile de a utiliza alți radionuclizi ca indiul (131) și yttrium (90).

RO 118524 B1

- Ytriu (90) asigură câteva avantaje pentru utilizare în aplicații radioimuno-terapeutice: timpul de înjumătățire a vieții ytriului (90) de 64 h este suficient de lung pentru a permite acumularea anticorpului de către tumoră și spre deosebire de iod (131), ytriu (90) este un emițător beta pur de înaltă energie, fără însoțirea de iradiere gama, în îmbătrânirea sa cu un domeniu în diametrele țesuturilor de 100 până la 1000 celule. 345
- Mai mult decât atât, cantitatea minimă de radiație care penetrează, permite administrarea anticorpilor marcați cu ytriu (90) pacienților, fără să fie în mod necesar spitalizați. Interalierea anticorpului marcat nu este necesară pentru uciderea celulelor, emisia locală de radiație ionizantă va fi letală pentru celulele tumorale învecinate lipsite de antigen țintă. 350
- O limitare neterapeutică pentru ytriu (90) se bazează pe absența radiației gama semnificativă care face dificilă vizualizarea acestora. Pentru evitarea acestor probleme se poate utiliza un radionuclid de diagnosticare precum indiu (111) care "formează imagini" pentru determinarea localizării și mărimii relative a unei tumori înaintea administrării dozei terapeutice de ytriu(90) împreună cu anti-CD20. 355
- Indiu (111) este preferat în mod deosebit ca radionuclid pentru diagnostic, deoarece: între circa 1 până la circa 10 mCi se pot administra în siguranță, fără toxicitate detectabilă; datele sub formă de imagini sunt, în general, previzibile pentru distribuția ulterioară a anticorpului marcat cu ytriu (90). Majoritatea studiilor imaginează utilizarea anticorpului marcat cu 5 mCi indiu (111) deoarece această doză este pe de o parte sigură și are o eficiență de formare a imaginilor crescută, comparativ cu dozele mai mici, cu imaginea optimală formată la 3 până la 6 zile după administrarea anticorpului. Vezi, de exemplu, Murray J.L., 26 J.Nuc.Med. 3328 (1985) și Garraguiilo, J.A. et al., 26 J.Nuc.Med. 67 (1985). 360
- Dozajul tratamentului unic eficient (adică, cantitățile eficiente terapeutic) ale anticorpilor anti-CD20 marcate cu ytriu (90) sunt în domeniul dintre circa 5 și circa 75 mCi, preferabil între circa 10 și circa 40 mCi. Dozajele eficiente de tratament unic ablativ (adică, pot necesita transplantare de măduvă osoasă autologă) de anticorpi anti-CD20 marcați cu iod (131) sunt în domeniul dintre circa 30 și circa 600 mCi, de preferință, între circa 50 și mai puțin, decât circa 500 mCi. 365
- În legătură cu un anticorp himeric anti-CD20, datorită vieții de înjumătățire mai lungă în circulație față de anticorpii murini, un dozaj ablativ non-măduvă eficient ca tratament unic cu anticorpi himici anti-CD20 marcați cu iod (131) este în domeniul dintre circa 5 și circa 40 mCi, de preferință mai mic decât circa 30 mCi. Criteriile imaginate pentru, de exemplu, marcaj indiu (111) tipic, sunt mai mici decât circa 5 mCi. 370
- În legatură cu anticorpi anti-CD20 radiomarcați, se poate întâlni, de asemenea, terapia cu aceștia, folosind un tratament terapeutic unic sau folosind tratamente multiple. Datorită componentului radionuclid, este de preferat ca înaintea tratamentului să fie prelevate celule din curentul periferic ("PSC") sau maduva osoasă ("BM") de la pacienți, pentru experimentarea toxicității potențiale fetale a măduvei osoase, care ar rezulta de la radiație. 375
- BM și/sau PSC se prelevează folosind tehnici standard și apoi se curăță și se îngheață pentru o posibilă reinfuzare. Suplimentar, este de preferat ca anterior tratamentului să se facă un studiu de diagnosticare dozimetric, folosind un anticorp marcat pentru diagnostic (de exemplu, folosind indiu (111) asupra pacientului, în vederea asigurării că anticorpul marcat este terapeutic (de exemplu, folosind ytriu (90)) și nu va deveni în mod nedorit "concentrat" în orice țesut sau organ normal. 380
- Au fost descriși anticorpi himerici șoarece/om. Vezi, de exemplu, Morrison, S.L. et al., PNAS 116:6851-6854 (Noiembrie 1984); publicația de brevet european nr. 172494; Boulianne, G..L. et al., Nature 312:642(decembrie 1984); Neubeiger, M.S. et al., Nature 4x 314 : 268 (martie 1985); publicația brevetului european 125023; Tan et al., J.Immunol.135:8564 (noiembrie 1985); Sun, L.K. et al, Hyrbriidoma 5/1: 517 (1986); Sahagan. 385
- 390

395 et al, J.Immunol. 137;1066-1074 (1986) . Vezi, în general, Muron, Nature 312;597
 (Decembrie 1984); Dickson, Genetic Engineering News 5/3 (martie 1985); Marx, Science
 229;455 (august 1985); și Morrison Science 229;1202-1207 (septembrie 1985). Robinson
 et al., descriu în publicația PCT nr. **WO 88/04936** un anticorp himeric cu regiune constantă
 umană și regiune variabilă murină, având specificitate față de un epitop al CD20; porțiunea
 400 murină a anticorpului himeric din referința Robinson este derivat de la anticorpul monoclonal
 de șoarece 2H7 (gama 2b, kapa).

Deoarece, referința remarcă faptul ca anticorpul himeric descris este un "prim
 candidat" pentru tratamentul tulburărilor celulei B, această formulare nu poate fi văzută
 mai mult decât ca o sugestie pentru specialiștii în domeniu, să determine dacă da sau nu
 această sugestie este exactă pentru acest anticorp anume; în special, datorită lipsei oricaror
 405 date de referință în sprijinul unei afirmații asupra eficacității terapeutice, a datelor privind
 folosirea la mamifere superioare, precum primate sau oameni.

Metodologii pentru generarea de anticorpi himerici sunt accesibile specialiștilor în
 domeniu. De exemplu, catenele ușoare și grele se pot exprima separat folosind, de exemplu,
 catena ușoară a imunoglobulinei și catene grele ale imunoglobulinei în plasmizi separați.
 410 Apoi, acestea se pot purifica și asambla *in vitro* în anticorpi compleți.

Metodologii pentru realizarea unor asemenea asamblări au fost descrise. Vezi, de
 exemplu, Scharff, M; Harvey Lectures 69:125 (1974). Parametrii reacției *in vitro* pentru for-
 marea anticorpilor IgG de la catene grele și ușoare izolate reduse au fost, de asemenea,
 descriși. Vezi, de exemplu, Beychok, S., Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic
 415 Press, New York, p.69, 1979.

De asemenea, este posibilă, co-expresia catenelor ușoară și grea în aceleași celule,
 pentru a obține asocierea intracelulară și linkajul catenelor grea și ușoară în anticorpi
 complecși H₂L₂IgG. Asemenea co-expresie se poate realiza folosind, fie același plasmid, fie
 plasmizi diferiți în aceeași celulă gazdă.

420 O altă abordare și care pentru noi este cea mai preferată pentru dezvoltarea
 anticorpului himeric anti-CD20 non-uman/uman, se bazează pe utilizarea unui vector de
 expresie care include *ab initio* ADN, care codifică regiunile constante din catenele grea și
 ușoară dintr-o sursă umană.

Un asemenea vector permite insertarea de ADN care codifică regiunea variabilă non-
 425 umană, astfel, încât se pot genera diverși anticorpi anti-CD20 non-umani, care se pot
 cerceta pentru diferite caracteristici (de exemplu, tipul specificității de legare, regiunile epitop
 de legare, etc.); ulterior, se pot încorpora în vector cADN-uri care codifică regiuni variabile
 ale catenei ușoară și grea de la un anticorp anti-CD20 preferat sau dorit.

Se face referire la aceste tipuri de vectori, ca vectori Expresie în Tandem Anticorp
 430 Himeric ("TCAE"). Cel mai preferat vector TCAE care s-a folosit pentru generarea anti-
 corpilor himerici anti-CD20 activi imunologic pentru tratamentul terapeutic al limfoamelor
 este TCAE 8. Acesta este un derivat al unui vector propriu al solicitanților acestui brevet
 denumit ca TCAE 5.2, diferența fiind aceea că în TCAE 5.2 situl de start al inițierii translației
 markerului selectabil dominant (neomicin fosfotransferaza, "NEO") este o secvență Kozak
 435 consens, în timp ce pentru TCAE 8, această regiune este o secvență Kozak consens parțială
 nepereche.

Detalii referitoare la impactul sitului de stare a inițierii markerului selectabil dominant
 al vectorilor TCAE (de asemenea, denumiți ca "vector ANEX") față de expresia proteinei,
 sunt descrise în amănunt în cererea în curs de rezolvare, depusă cu cea de față.

440 TCAE 8 cuprinde patru (4) casete transcripționale și acestea sunt în ordine tandem,
 adică, o regiune variabilă absentă a catenei ușoare de la o imunoproteină umană, o regiune
 variabilă absentă a catenei grele de la o imunoproteina umană, DHFR și NEO.

RO 118524 B1

Fiecare casetă transcripțională conține propriul său promotor eucariotic și regiunea de poliadenilare (referința este făcută la fig.1, care este o reprezentare diagramatică a vectorului TCAE8). Cu specificarea:

445

1) Promotorul/intensificatorul CMV în fața catenei grele a imunoglobulinei este o versiune truncată a promotorului /intensificatorului din fața catenei ușoare de la situsul Nhe I la -350 până la situsul Sst I la -16 (vezi, 41 Cell 521, 1985);

2) O regiune constantă a catenei ușoare de imunoglobulină umană s-a derivat pe calea amplificării cADN-ului printr-o reacție PCR în TCAE8, aceasta a fost regiunea constantă kappa, a catenei ușoare de imunoglobulină umană (Kabat numerotare aminoacizii 108-214 alotip Km 3, (vezi, Kabat, E.A. "Sequences of Proteins of immunological interest", NIH Publication, Fifth Ed. nr. 91-3242, 1991), și regiunea constantă gama 1 a catenei grele de imunoglobulină umană (numerotare Kabat aminoacizii 114-478, alotip Gmla, Gmlz). Catena ușoară s-a izolat din sânge uman normal (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA); ARN-ul de aici s-a folosit pentru sinteza cADN care apoi a fost amplificat folosind tehnici PCR [primerii s-au derivat față de consensul de la Kabat]. Catena grea s-a izolat (folosind tehnici PCR) de la cADN preparat de la ARN care, în schimb s-a derivat de la celule transfectate cu un vector IgG1 uman (vezi, 3 Prot. Eng. 531, 1990; vectorul pN γ , 62). S-au schimbat 2 aminoacizi în IgG1 uman izolat pentru împerecherea secvenței aminoacide consens de la Kabat, la sens: aminoacidul 225 s-a schimbat din valină la alanină, (GTT la GCA), și aminoacidul 287 s-a schimbat de la metionină la lizina (ATG la AAG);

450

455

460

3) Casetele catenei ușoare și grea de imunoglobulină umană conțin secvențe semnal sintetice pentru secretarea catenelor imunoglobulinei;

4) Casetele catenei ușoare și grea de imunoglobulină umană conțin situri de restricție ADN specifice care permit insertarea regiunilor variabile imunoglobulinice ușoare și grea care mențin cadrul de citire tranzițional și nu alterează aminoacizii găsiți în mod normal în catenele imunoglobulinei;

465

5) Caseta DHFR a conținut propriul sau promotor eucariotic (promotorul principal al b-globinei de șoarece, "BETA") și regiunea de poliadenilare (poliadenilarea hormonului bovin de creștere, "BGH"); și

470

6) Caseta NEO a conținut propriul sau promotor eucariotic (BETA) și regiunea de poliadenilare (poliadenilare timpurie SV40, "SV").

Considerând vectorul TCAE 8 și caseta NEO, regiunea Kozac a fost o secvență Kozac consens parțial nepereche (care include un sit Cla I în amonte):

475

Cla I	-3	+1
GGGAGCTTGC ATCGAT	ccTct	ATG Gtt

(În vectorul TCAE 5.2, schimbarea este în regiunile Cla I și ATG, la sens: ccAcc).

480

Lista completă a secvenței lui TCAE 8 (inclusiv componentele specifice ale celor 4 casete transcripționale) este menționată în fig.2 (Secvența ID nr.1).

Așa cum se va aprecia de specialiști în domeniu, vectorii TCAE permit reducerea substanțială a timpului necesar pentru generarea anticorpilor himerici anti-CD20 activi imunologic. Generarea și izolarea regiunilor variabile ale catenei ușoare și grea non-umane urmată de încorporarea acestora în caseta transcripțională constantă a catenei ușoare și în caseta transcripțională constantă a catenei grele umane permit producerea de anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi.

485

S-a derivat o regiune variabilă non-umană, cea mai de dorit cu specificitate față de antigenul CD20 folosind o sursă murină și tehnologia hibridomilor. Folosind reacția polimerizică de lanț ("PCR"), regiunile variabile murine ușoare și grea s-au clonat direct în vectorul TCAE 8 aceasta fiind ruta cea mai preferată pentru încorporarea regiunii variabile non-umane în vectorul TCAE.

490

495 Această preferință, este în principal, bazată pe eficiența reacției PCR și corectitudinea inserării. Totuși, pentru realizarea acestei sarcini sunt accesibile și alte proceduri echivalente. De exemplu, folosind TCAE 8 (sau un vector echivalent) se poate obține secvența regiunii variabile a anticorpului anti-CD20 non-uman, urmată de sinteza oligonucleotidelor, porțiunilor secvenței sau dacă corespunde, a întregii secvențe.

500 Ulterior, porțiunile sau întreaga secvență sintetică se poate insera în localizările corespunzătoare din vector. Specialiști în domeniu au pregătirea necesară pentru realizarea acesteia.

505 Anticorpii noștri himerici anti-CD20 activi imunologic, cei mai preferați s-au derivat din utilizarea vectorului TCAE 8 care a inclus regiuni variabile murine derivate de la anticorpus monoclonal față de CD20; acest anticorp (va fi discutat în detaliu mai jos), s-a denumit ca "2B8". Secvența completă a regiunilor variabile obținute de la 2B8 în TCAE 8 ("anti-CD20 în TCAE 8") este menționată în fig.3 (Secvența ID nr. 2).

510 Linia celulară gazdă utilizată pentru expresia proteinei cel mai adesea este de origine mamiferă; specialiștii în domeniu au pregătirea de a determina preferențial liniile celulare gazdă speciale, care sunt cele mai adecvate pentru produsul genetic dorit să fie exprimat aici. Liniile celulare gazdă exemplare includ fără însă să fie limitate, DG44 și DUXB11 (linii ovariene de hamster chinezesc minus DHFR), HELA (carcinom uman cervical), CVI (linie renală de maimuță), COS (un derivat al CVI cu antigen SV 40 T), R1610 (fibroblaste de hamster chinezesc), BALBC/3T3 (fibroblaste de șoarece), HAK (linie renală de hamster), SP2/O (mielom de șoarece), P3x63Ag3.653 (mielom de șoarece), BFA-1c1BPT (celule endoteliale bovine), RAJI (limfocite umane) și 293 (rinichi uman). Liniile celulare gazdă sunt accesibile de obicei prin servicii comerciale de la ATCC sau din literatura publicată.

515 De preferință, linia celulară gazdă este fie DG44 ("CHO") sau SP2/O. Vezi Urland, G. et al, "Effect of gamma rays and the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions" Som. Cel & Mol. Gen. 12/6;555-566 (1986); și, respectiv, Shulman, M. et al., "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies" Nature 276;269 (1978). Cea mai preferată este linia celulară gazdă DG44.

525 Transfecția plasmidului în celula gazdă se poate realiza prin orice tehnică accesibilă specialiștilor în domeniu. Acestea includ, însă nu se limitează la transfecție (inclusiv, electroforeza și electroporarea), fuziunea celulară cu ADN învelit, microinjectarea și infecția cu virus intact. Vezi Ridhway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" capitolul 24.2, pp. 470-472 Vectors, Rodrigues and Denhardt Eds (Butterworth, Boston, MA 1988). Cel mai de preferat, introducerea plasmidului în gazdă este pe calea electroporării.

530 Următoarele exemple nu au intenția și ele nici nu vor fi interpretate ca limitând invenția. Exemplele au intenția să evidențieze: formarea unei imagini asupra dozei folosind un anticorp anti-CD20 radiomarcant ("I2B8"); anticorpus anti-CD20 radiomarcant (Y2B8.); și anticorpus himeric anti-CD20 activ imunologic ("C2B8") derivat prin utilizarea unui vector specific ("TCAE 8") și regiuni variabile derivate de la un anticorp monoclonal murin anti-CD20("2B8"). În continuare, se dau câteva exemple de realizare a invenției, de la I la V, după cum urmează:

535 **Exemplul I. Anticorp 2B8 anti-CD20 radiomarcant**

A. Producerea anticorpului monoclonal [Murin) anti-CD20("2B8")

540 S-au imunizat repetat șoareci BALB/C cu linia celulară limfoblastoidă umană SB (Vezi, Adams, R.A. et al., "Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2", Can Res 28:1121-1125 (1968); această linie celulară este accesibilă de la colecția americană de culturi de țesuturi, Rockville, MD., sub nr. de acces ATCC, ATCC CCL 120), cu injecții săptămânale timp de 3-4 luni. S-au identificat șoareci care evidențiază titruri serice ridicate de anticorpi anti-CD20 așa cum s-a

RO 118524 B1

- determinat prin inhibiția anticorpilor CD-20 specifici cunoscuți (anticorpii anti-CD20 utilizați au fost Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA nr. catalog 7670; și B1, Coulter Corp.; Hialeah, FL, Nr. catalog 6602201); apoi, s-a îndepărtat splina de la asemenea șoareci. Celulele splenice de șoarece SP2/0 în conformitate cu protocolul descris în EINFELD D.A. et al., (1988) EMBO 7:711 (SP2/0 are numărul de acces la ATCC, ATCC CRL 8006). 545
- Examinările pentru specificitate CD20 s-au realizat prin: radioimunotest. Pe scurt, B1 anti-CD20 purificați s-au radiomarcate cu I^{125} prin metoda descrisă în: Valentine E.A. et al., (1989) J.Biol Chem. 264:1128.2. (Iodura de sodiu I^{125} , ICN, Irvine, CA, nr.catalog 8665H). 550
- S-au cercetat hibridomii prin co-incubare a 0,05 ml de mediu de la fiecare godeu de fuziune împreună cu 0,05 ml de B1 anti-CD20 marcat I^{125} (10 ng) în BSA, PBS 1% (pH=7,4) și 0,5 ml din același tampon care conține 100 000 celule SB. După incubare timp de o oră la temperatura camerei s-au recoltat celulele prin transferare la plăci de titrare de 96 godeuri (V&P Scientific, San Diego, CA) și s-au spălat cu atenție. S-au folosit drept controale pozitive și, respectiv, negative, godeuri duplicate conținând B1 anti-CD20 nemarcat și godeuri lipsite de inhibitori pentru anticorp. S-au dezvoltat și clonate godeurile conținând mai mult de 50% inhibiție. Anticorpul care demonstrează cea mai ridicată inhibiție s-a derivat de la linia celulară clonată desemnată aici ca "2B8". 555
- B. Prepararea conjugatului 2B8-MX-DTPA* 560
- i. MX-DTPA*
- S-a utilizat ca agent chelator pentru conjugarea radiomarcajului la 2B8 acid 1-izotiocianatobenzil-3-metildietilen-triamin-penta acetic-marcat C^{14} ("MX-DTPA-marcat C^{14} "). Manipulările lui MX-DTPA-ului s-au făcut pentru menținerea condițiilor fără metal, adică, reactivi lipsiți de metal și, când a fost posibil, s-au utilizat containere din polipropilenă (baloane, cilindri gradați, pahare de laborator, pipete) spălate cu Alconox și clătite cu apă Milli-Q. 565
- S-a obținut MX-DTPA sub formă de solid uscat de la Dr. Otto Gansow [National Institute of Health, Bethesda, MD] și s-a depozitat deshidratat la 48 C (protejat de lumină), soluțiile stoc fiind preparate în apă Milli-Q la o concentrație de 2-5 mM, cu depozitare la $-70^{\circ}C$. 570
- MX-DTPA s-a obținut, de asemenea, de la Coulter Immunology (Hialeah, Florida) ca sare de sodiu în apă și s-a depozitat la $-70^{\circ}C$.
- ii. Prepararea lui 2B8*
- S-a preparat 2B8 purificat pentru conjugare cu MX-DTPA prin transferarea anticorpului în 50 mM bicin-NaOH lipsit de metal, pH=8,6 conținând NaCl 150 mM, utilizând în mod repetat tampon de schimb cu filtre spin CENTRICON 30™ (30000 D, MWCO; Amicon). În general, s-au adăugat la unitatea de filtrare 50-200 μ l de proteină (10 mg/ml) urmat de 2 ml tampon bicin. S-a centrifugat filtrul la 4°C într-o centrifugă Sorval SS - 34 (6000 rpm, 45 min). Volumul reținut a fost de aproximativ 50-100 μ l; acest procedeu s-a repetat de două ori folosind același filtru. S-a transferat ceea ce s-a reținut la o eprubetă din propilenă de 1,5 ml prevăzută cu dispozitiv de rotire la partea superioară, s-a examinat pentru proteină, s-a diluat până la 10,0 mg/ml și s-a depozitat la 4°C până la utilizare; în mod similar, proteina s-a transferat în citrat de sodiu 50 mM, pH=5,5, conținând NaCl 15 mM, pH=5,5, conținând NaCl 150 mM și azidă de sodiu 0,05 %, folosind protocolul de mai sus. 575
- iii. Conjugarea lui 2B8 cu MX-DTPA* 580
- Conjugarea lui 2B8 cu MX-DTPA s-a realizat în eprube de propilenă la temperatura ambiantă. Soluțiile stoc de MX-DTPA înghețate s-au dezghețat imediat înainte de utilizare. S-au reacționat 50-200 ml de proteină la 10 mg/ml cu MX-DTPA la un raport molar de MX-DTPA - la - 2B8 de 4 :1. 585
- 590

RO 118524 B1

Reacțiile s-au inițiat prin adaugarea soluției stoc MX-DTPA și agitare blandă; peste noapte lăsat să continue conjugarea [14 până la 20 h) la temperatura ambiantă. S-a îndepărtat MX-DTPA nereacționat din conjugat prin dializă sau ultrafiltrare repetată așa cum s-a descris mai sus în exemplul I.B.ii, în soluție salină normală lipsită de metal (0,9 % g/v) și s-a depozitat la 4°C într-o eprubetă de polipropilenă până la radiomar-care.

iv. Determinarea încorporării de MX-DTPA

Încorporarea MX-DTPA s-a determinat prin numărătoare de scintilație și s-a comparat valoarea obținută cu conjugatul purificat pentru activitatea specifică a MX-DTPA marcat C¹⁴. Pentru anumite studii în care s-a utilizat MX-DTPA neradioactiv (Coulter Immunology) încorporarea MX-DTPA s-a examinat prin incubarea conjugatului cu o soluție în exces purtătoare de ytriu (90) radioactiv de concentrație și activitate specifică cunoscută.

S-a preparat o soluție stoc de clorura de ytriu de concentrație cunoscută în HCl 0,0N fără metal la care s-a adăugat ytriu (90) fără purtător (sare clorică). S-a analizat un alicot al acestei soluții prin numărarea de scintilații în lichid pentru a determina o activitate specifică precisă pentru acest reactiv. Într-o eprubetă de propilenă s-a adăugat un volum de reactiv clorură de ytriu egal cu de 3 x numărul de moli de chelat așteptat să se atașeze la anticorp (de obicei, 2 mol/mol anticorp) și s-a corectat pH-ul până la 4,0-4,5 cu acetat de sodiu 2M. Ulterior, s-a adăugat anticorpul conjugat și amestecul s-a incubat 15-30 min, la temperatura ambiantă. Reacția s-a oprit prin adăugare de EDTA 20 mM până la o concentrație finală de 1 mM și pH-ul soluției s-a ajustat până la aproximativ pH=6 cu acetat de sodiu 2M.

După o incubare de 5 min, întregul volum s-a purificat prin cromatografie de înaltă performanță, de excludere după mărime (s-a descris mai jos). Proteina eluată care conține fracțiunile s-a combinat, s-a determinat concentrația proteinei și s-a examinat pentru radioactivitate un alicot. Încorporarea chelatului s-a calculat folosind activitatea specifică a preparatului de clorură de ytriu. (90) și concentrația proteinei.

v. Imunoreactivitatea lui 2B8 – MX - DTPA

Imunoreactivitatea conjugatului 2B8 s-a examinat folosind celula integrală ELISA.

S-au recoltat din cultură celulele SB în faza Mid-log prin centrifugare și s-au spălat de 2 ori cu 1 X celule HBSS. S-au diluat celulele până la 1-2 x 10⁶ celule/ml în HBSS și s-au împărțit în plăci de microtitrare din polistiren cu 96 godeuri la 50000 – 100 000 celule/godeu.

Plăcile s-au uscat la vid timp de 2 h la 40-45°C pentru fixarea celulelor la plastic; până la utilizare plăcile s-au păstrat la loc uscat, la -20°C. Pentru examen s-au încălzit plăcile la temperatura ambiantă imediat înaintea folosirii, apoi s-au blocat cu 1 x PBS, pH=7,2-7,4 care conține BSA 1% (2 h). Probele pentru examinare s-au diluat în 1 x PBS/BSA 1%, s-au aplicat la plăci și s-au diluat serial (1 :2) în același tampon. După incubarea plăcilor timp de o oră la temperatura ambiantă, plăcile s-au spălat de 3 ori cu 1 x PBS. S-a adăugat la godeuri anticorpul secundar (50 μl conjugat HRP capră anti-șoarece IgG1-specific) (diluție 1:1 500 în 1 x PBS/BSA 1%) și s-au incubat o oră la temperatura ambiantă.

Plăcile s-au spălat de 4 ori cu 1 x PBS urmat de adăugarea de soluție substrat ABTS [citrat de sodiu 50 mM, pH=4,5 conținând ATBS 0,01% și H₂O₂ 0,001%). Plăcile s-au citit la 405 nm după incubare 15-30 min. Celulele HSB antigen-negative s-au inclus în examinări pentru urmărirea legării nespecifice.

Imunitatea conjugatului s-a calculat prin marcarea valorilor absorbantei față de factorul de diluție respectiv și comparând acestea la valorile obținute folosind anticorp nativ (care reprezintă 100 % imunoreactivitate) s-au testat pe aceeași placă; s-au comparat câteva valori de pe porțiunea lineară a profilului titrării și s-a determinat o valoare medie (date neprezentate).

RO 118524 B1

vi. Prepararea lui 2B8 – MX - DTPA marcat indiu(111) ("I2B8")

Conjugatele s-au radiomarcate cu indiu (111) fără purtător. S-a transferat un alicot al izotopului (0,1-2 mCi/mg anticorp) în HCl 0,05 M într-o eprubetă de propilen și s-a adăugat aproximativ 1/10 la volum de HCl 2M fără metal, După incubare timp de 5 min, s-a adăugat acetat de sodiu 2M fără metal pentru a ajusta pH-ul soluției până la 4,0-4,4. S-au adăugat dintr-o soluție stoc DTPA 10,0 ng/ml în soluție salină normală aproximativ 0,5 mg de 2B8-MX-DTPA sau citrat de sodiu 50 mM/NaCl 150 mM conținând azidă de sodiu 0,05 % și soluția s-a amestecat imediat cu grijă. S-a controlat pH-ul soluției cu hârtie de pH măsurând o valoare de 4,0-4,5 și amestecul s-a incubat la temperatura camerei timp de 15-30 min. Ulterior, reacția s-a oprit prin adăugare de EDTA 20 mM până la o concentrație finală de 1 mM și amestecul de reacție s-a adus la pH aproximativ 6,0 folosind acetat de sodiu 2M.

După o incubare de 5-10 min radioizotopul necomplexat s-a îndepărtat prin cromatografie de excludere după mărime. Unitatea HPLC a constat dintr-un Waters Model 6000 sau TosoHaas Model TSK- 6110, având sistem de eliberare respectiv, fiind prevăzut cu o valvă de injectare Waters U6K sau Rheodine 700.

Separările cromatografice s-au realizat folosind o coloană cu gel de permeație (BioRad SEC-250; 7,3 x 300 mm sau o coloană comparabilă TosoHaas) și o coloană de gardă SEC-250 (7,5 x 100 mm). Sistemul a fost echipat cu un colector de fracțiuni (Pharmacia Frac200) și un monitor UV prevăzut cu un filtru de 280 nm (Pharmacia model UV-1). S-au aplicat probele și s-au eluat izocritic folosind 1 x PBS , pH=7,4, la o rată de curgere de 1,0 ml/min.

S-au colectat în eprubete de sticlă 100 ml de fracțiuni și alicotii; din aceștia s-au cuantificat într-un numărator gama. Ferestrele, inferioară și superioară, s-au montat la 100 și respectiv 500 Kev.

S-a calculat radioîncorporarea prin însumarea radioactivității asociate cu maximul proteinei eluate și împărțirea acestui număr prin radioactivitatea totală eluată din coloană; această valoare a fost apoi exprimată ca procent (datele nu s-au prezentat); în câteva cazuri radioîncorporarea s-a determinat folosind cromatografia instantanee în strat subțire ("ITLC").

Conjugatul radiomarcate s-a diluat 1:10 sau 1:20 în 1 x PBS sau în 1 x PBS/DTPA 1mM, apoi 1 μ l s-a colorat la 1,5 cm de la capătul unei fâșii de hârtie ITLC SG de 1 x 5 cm. Hârtia s-a dezvoltat prin cromatografie ascendentă folosind acetat de amoniu 10 % în metanol:apă [1:1 v/v).

Fâșia s-a uscat, s-a tăiat în jumătăți transversale și s-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare secțiune prin numărare gama. Radioactivitatea asociată cu jumătatea superioară a fâșiei (radioactivitatea asociată proteinei) s-a exprimat ca un procent al radioactivității totale, determinată prin însumarea valorilor, atât de la bază, cât și de la vârful jumătăților (date neprezentate).

Activitățile specifice s-au determinat prin măsurarea radioactivității unui alicot corespunzător al conjugatului radiomarcate. Această valoare s-a corectat pentru eficiența numărătorii (de obicei 75%) și s-a raportat la concentrația proteinei conjugatului, determinată anterior prin absorbantă la 280 nm și valoarea rezultată s-a exprimat ca mCi / mg proteină.

Pentru câteva experimente, 2B8-MX-DTPA s-a radiomarcate cu indiu (111) urmând un protocol similar cu unul dintre cele descrise mai sus, dar fără purificare prin HPLC; acesta a fost denumit protocol "mix-and-shoot".

vii. Prepararea de 2B8 – MX - DTPA marcat ytriu (90)("Y2B8")

Pentru prepararea de conjugat 2B8-MX-DTPA marcat ytriu (90)("Y2B8") s-a urmat același protocol descris pentru prepararea lui I2B8, cu excepția că nu s-a folosit HCL 2 ng; toate preparatele conjugatelor marcate cu ytriu s-au purificat prin cromatografie de excludere după mărime, așa cum s-a descris mai sus.

C. Studii pe animal non-uman

690 i. Biodistribuția lui 2B8 – MX - DTPA radiomarcant

S-a evaluat I2B8, pentru biodistribuție tisulară în șoareci BALB/c de 6 până la 8 săptămâni. Conjugatul radiomarcant s-a preparat folosind 2B8-MX-DTPA grad-clinic, urmând protocolul "mix-and-shoot" descris mai sus. Activitatea specifică a conjugatului a fost 2,3 mCi/mg și conjugatul s-a formulat în PBS, pH=7,4 care conține HSA.

695 S-au injectat intravenos șoareci cu 100 μl de I2B8 (aproximativ 21 μCi) și grupuri de câte 3 șoareci s-au sacrificat prin dislocare cervicală la 0, 24, 48 și 72 h. După sacrificare, s-au păstrat: coada, inima, plămânii, ficatul, rinichii, splina, mușchii și femurul care s-au spălat și s-au cântărit. De asemenea, s-a recuperat pentru analiză o probă de sânge.

700 Radioactivitatea asociată cu fiecare specimen s-a determinat prin numărare gama și ulterior s-a determinat procentul dozei injectate/g de țesut. Nu s-a acordat atenție contribuției scăderii activității reprezentată prin sângele asociat cu organele individuale.

705 Într-un protocol separat, s-au incubat alicoji de 2B8 – MX-DTPA la 4°C și 30°C timp de 10 săptămâni și s-au radiomarcant cu indiu (111) pentru activitate specifică de 2,1 mCi/mg pentru ambele preparate. Aceste conjugate s-au folosit apoi în studiile biodistribuției la șoareci așa cum s-a descris mai sus.

Pentru determinări dozimetrice s-a radiomarcant 2B8-MX-DTPA cu indiu (111) până la o activitate specifică de 2,3 mCi/mg și s-au injectat aproximativ 1,1 μCi în fiecare din cei 20 șoareci BALB/c. În continuare, grupuri de câte 5 șoareci fiecare s-au sacrificat la 1, 24, 48 și 72 h, iar organele s-au oprit și s-au preparat pentru analiză. Suplimentar, s-au recuperat porțiuni de piele, mușchi și os și s-au prelucrat pentru analize; de asemenea, s-au colectat urina și fecalele și s-au analizat, după sacrificările de la 24 și 72 h.

710 Folosind o abordare similară, 2B8-MX-DTPA s-a radiomarcant de asemenea, cu ytriu (90) și distribuția s-a biologică s-a evaluat în șoareci BALB/c după o perioadă de timp de 72 h. După purificare prin HPLC cromatografie de excludere după mărime, 4 grupe de 5 șoareci fiecare s-au injectat intravenos cu aproximativ 1 μCi de conjugat formulat clinic (activitate specifică: 12,2 mCi/mg); grupurile au fost apoi sacrificate la 1, 24, 48 și 72 h, iar organele și țesuturile lor s-au analizat așa cum s-a descris mai sus.

720 Radioactivitatea asociată cu fiecare specimen de țesut s-a determinat prin măsurarea energiei radiației de frânare cu un contoar de scintilație gama. Valorile activității au fost exprimate ulterior ca procent doză injectată per gram țesut sau procent doză injectată per organ. Deoarece, organele și alte țesuturi s-au clătit repetat pentru îndepărtarea sângelui superficial, organele nu au fost perfuzate. Astfel, valorile activităților organului nu s-au scăzut din contribuția de activitate reprezentată de către sângele intern asociat.

ii. Localizarea tumorală a lui I2B8

725 Localizarea lui 2B8-MX-DTPA radiomarcant s-a determinat în șoareci purtători de tumori ale celulelor B atimice Ramos. șoareci atimici în vârstă de 6 până la 8 săptămâni s-au injectat subcutanat (în partea dorsală stânga) cu 0,1 ml de RPMI - 1640, conținând $1,2 \times 10^7$ celule tumorale Ramos care au fost anterior adaptate pentru creștere în șoareci atimici. Tumorile au fost provocate în două săptămâni și au fost cuprinse în domeniul de greutate de la 0,07 până la 1,1 g. S șoarecii s-au injectat intravenos cu 100 μl de 2B8-MX-DTPA marcat indiu (111) (16,7 μCi) și grupuri de câte 3 șoareci s-au sacrificat prin dizlocare cervicală la 0, 24, 48 și 72 h.

735 După sacrificare s-au recuperat coada, inima, plămânii, ficatul, rinichii, splina, mușchiul, femurul și tumoarea, s-au spălat și s-au cântărit; de asemenea, s-a prelevat pentru analiză o probă de sânge. S-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare specimen prin numărare gama și s-a determinat procentul doză injectată/g țesut.

RO 118524 B1

iii. Studii privind biodistribuția și localizarea tumorală cu 2B8-MX-DTPA radiomarcate

După experimentul preliminar asupra biodistribuției descris mai sus (exemplul I.B.viii.) s-a radiomarcat conjugatul 2B8 cu indiu (111) până la o activitate specifică de 2,3 mCi/mg și aproximativ 1,1 μ Ci, apoi s-au injectat în fiecare din cei 20 de șoareci BALB/c pentru a determina biodistribuția materialului marcat. 740

În continuare, s-au sacrificat grupuri de câte 5 șoareci fiecare, la 1, 24, 48 și 72 h, prelevându-se organele lor și porțiuni de piele, mușchi și os care s-au prelucrat pentru analize. În plus, s-a colectat urina și fecalele și s-au analizat pentru momentele de timp 24 și 72 h. Nivelul radioactivității în sânge a scăzut de la 40,3 % doză injectată per gram la o oră, până la 18,9 % la 72 h (datele nu au fost prezentate). Valorile pentru inimă, rinichi, mușchi și splină au rămas în domeniul 0,7 - 0,9 % de-a lungul experimentului. Nivelurile de radioactivitate găsite în plămâni au scăzut de la 14,2 % la o oră până la 7,6 % la 72 h; în mod asemănător, respectiv doza injectată per gram în ficat a scăzut de la 10,3 % la 9,9 %. Aceste date s-au folosit în determinarea dozei de radiații absorbită estimată de 12B8 descrisă mai jos. 745 750

Biodistribuția conjugatului marcat ytriu [90] având o activitate specifică de 12,2 mCi/mg anticorp s-a evaluat în șoareci BALB/c. S-au obținut radioîncorporări de peste 90 % și anticorpul radiomarcate s-a purificat prin HPLC. Depozitul tisular de radio-activitate s-a evaluat în organele principale și piele, mușchi, os, urină și fecale după 72 h și s-a exprimat ca procent doza injectată/g țesut. 755

Rezultatele (neprezentate) au evidențiat că în timp ce nivelurile de radioactivitate asociată cu sângele au scăzut de la aproximativ 39,2 % doză injectată/g la o oră, până la aproximativ 15,4 % după 72 h; nivelurile radioactivității asociată cu coada, inima, rinichiul, mușchiul și splina au rămas îndeajuns de constante la 10,2 % sau mai în cursul experimentului. 760

Important a fost faptul că radioactivitatea asociată cu osul a fost în domeniul de la 4,4 % de doză injectată/g os la o oră, până la 3,2 % la 72 h. Toate acestea, luate împreună, sugerează că puțin ytriu liber s-a asociat cu conjugatul și că puțin radiometal liber s-a eliberat în timpul desfășurării studiului. Aceste date s-au folosit pentru determinarea estimării dozei de radiații absorbită pentru Y2B8 descris mai jos. Pentru studii asupra localizării tumorale s-a preparat 288-MX-DTPA și s-a marcat radioactiv cu indiu (111) până la o activitate specifică de 2,7 mCi/mg. În continuare, s-au injectat 100 μ l de conjugat marcat (aproximativ 24 μ Ci) în fiecare din 12 șoareci atimici purtători de tumori Ramos ai celulei B. Tumorile au aparținut în greutate domeniului de la 0,1 până la 1,0 g. 765 770

La momentele de timp 0, 24, 48 și 72 h după injecție s-au prelevat 50 μ l de sânge prin puncție retro-orbitală, șoarecii s-au sacrificat prin dizlocare cervicală și s-au reținut coada, inima, plămânii, ficatul, rinichiul, splina, mușchiul, femurul și tumoarea. După prelucrarea și cântărirea țesuturilor s-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare tip de țesut folosind un contoar gama și valorile s-au exprimat ca procent doză injectată/g. 775

Rezultatele (neprezentate) au evidențiat că, concentrațiile tumorale ale 2B8-MX-DTPA marcate indiu (111) au crescut constant în cursul experimentului. Din doza injectată 30 % s-a acumulat în tumoră după 72 h. În contrast, nivelurile sanguine au scăzut în timpul experimentului, de la peste 30 % la momentul 0, până la 13 % la 72 h.

Toate țesuturile cu excepția mușchiului au un conținut între 1,3 și 6,0% doză injectată/g țesut la sfârșitul experimentului; țesutul muscular a avut un conținut de aproximativ 13% din doză injectată/g. 780

D. Studii umane

i. 2B8 și 2B8-MX-DTPA: Studii imunohistologice cu țesuturi umane

785 Reactivitatea tisulară a anticorpului monoclonal murin 2B8 s-a evaluat folosind o gamă de 32 țesuturi umane diferite, fixate cu acetonă. Anticorpul 2B8 reacționează cu antigenul anti-CD20 care are o imagine foarte restrictivă a distribuției tisulare fiind observat doar într-un subset de celule în țesuturi limfoide, incluzându-le pe cele de origine hematopoietică.

790 În nodulii limfoizi s-a observat imunoreactivitate într-o populație de limfocite B corticale mature la fel de bine ca și în celulele proliferative din centrele germinale. De asemenea, s-a observat reactivitate pozitivă în sângele periferic, ariile de celule B ale amigdalelor, pulpa albă a splinei și 40-70% din limfocitele medulare găsite în timus.

795 De asemenea, s-a observat reactivitate pozitivă în foliculii laminei propria (Peyer's Patches) ale intestinelor mari. Au fost de asemenea, rezultate pozitive cu anticorpul 2B8 la celule grupate sau izolate în stroma a diferite organe incluzând vezica urinară, sân, col uterin, esofag, plămân, parotidă, prostată, intestin subțire și stomac (datele nu s-au prezentat).

800 Toate celulele simple precum și epiteliul diferitelor organe s-a găsit a fi nereactiv. În mod asemănător, nu s-a observat reactivitate în celulele neuroectodermale, inclusiv cele din creier, coarda spinală și nervii periferici. De asemenea, s-au găsit a fi negative elementele mezenchimale precum și celulele musculare, scheletice și netede, fibroblastele, celulele endoteliale și celulele polimorfonucleare inflamatoare (nu s-au prezentat datele).

805 Reactivitatea tisulară a conjugatului 2B8-MX-DTPA s-a evaluat folosind o gamă de 16 țesuturi umane care s-au fixat cu acetonă. Așa cum s-a demonstrat anterior cu anticorpul nativ (date neprezentate), conjugatul 2B8-MX-DTPA a recunoscut antigenul CD20 care a prezentat o imagine a distribuției strict restricționată, fiind găsit doar pe un subset de celule de origine limfoidă.

810 În nodulii limfoizi s-a observat imunoreactivitate în populația de celule B. Reactivitate puternică s-a văzut în pulpa alba a splinei și în limfocitele medulare ale timusului.

De asemenea, s-a observat imunoreactivitate în limfocite izolate din vezica urinară, inimă, intestinul gros, ficat, plămâni și uter și s-a atribuit prezenței celulelor inflamatoare aflate în aceste țesuturi. Ca și în cazul anticorpului nativ, nu s-a observat reactivitate în celulele neuroectodermice sau în celulele mezenchimului (datele nu s-au prezentat).

ii. Analiza clinică a I2B8 (formare de imagine) și Y2B8 (terapie)

815 *a) Experiment clinic faza I/II, studiu terapeutic cu doză unică*

În mod curent, s-a condus o analiză clinică faza I/II a I2B8 (formare de imagine) urmată de tratament cu o doză unică de Y2B8. Pentru studiul doză unică s-a folosit următoarea schemă:

- 820 1. Recoltare cu eliminare de celule stemice periferice (PSC) sau măduvă osoasă (BM);
2. Formare de imagine I2B8;
3. Terapie Y2B8 (trei niveluri de doză); și
- 825 4. Transplantare PSC sau BM autologă (dacă este necesar, pe baza numărării neutrofilelor sub 500/mm³ timp de trei zile consecutive sau plachete sanguine sub 20000/mm³ fără evidențiere de recuperare a măduvei prin examinarea măduvei osoase timp de trei zile consecutive).

Nivelurile dozei Y2B8 au fost următoarele:

	Nivelul dozei	Doza (mCi)
830	1.	20
	2.	30
	3.	40

RO 118524 B1

Au fost tratați trei pacienți la fiecare din nivelurile de doză pentru determinarea unei doze maxime tolerate ("MTD").

Studiile privind formarea de imagine (dozimetria) s-au condus după cum urmează: fiecare pacient a fost cuprins în două studii *in vivo* asupra biodistribuției folosind I2B8. 835

În primul studiu s-a administrat ca infuzie intravenoasă (i.v.) în timp de o oră o cantitate de 2 mg I2B8 (5 mCi); o săptămână mai târziu s-a administrat 2B8 (adică anticorp neconjugat) i.v. la o rată care nu depășește 250 mg/h urmat imediat de 2 mg de I2B8 (5 mCi) administrat i.v. pe parcursul unei ore. 840

În ambele studii, imediat după infuzia I2B8, fiecare pacient s-a supus formării unei imagini și aceasta s-a repetat la momentul $t=14-18$ h, $t=24$ h, $t=72$ h și $t=96$ h.

S-au determinat timpii de retenție medii pentru indiu (111) marcat pentru întregul corp; de asemenea, s-au făcut astfel de determinări pentru recunoașterea organelor sau leziunilor tumorale ("regiuni de interes"). Regiunile de interes s-au comparat la concentrațiile marcajului din întregul corp; pe baza acestei comparații, se poate determina o estimare a localizării și concentrației lui Y2B8 folosind protocoale standard. Dacă doza cumulativă estimată a lui Y2B8 este mai mare decât 8 x doza estimată pentru întregul corp sau dacă doza cumulativă estimată pentru ficat depășește 1500 cGy, nu va avea nici un tratament cu Y2B8. 845

Dacă studiile de formare a imaginii sunt acceptabile, se administrează i.v. 0,0 sau 1,0 mg/kg greutate corporală a pacientului 2B8 la o rată de infuzie care nu depășește 250 mg/h. 850

Aceasta este urmată de administrare de Y2B8 (10, 20 sau 40 mCi) la o rată de infuzie de 20 mCi/h. 855

b) Experiment clinic faza I/II: studiu terapeutic cu doză multiplă

S-a condus în mod curent o analiză clinică faza I/II a lui Y2B8. Pentru studiul dozei multiple s-a folosit următoarea schemă:

1. Prelevare PSG sau MB;
2. Formare de imagine I2B8;
3. Terapie Y2B8 (trei niveluri de doză) pentru patru doze sau o doză cumulativă totală de 80 mCi; și
4. Transplantare PSC sau BM autologă (pe baza deciziei medicului practicant).

Nivelurile dozei lui Y2B8 au fost după cum urmează:

Nivelul dozei	Doza (mCi)	
1.	10	865
2.	15	
3.	20	

Au fost tratați trei pacienți la fiecare din nivelurile de doză pentru determinarea unui MTD. 870

Studiile privind formarea de imagine (dozimetria) au fost conduse după cum urmează: s-a determinat cu primii 2 pacienți o doză preferată asupra formării imaginii pentru anticopul nemarcat (adică, 2B8). Primii 2 pacienți au primit 100 mg de 2B8 nemarcat în 250 cm³ în soluție salină normală pe parcursul a 4 h, urmat de 0,5 mCi de I2B8; s-a recoltat sânge pentru datele de biodistribuție la momentele $t=0$, $t=120$ min, $t=24$ h și $t=48$ h. Pacienții au fost scanați cu o cameră pentru imagini gama din regiuni multiple la momentele $t=2$ h, $t=24$ h, $t=48$ h. După scanare, la $t=48$ h, pacienții au primit 250 mg 2B8, urmat de 4,5 mCi I2B8. 875

Așa cum s-a descris urmează recoltarea de probe de sânge și scanarea. Dacă 100 mg de 2B8 produc imagini superioare, atunci următorii 2 pacienți vor primi 50 mg de 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 0,5 mCi de I2B8, urmat 48 h mai târziu de 100 mg 2B8 880

și apoi cu 4,5 mCi de I2B8. Dacă 250 mg de 2B8 produc imagini superioare, atunci următorii 2 pacienți vor primi 250 mg de 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 0,5 mCi de I2B8, urmat 48 h mai târziu de 500 mg 2B8 și apoi de 4,5 mCi de I2B8.

885 Următorii pacienți vor fi tratați cu cele mai scăzute cantități de 2B8 care furnizează formarea optimă de imagini. Formarea optimă de imagine va fi definită prin: (1) cea mai eficientă formare de imagine cu cea mai lentă dispariție a anticorpului, (2) cea mai bună distribuție care micșorează repartizarea într-un singur organ și (3) cea mai bună rezoluție subiectivă a leziunii (tumoare/evoluția comparativă).

890 Pentru primii 4 pacienți, prima doză terapeutică de Y2B8 va începe la 14 zile după ultima doză de I2B8; pentru următorii pacienți prima doză terapeutică de Y2B8 va începe între 2 până la 7 zile după I2B8.

895 Înaintea tratamentului cu Y2B8, pentru pacienții alții decât primii 4, 2B8 se va administra așa cum s-a descris urmat de infuzie i.v. de Y2B8 după 5-10 min. Se vor recolta probe de sânge pentru biodistribuție la momentele t=0, t=10 min, t=120 min, t=24 h și t=48 h. Pacienții vor primi doze repetitive de Y2B8 [aceiași doză administrată ca și în cazul primei doze), aproximativ în fiecare 6 până la 8 săptămâni pentru un maxim de 4 doze sau în total doză cumulată de 80 mCi. Cel mai adesea este de preferat ca pacienții să nu primească următoarea doză de Y2B8 până când WBC-ul pacienților este mai mare decât/egal la 3 000 și AGC este mai mare decât/egal la 100000.

900 După completarea studiului nivelului celor trei doze se va defini un MTD. Apoi, în studiu vor fi cuprinși pacienți suplimentari și aceștia vor primi MTD-ul.

Exemplul II. Producerea de anticorp himeric anti-CD20 ("C2B8")

905 **A. Construcția vectorului de expresie ADN a imunoglobulinei himerice anti-CD20**
S-a izolat ARN de la celulele hibridomice de șoarece 2B8 (așa cum s-a descris în Chomczynski, P. et al., Single step method RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" Anal. Biochem.162;156-159 (1987) și s-a preparat de la acesta cADN.

910 ADN-ul regiunii variabile a catenei ușoare de imunoglobulină de șoarece s-a izolat de la cADN prin reacție polimerazică de lanț, folosind un set de primeri ai ADN-ului cu homologie la secvențele semnal ale catenei ușoare de șoarece la capătul 5' și regiunea J a catenei ușoare de șoarece la capătul 3'. Secvențele primer au fost după cum urmează:

1. V_L Sens (secvența ID nr. 3)

5'ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC 3'

915 (Porțiunea subliniată este un sit Bgl II; porțiunea subliniată mai sus este codonul de start).

2. V_L Antisens (Secvența ID nr. 4)

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

(Porțiunea subliniată este un sit Bsi WI)

920 Vezi fig.1 și 2 pentru siturile corespunzând la Bgl II și Bsi WI în TCAE 8, și fig.3 pentru siturile corespunzătoare în anti-CD20 în TCAE 8.

Acest fragment ADN rezultat s-a clonat direct în vectorul TCAE 8 în fața domeniului constant al catenei ușoare kapa umane și s-a secvențiat. Secvența ADN determinată pentru regiunea variabilă a catenei ușoare murine este menționată în fig.4 (Secvența ID nr.5); de asemenea, vezi fig.3 nucleotidele 978 până la 1362.

925 Fig.4 asigură suplimentar secvența aminoacidică de la această regiune variabilă murină, CDR-ul și regiunile cadru. Regiunea variabilă a catenei ușoare de șoarece de la 2B8 este din familia kapa VI de șoarece. Vezi Kabat de mai sus.

Regiunea variabilă a catenei grele de șoarece s-a izolat în mod asemănător și s-a clonat în fața domeniilor constante IgG1.

RO 118524 B1

- Primerii au fost după cum urmează: 930
1. V_H Sens (Secvența ID nr. 6)
5' GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC CAG 3'
(Porțiunea subliniată este un sit Mlu I).
 2. V_H Antisens (Secvența ID nr. 7)
5' GG(G/C) TGT TGT GCTAGC TG(A/C) (A/G)GA GAC (G/A)GT GA 3'
(Porțiunea subliniată este un sit Nhe I).
- Vezi fig.1 și 2 pentru siturile corespunzătoare Mlu I și Nhe I în TCAE 8 și fig.3 pentru siturile corespunzătoare în anti-CD20 în TCAE 8.
- Secvența pentru această catenă grea de șoarece este prezentată în fig.5 (Secvența ID nr.8); vezi de asemenea, fig.3 nucleotidele 2401 până la 2820. De asemenea, fig.5 dă secvența aminoacidică de la această regiune variabilă murină, CRD-ul și regiunile cadru. Regiunea variabilă a catenei grele de șoarece de la 2B8 este din familia VH 2B de șoarece. Vezi Kabat de mai sus. 940
- B. Crearea de anti-CD20 himerici care produc transfectomați CHO și SP2/O**
- S-au crescut celule de DG44 dintr-o linie celulară ovariană de hamster chinezesc ("CHO") în mediu SSFM II fără hipoxantină și timidină [Gibco, Grand Island, NY, Forma nr. 91-0456PK; celule mielomice de șoarece SP2/O s-au crescut pe mediu Dulbecco Modified Eagles Medium ("DMEM") (Irvine Scientific, Santa Ana", Ca., Cat. nr.9024), având adăugat 5 % ser fetal bovin și 20 ml/l glutamină. S-au suspus electroporării 4 milioane celule, fie cu 25 μg CHO, fie cu 50 μg SP2/O plasmid ADN care fusese restricționat cu Not I folosind un sistem de electroporare BTX 600 (BTX, San Diego, CA) în cuve de 0,4 ml nerecuperabile. 945
- Condițiile au fost fie 210 V pentru CHO, fie 180 V pentru SP2/O, 400 μF, 13 Ω. Fiecare electroporat s-a depus în 6 plăci cu 96 de godeuri (circa 7000 celule pe godeu). Discurile s-au alimentat cu mediu conținând G418 (GENETICIN, Gibco, nr. catalog 860-1811) la 400 μg/ml compus activ pentru CHO (mediul a inclus suplimentar 50 μM hipoxantină și 8 μM timidină) sau 800 μg/ml pentru SP2/O, două zile după electroporare și apoi 2 sau 3 zile până când au apărut coloniile. S-au examinat supernatante de la colonii pentru prezență de imunoglobulină himerică pe calea unei ELISA specifică pentru anticorp uman. 950
- Coloniile care produc cea mai ridicată cantitate de imunoglobulină s-au extins și s-au depus în plăci cu 96 godeuri conținând mediu plus metrotexat (25 nM pentru SP2/O și 5 nM pentru CHO) și s-au alimentat la fiecare 2 sau 3 zile. Supernatantele s-au cercetat ca mai sus și s-au examinat coloniile care produc cea mai ridicată cantitate de imunoglobulină. S-a purificat din supernatant anticorpul himeric anti-CD20 folosind proteina A de afinitate cromatografică. 955
- S-a analizat himericul anti-CD20 purificat prin electroforeză în geluri poli(acrilamidice și s-a estimat a fi mai pur decât circa 95 %. Afinitatea și specificitatea anticorpului himeric s-a determinat pe baza 2B8. Anticorpul himeric anti-CD20 s-a testat în încercări de legare directă și competitivă, când comparându-se la anticorpul monoclonal anti-CD20 murin 2B8, s-a evidențiat afinitatea și specificitatea comparabilă pe un număr de linii celulare B CD20 pozitive (datele nu s-au prezentat). 960
- Afinitatea aparentă constantă ("Kap") a anticorpului himeric s-a determinat prin legare directă de anti-CD20 himeric radiomarcant I¹²⁵ și s-a comparat la 2B8 radiomarcant prin plot Scatchard; Kap-ul estimat pentru CHO produs himeric anti-CD20 a fost 5,2 x 10⁻⁹ M și pentru SP2/O a fost 7,4 x 10⁻⁹ M. Kap-ul estimat pentru 2B8 a fost 3,5 x 10⁻⁹M. 965
- 970
- 975

S-a utilizat competiția directă prin radioimnotest pentru a confirma, atât specificitatea, cât și retenția de imunoreactivitate a anticorpului himeric prin compararea capacității sale de a concura eficient cu 2B8. Au fost necesare cantități substanțiale echivalente de anticorpi himerici anti-CD20 și 2B8 pentru a produce inhibarea a 50 % a legării la antigeni CD20 pe celule B (date neprezentate), adică, a fost o pierdere minimă de activitate de inhibare a anticorpilor anti-CD20 probabil himerizării.

Rezultate de la exemplul II. B. indică, printre altele, că anticorpii himerici anti-CD20 s-au generat de la produsele de transfecție CHO și SP2/O folosind vectori TCAE 8 și că acești anticorpi himerici au avut în principal aceeași specificitate și capacitate de legare ca anticorpurile monoclonale anti-CD20 murine 2B8.

C. Determinarea activității imunologice a anticorpilor himerici anti-CD20

i. Analiza C1q uman

Anticorpii himerici anti-CD20 produși, atât prin linia celulară CHO, cât și SP2/O, s-au evaluat pentru legare C1q uman într-un test de curent citometric folosind C1q marcat cu fluoresceină (C1q s-a obținut de la Quidel, Mira Mesa, CA, Prod. Nr. A400 și FITC label de la Sigma, St. Louis MO, Prod. nr. F-7250); FITC. Marcarea lui C1q s-a realizat în concordanță cu protocolul descris în Selected Methods In Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed.(W.H.Freeman &Co., San Francisco, CA, 1980, p. 292).

Rezultatele analitice s-au derivat folosind un citometru de flux Decton Dickinson FACScan™ (fluoresceina s-a măsurat pe un domeniu de 515-545 nm).

S-au incubat cantități echivalente de anticorp himeric anti-CD20, IgG1 uman, proteină mielomă K (Binding Site, San Diego, CA, Prod. Nr. BP078) și 2B8 cu un număr echivalent de celule SB CD20 pozitive, urmat de o etapă de spălare cu tampon FACS (2% BSA în PBS, pH 7,4, 0,2 % azidă de sodiu) pentru îndepărtarea anticorpului neatașat, urmată de incubare cu C1q marcat FITC. După o incubare de 30-60 min, celulele s-au spălat din nou. Cele trei condiții inclusiv C1q marcat FITC drept control s-au analizat pe FACScan™ urmând instrucțiunile fabricantului. Rezultatele sunt prezentate în fig.6.

Așa cum rezultă din fig.6, s-a observat o creștere semnificativă în fluorescență numai pentru condițiile anticorp himeric anti-CD20; adică, numai celulele SB cu anticorp himeric anti-CD20 aderent au fost C1q pozitive, în timp ce alte condiții au produs aceeași imagine ca și controlul.

ii. Lize celulare dependente de complement

Anticorpii himerici anti-CD20 s-au analizat pentru capacitatea lor de a liza linii celulare de limfom în prezența serului uman (sursă de complement). Celulele SB CD20 pozitive s-au marcat ^{51}Cr prin amestecarea a 100 μCi de ^{51}Cr cu 1×10^6 celule SB timp de o oră la 37°C; celulele SB marcate au fost incubate apoi în prezență de cantități echivalente de complement uman și cantități echivalente (0-50 $\mu\text{g/ml}$) de, fie anticorpi himerici anti-CD20, fie 2B8 timp de 4 h la 37°C (vezi Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labeled allogeneic target cells *in vitro*". Immunology 14:181-189 (1968).

Rezultatele sunt prezentate în fig.7. Rezultatele din fig.7 indică printre altele că anticorpii himerici anti-CD20 au produs liză semnificativă (49 %) în aceste condiții.

iii. Examinarea citotoxicității celulare dependentă de anticorpurile efector

Pentru acest studiu s-au folosit celule pozitive CD20 (SB) și celule negative CD20 (celule T linie leucemică HSB; vezi, Adams. Richard, "Formal Discussion", Can. Res. 27:2479-2482 (1967); depozit ATCC nr. ATCC CCL 120.1); ambele s-au marcat cu ^{51}Cr . Analizele au urmat protocolul descris în 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); s-a observat liza celulară mediată

RO 118524 B1

- de anticorpur himeric anti-CD20 a celulelor țintă SB pozitive CD20 (marcate ^{51}Cr) la sfârșitul incubării 4 h la 37°C și acest efect s-a observat pentru ambii anticorpi produși CHO și SP2/0 (celulele efectorie au fost. limfocite umane; raportul celule efectorie:țintă a fost 100:1). Liza eficientă a celulelor țintă s-a obținut la $3,9 \mu\text{g/ml}$. Spre deosebire, în aceleași condiții, anticorpur monoclonal anti-CD20 murin 2B8 a avut un efect statistic nesemnificativ și celule CD20 negative HSB nu au fost lizate. Rezultatele sunt prezentate în fig.8. 1025
- Rezultatele exemplului II, indică, între altele că anticorpii himerici anti-CD20 din exemplul I au fost imunologic activi. 1030
- Exemplul III. Reducerea in vivo a celulelor B folosind himeric anti-CD20**
- A. Studiu la primate non-umane**
- S-au efectuat 3 studii separate la primate neumane. Pentru conveniență, acestea au fost numite aici ca "Himeric anti-CD20; CHO & SP2/O"; "Himeric anti-CD20:CHO"; și "Dozaj ridicat himeric anti-CD20". Condițiile au fost precum urmează: Anti-CD20 himeric:CHO & SP2/O. 1035
- Șase maimuțe cynomolgus cu greutatea cuprinse între 4,5 și 7 kg (White Sands Research Center, Alamogordo, NM) s-au împărțit în 3 grupuri de câte 2 maimuțe fiecare. Ambele animale din fiecare grup au primit aceeași doză de anticorpur himeric anti-CD20 imunologic activ. Un animal din fiecare grup a primit anticorpur purificat produs prin transfectom CHO; altul a primit anticorpur produs prin transfectom SP2/O. Cele trei grupuri au primit doze de anticorpur corespunzând la 0,1 mg/kg, 0,4 mg/kg, și 1,6 mg/kg în fiecare zi timp de 4 zile consecutiv. 1040
- Anticorpur himeric anti-CD20 imunologic activ, care s-a amestecat cu soluție salină sterilă s-a administrat prin infuzie intravenoasă; au fost luate probe de sânge înainte de fiecare infuzie. S-au luat probe suplimentare de sânge începând la 24 h după ultima injecție ($T=0$) și apoi în zilele 1, 3, 7, 14 și 28; De asemenea, probe de sânge au fost luate după aceea la intervale bisăptămânale până la finalizarea studiului la ziua 90. 1045
- S-au centrifugat aproximativ 5 ml din întregul sânge de la fiecare animal la 2000 rpm, timp de 5 min. S-a recuperat plasma pentru examenul nivelurilor de anticorpur himeric anti-CD20 solubil. Peletul (care conține leucocite din sânge periferic și celule sanguine roșii) s-a resuspendat în ser fetal de vițel pentru analiza anticorpului marcat fluorescent (vezi, "Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population" de mai sus). 1050
- Anti-CD20 himeric:CHO*
- Șase maimuțe cynomolgus cu greutatea cuprinsă între 4-6 kg (White Sands) s-au împărțit în 3 grupuri de câte 2 maimuțe fiecare. Toate animalele s-au injectat cu anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi produși de transfectomul CHO (în soluție salină sterilă). S-au separat trei grupuri după cum urmează: subgrupul 1 a primit injecții intravenoase zilnice de 0,01 mg/kg anticorpur o perioadă de 4 zile; subgrupul 2 a primit zilnic injecții intravenoase de 0,4 mg/kg anticorpur o perioadă de 4 zile; subgrupul 3 a primit o singură injecție intravenoasă de 6,4 mg/kg anticorpur. 1055
- Pentru toate trei subgrupurile s-a obținut o probă de sânge înaintea inițierii tratamentului; de asemenea, suplimentar, s-au luat probe de sânge la $T=0$, 1, 3, 7, 14 și 28 zile după ultima injecție așa cum s-a descris mai sus și aceste probe s-au prelucrat pentru analiza anticorpului marcat fluorescent (vezi, "Fluorescent Antibody, Labeling" de mai sus). Pe lângă cuantificarea celulelor B din sângele periferic s-au prelevat biopsii din nodulii limfatici la zilele 7, 14 și 28 după ultima injecție și s-a colorat un singur preparat de celule pentru cuantificarea populațiilor de limfocite prin citometrie în flux. 1060
- Dozaj ridicat de anti-CD20*
- S-au infuzat două maimuțe cynomolgus (White Sands) cu 16,8 mg/kg anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi de la transfectomi CHO (în soluție salină sterilă) săptămânal pe o perioadă de 4 săptămâni consecutive. La încheierea tratamentului ambele 1065
- 1070

- 1075 animale au fost anesteziate pentru recuperarea măduvei osoase; de asemenea, s-au luat biopsii din noduli limfatici. Ambele seturi de țesuturi s-au colorat pentru prezență de limfocite B folosind Leu 16 prin citometrie în flux folosind protocolul descris în Ling, N.R., et al., "B-cell and plasma cell antigens" Leucocyte Typing III White Cell Differentiations Antigens, A. J. McMichael, Ed. (Oxford University Press, Oxford UK, 1987), p.302.
- 1080 *Populația celulară limfoidă de anticorpi marcați fluorescent*
După îndepărtarea plasmei, leucocitele s-au spălat de 2 ori cu soluție salină echilibrată Hanks ("HBSS") și s-au resuspendat într-un volum de plasmă echivalent de ser fetal bovin (inactivată termic la 56°C, timp de 30 min).
- 1085 S-a distribuit un volum de 0,1 preparat celular la 6 eprubete conice de centrifugă de 15 ml. S-au adăugat la 3 dintre eprubete, anticorpi monoclonali marcați cu fluoresceină pentru markerii limfocitari umani de suprafață CD2 (AMAC, Westbrook, ME), CD20 (Becton Dickinson) și IgM uman (Binding Site, San Diego, CA) pentru identificarea populațiilor de limfocite T și B.
- 1090 Toți reactivii au fost testați anterior ca pozitivitate la antigenii corespunzători limfocitelor de maimuță. Legarea anticorpului himeric anti-CD20 la CD20 de la suprafața celulei B de maimuță s-a măsurat în 4 eprubete folosind anticorp policlonal capră-anti-IgG uman cuplat cu ficoeritrină (AMAC). Acest reactiv s-a preadsorbit pe o coloana de Sepharoză Ig maimuță, pentru a preveni reactivitatea încrucișată la Ig maimuță, permițând astfel detectarea specifică și cuantificarea anticorpului himeric anti-CD20 legat la celule.
- 1095 A-5-a eprubetă a inclus reactivi anti-IgM și anti-IgG uman pentru colorație dublă a populației de celule B. A-6-a probă nu a inclus nici un reactiv pentru a se putea determina autofluorescența.
- 1100 Celulele s-au incubat cu anticorpi fluorescenți timp de 30 min, s-au spălat și s-au fixat cu 0,5 ml tampon de fixare (NaCl 0,15 M paraformaldehidă 1 %, pH=7,4 și s-au analizat pe un instrument Becton Dickinson FACScan™.
- Populațiile limfocitare s-au identificat inițial prin sens direct contra unghiului drept al luminii difuze într-o hartă punctiformă cu leucocite nemarcate. Apoi, s-a izolat populația totală de limfocite prin eliminarea tuturor celorlalte evenimente. Măsurătorile ulterioare de fluorescență au reflectat doar evenimentele specifice limfocitelor selectate.
- 1105 *Distrugerea limfocitelor B din sângele periferic*
Nu s-a putut stabili nici o diferență observabilă între eficiența anticorpilor produși CHO și SP2/O în distrugerea *in vivo* a celulelor B, deși o ușoară creștere în recuperarea celulelor B a început după 7 zile, pentru maimuțele injectate cu anticorpi himerici anti-CD20 derivați de la transfectări CHO la nivelurile de dozare 1,6 mg/kg și 6,4 mg/kg, observându-se și pentru maimuța injectată cu anticorp produs SP2/O la un nivel de dozare de 0,4 mg/kg.
- 1110 Fig.9A, B și C dau rezultatele derivate de la studiul anti-CD20 himeric: CHO & SP2/O, cu fig.9A orientată spre nivelul dozei de 0,4 mg/kg, fig.9B orientată spre nivelul dozei de 1,6 mg/kg, și fig.9C orientată spre nivelul dozei de 6,4 mg/kg.
- 1115 Așa cum este evident din fig.9, a existat o descreștere dramatică în nivelul celulelor B periferice (> 95%) după tratamentul terapeutic față de toate domeniile de doză testată, iar aceste nivele s-au menținut până la 7 zile post-infuzie; după această perioadă, celulele au început să se recupereze și în momentul inițierii recuperarea a fost independentă de nivelurile dozei.
- 1120 În studiul anti-CD20 himeric:CHO s-a utilizat o concentrație de dozare a anticorpului de 10 ori mai scăzută (0,01 mg/kg) o perioadă de timp de 4 injecții zilnice (total 0,04 mg/kg).
- Fig.10 dă rezultatele acestui studiu. Acest dozaj a distrus populația de celule sanguine B periferice până la aproximativ 50 % din nivelurile normale estimate, fie cu antigen de suprafață IgM, fie cu anticorp Leu 16.

RO 118524 B1

De asemenea, rezultatele indică saturația antigenului CD20 pe populația limfocitară B, care nu s-a obținut cu anticorpul himeric anti-CD20 imunologic activ la această concentrație a dozei în această perioadă de timp pentru primate non-umane. Limfocite B acoperite cu anticorpi s-au detectat în primele 3 zile ale tratamentului terapeutic. Totuși, de prin ziua a-7-a nu s-au mai detectat celule acoperite cu anticorp.

Tabelul 1 rezumă rezultatele anticorpului himeric anti-CD20 activ imunologic în doză unică și doze multiple asupra populațiilor sanguine periferice; condiția doză unică a fost 6,4 mg/kg; condiția doză multiplă a fost 0,4 mg/kg timp de 4 zile consecutiv (aceste rezultate au fost derivate de la maimuțele descrise mai sus).

Studiul C2B8 din populația sanguină periferică de la primat

Tabelul 1

Maimuță	Doza	Ziua	CD20	Anti-Hu IgG-uman
A	0,4 mg/kg (4 doze)	sânge prelevat anterior	81,5	-
		0	86,5	0,2
		7	85,5	0,0
		21	93,3	-
		28	85,5	-
B	0,4 mg/kg (4 doze)	sânge prelevat anterior	81,7	-
		0	94,6	0,1
		7	92,2	0,1
		21	84,9	-
		28	84,1	-
C	6,4 mg/kg (1 doză)	sânge prelevat anterior	77,7	0,0
		7	85,7	0,1
		21	86,7	-
		28	76,7	-
D	6,4 mg/kg (1 doză)	sânge prelevat anterior	85,7	0,1
			94,7	0,1
			85,2	-
			85,9	-

Tabelul 1 (continuare)

1165	Maimuță	Anti-Hu IgG-uman Anti-Hu IgM-uman*	Leu-16	Distrugerea celulei B %
1170	A	-	9,4	0
		0,3	0,0	97
		0,1	1,2	99
		-	2,1	78
		-	4,1	66
1175	B	-	14,8	0
		0,2	0,1	99
		0,1	0,1	99
		-	6,9	53
		-	8,7	41
1180	C	0,2	17,0	0
		0,1	0,0	99
		-	14,7	15
		-	8,1	62
1185	D	0,1	14,4	0
		0,2	0,0	99
		-	9,2	46
		-	6,9	53

* Populație dublu colorată care indică dezvoltarea anti-CD20 himeric celule B învelite.

1190

Datele rezumate în tabelul 1, arată ca distrugerea celulelor B din sângele periferic în condițiile excesului de anticorpi se produc rapid și eficient indiferent de nivelurile de dozare unice sau multiple. Suplimentar, s-a observat distrugere la cel puțin 7 zile după ultima injecție, cu recuperarea parțială de celule B observată prin ziua 21.

1195

Tabelul 2 rezumă efectul anticorpilor himerici anti-CD20 imunologic activi asupra populațiilor celulare ale nodulilor limfatici, folosind regimul de tratament din tabelul 1 (4 doze zilnice de 0,4 mg/kg; o doză de 6,4 mg/kg); de asemenea, se dau valori comparative pentru nodulii limfatici normali (mămuță de control, axilar și ingvinal) și măduvă osoasă normală (2 mămuțe).

1200

RO 118524 B1

Populația celulară a nodulilor limfatici

Tabelul 2

Maimuță	Doză	Ziua	CD2	Anti-Hu IgM
A	0,4 mg/kg (4 doze)	7	66,9	-
		14	76,9	19,6
		28	84,1	15,7
B	0,4 mg/kg (4 doze)	7	59,4	-
		14	83,2	9,9
		28	84,1	15,7
C	6,4 mg/kg (1 doză)	7	75,5	-
		14	74,1	17,9
		28	66,9	23,1
D	6,4 mg/kg (1 doză)	7	83,8	-
		14	74,1	17,9
		28	84,1	12,8

1205

1210

1215

1220

Maimuță	Anti-Hu IgG-uman Anti-Hu IgM-uman	Leu-16	Distrugea limfocitelor B %
A	7,4	40,1	1
	0,8	22,6	44
	-	26,0	36
B	29,9	52,2	0
	0,7	14,5	64
	-	14,6	64
C	22,3	35,2	13
	1,1	23,9	41
	-	21,4	47
D	12,5	19,7	51
	0,2	8,7	78
	-	12,9	68

1225

1230

1235

1240

Tabelul 2 (continuare)

	CD2	Anti Hu IgG* Anti Hu IgM	Anti Hu IgM	Leu 16	Distrugere limfocite 30%
1245					
	55,4	25,0	-	41,4	
	52,1	31,2	-	39,5	
1250	65,3	19,0	-	11,4	NA
	29,8	28,0	-	16,6	NA

Rezultatele din tabelul 2 evidențiază reducerea eficiență a limfocitelor B pentru ambele regimuri de tratament. Tabelul 2 indică suplimentar, că pentru primatele non-umane nu s-a atins saturația completă a celulelor B din țesutul limfatic cu anticorp himeric anti-CD20 imunologic activ; în plus, s-a observat acoperirea celulelor cu anticorp după 7 zile de tratament, urmată de o reducere marcată a celulelor B din nodulii limfatici începând din ziua a 14-a.

Pe baza acestor date, studiul la care s-a făcut referire mai sus ca doză unică ridicată de anti-CD-20 himeric s-a efectuat în principal spre determinarea farmaco-toxicologică. Adică, acest studiu s-a orientat spre evaluarea oricărei toxicități asociată cu administrarea anticorpului himeric, precum și a eficienței distrugerii celulelor B din sângele periferic, noduli limfatici și măduvă osoasă.

Suplimentar, deoarece datele din tabelul 2 arată că pentru acest studiu majoritatea celulelor B din nodulii limfatici au fost distruse între 7 și 14 zile de tratament, un regim de dozare săptămânal poate avea rezultate mai eficiente.

Tabelul 3 prezintă rezultatele studiului dozei ridicate anti-CD20 himeric.

Populația celulară a nodulilor limfatici și a măduvei osoase
Populații limfocitare (%)

Tabelul 3

Maimuță	CD2	CD20 ^a	mIgM+anti- C2B8 ^b	C2B8 ^c	Ziua ^d	
Noduli limfatici inghinali						
E	90,0	5,3	4,8	6,5	22	
F	91,0	6,3	5,6	6,3	22	
1275	G	89,9	5,0	3,7	5,8	36
	H	85,4	12,3	1,7	1,8	36
Măduvă osoasă						
E	46,7	4,3	2,6	2,8	22	
F	41,8	3,0	2,1	2,2	22	
1280	G	35,3	0,8	1,4	1,4	36
	H	25,6	4,4	4,3	4,4	36

^a Indică populația colorată cu Leu 16;

^b Indică populația dublu colorată pozitivă pentru IgM celular de suprafață și anticorpul himeric celule acoperite;

^c Indică totalul populației colorate pentru anticorp himeric inclusiv celulele dublu colorate IgM de suprafață pozitiv și colorația unică (IgM celular de suprafață negativ);

^d Zile după injectarea dozei finale de 16,8 mg/kg.

1285

RO 118524 B1

Ambele animale evaluate la 22 zile după încetarea tratamentului au conținut mai puțin de 5 % celule B comparativ cu 40 % conținute în nodulii limfatici de la control (vezi tabelul 2 de mai sus). În mod asemănător, în măduva osoasă a animalelor tratate cu anticorp himeric anti-CD20, nivelurile celulelor CD20 pozitive au fost mai mici decât 3% comparativ cu 11-15 % în animalele normale (vezi tabelul 2 de mai sus).

1290

În animalele evaluate la 36 zile după încetarea tratamentului unul dintre animale (H) a avut aproximativ 12 % celule B în noduli limfatici și 4,4 % celule B în măduva osoasă în timp ce lotul (G) a avut aproximativ 5 % celule B în nodulul limfatic și 0,8 % în măduva osoasă, aceste date indicând o distrugere semnificativă a celulelor B.

1295

Rezultatele de la exemplul 3A. indică printre altele ca dozele scăzute de anti-CD20 himeric imunologic activ conduc pe termen lung la distrugerea celulelor B din sângele periferic la primate. De asemenea, datele arată că distrugerea semnificativă a populațiilor de celule B s-a atins în nodulii limfatici periferici și măduva osoasă când s-au administrat doze de anticorp mari și repetate.

1300

Continuarea urmăririi testului pe animale a arătat că, chiar cu o asemenea distrugere severă de limfocite B periferice în timpul primei săptămâni de tratament, nu au apărut alte efecte adverse.

Mai mult decât atât, s-a observat o recuperare a populației de celule B putându-se trage concluzia că celulele stemice pluripotente ale acestor primate nu au fost afectate în mod advers prin tratament.

1305

B. Analiza clinică a C2B8

i. Test clinic faza I/II a C2B8; Studiul terapiei doză unică

S-au tratat cu C2B8 într-un test clinic faza I/II 15 pacienți având documentația histologică de recădere în limfom al celulei B.

1310

Fiecare pacient a primit o singură doză de C2B8 într-un studiu de doză crescătoare cu trei pacienți/doză: 10 mg/m², 50 mg/m², 100 mg/m², 250 mg/m².

Tratamentul a fost prin infuzie i. v. printr-un filtru în linie de 0,22 μ cu C2B8 diluat într-un volum final de 250 cm³ sau o concentrație maximă de 1 mg/ml în soluție salină normală. Rata inițială a fost 50 cm³/h, în prima oră; dacă nu s-a observat nici o toxicitate doza ratei s-a crescut până la un maxim de 200 cm³/h.

1315

Toxicitatea (așa cum s-a indicat de către clinician) a fost de la "nici una", la "febră", la "moderat" (2 pacienți); la "severă" (1 pacient).

Toți pacienții au primit tratamentul terapeutic complet.

S-au analizat limfocite sanguine periferice pentru a determina, printre altele, impactul C2B8 asupra celulelor T și celulele B. În mod consistent, pentru toți pacienții limfocitele B din sângele periferic au fost distruse după infuzia cu C2B8 și asemenea distrugere s-a menținut în exces timp de 2 săptămâni.

1320








Unul dintre pacienți (primitor a 100 mg/m² de C2B8) a evidențiat un răspuns parțial la tratamentul cu C2B8 (reducere mai mare de 50 % în suma produselor diametrelor perpendiculare a tuturor indicatorilor măsurabili ai leziunilor după mai mult de 4 săptămâni, timp în care nu au mai apărut leziuni noi și nici nu au existat leziuni mai mari).

1325

La cel puțin un alt pacient (care a primit 500 mg/m²) s-a evidențiat un răspuns minor la tratamentul C2B8 (reducere mai mică decât 50 % dar cel puțin 25 % în suma produselor celor două diametre perpendiculare a celor mai lungi ale tuturor indicatorilor măsurabili ai leziunii).

1330

Pentru eficiența sugerată rezultatele PBL-urilor sunt prezentate în fig.14; datele pentru pacientul care evidențiază un PR sunt prezentate în fig.14A; pentru pacientul care evidențiază un MR, datele sunt prezentate în fig.14B.

1335 În fig.14, sunt aplicabile următoarele:  = limfocite;  = CD3 + celule (Celule T);  = CD20 + celule;  = CD19 + celule;  = kappa;  = lambda și  = C2B8.

1340 Așa cum s-a evidențiat, markerii celulei B CD20, CD19, kappa și lambda s-au distrus după o perioadă depășind 2 săptămâni; în timp ce a existat o reducere ușoară inițială în numărul celulelor T, acestea au revenit la un nivel aproximativ liniei de bază într-un timp-cadru relativ rapid.

ii. Test clinic faza I/II a C2B8; studiul terapiei doză multiplă

1345 Pacienții având limfom al celulei B confirmat histologic cu boala în progres vizibil, au fost aleși pentru acest studiu care este împărțit în două părți; în faza I, constând dintr-o doză crescătoare pentru caracterizarea toxicităților dozelor limită și determinarea nivelului dozei active tolerată biologic, grupuri de câte 13 pacienți au primit săptămânal infuzii i.v. de C2B8 pentru un total de 4 infuzii separate.

Doza cumulată la fiecare dintre cele 3 niveluri a fost după cum urmează: 500 mg/m² (125 mg/m²/infuzie); 100mg/m² (250mg/m²/infuzie); 1500 mg/m² (375 mg/m²/infuzie).

1350 Se definește o doză activă tolerată biologic și se va determina ca cea mai scăzută doză având, atât toxicitate tolerabilă, cât și activitate adecvată.

În faza II, pacienți suplimentari vor primi doza activă tolerată biologic cu subliniere asupra determinării activității pentru cele 4 doze de C2B8.

Exemplul IV. Terapie combinată : C2B8 și Y2B8

1355 S-a investigat o abordare terapeutică combinată folosind C2B8 și Y2B8 într-un model șoarece xenografic (șoareci nu/nu, femele de aproximativ 10 săptămâni ca vârstă) utilizând o tumoră de celulă B limfoblastoidă (celule tumorale Ramos).

1360 Pentru scopuri comparative, s-au tratat de asemenea, șoareci suplimentar cu C2B8 și Y2B8. Celule tumorale Ramos (ATCC, CRL 1596) s-au menținut în cultură folosind PRMI-1640 suplimentat cu 10 % ser fetal de vițel și glutamină la 37°C și 5 % CO₂.

1365 S-au inițiat tumori în 9 femele de șoareci lipsiți de păr, în vârstă de aproximativ 7-10 săptămâni, prin injectare subcutanată de 1,7 x 10⁶ celule Ramos într-un volum de 0,10 ml (HBSS) folosind o seringă de 1 cm³, prevăzută cu un ac de 25 g. Toate animalele s-au manipulat într-o hotă cu flux laminar și toate cuștile, așternuturile, alimentele și apa s-au autoclavat.

Celulele tumorale s-au recuperat prin excizarea tumorilor și trecerea acestora printr-o sită de 40 mesh; celulele s-au spălat de 2 ori cu 1 x HBSS (50 ml) prin centrifugare (1300 rpm), s-au resuspendat în 1 x HBSS la 10 x 10⁶ celule / ml și s-au înghețat la -70°C până la folosire.

1370 Pentru condițiile experimentale, s-au dezghețat celule din câteva loturi înghețate, s-au pelevat prin centrifugare (1300 rpm) și s-au spălat de 2 ori cu 1 x HBSS apoi, celulele s-au resuspendat până la aproximativ 2,0 x 10⁶ celule /ml. S-au injectat aproximativ 9 -12 șoareci cu 0,10 ml suspensie celulară (s.c.) folosind o seringă de 1 cm³ prevăzută cu un ac de 25 g; injecțiile s-au făcut pe partea stângă a animalului aproximativ pe porțiunea mediană.

1375 Tumorile s-au dezvoltat în aproximativ 2 săptămâni. S-au excizat tumorile și s-au prelucrat cum s-a descris mai sus.

1380 Șoarecii luați în studiu s-au injectat cum s-a descris mai sus cu 1,67 x 10⁶ celule în 0,10 ml HBSS. Pe baza experimentelor preliminare de dozare, s-a determinat că s-ar putea utiliza pentru studiu 200 mg de C2B8 și 100 μCi Y2B8. S-au injectat 90 femele de șoareci nu/nu (în vârstă de aproape 10 săptămâni) cu celule tumorale.

După aproape 10 zile, s-au desemnat 24 de șoareci pentru 4 grupuri de studiu (6 șoareci/grup) urmărind în acest timp menținerea unei distribuții a mărimii tumorilor comparabilă în fiecare grup (mărimea medie a tumorii, exprimată ca produs dintre lungimea x lățimea tumorii a fost de aproximativ 80 mm²).

RO 118524 B1

- Următoarele grupuri s-au tratat cum s-a indicat pe calea injecțiilor coadă-inutilă, folosind o seringă Hamilton de 100 μ l prevăzută cu un ac de 25 g. 1385
- A. Soluție salină normală
 - B. Y2B8 (100 μ Ci)
 - C. C2B8 (200 μ g)
 - D. Y2B8 (100 μ Ci) + C2B8 (200 μ g) 1390
- Grupurile testate C2B8 au primit o a doua injecție C2B8 (200 μ g/șoarece) la 7 zile după injecția inițială. Măsurătorile tumorii s-au făcut la fiecare 2-3 zile folosind un șubler.
- Prepararea materialelor pentru tratament s-au făcut conform cu următoarele protocoale:
- A. *Prepararea lui Y2B8* 1395
- S-a transferat clorura de ytriu (90) într-o eprubetă de propilenă și s-a ajustat pH-ul la 4,1 - 4,4 folosind acetat de sodiu 2M lipsit de metal. S-a adăugat 2B8-MX-DTPA (0,3 mg în soluție salină normală; vezi mai sus prepararea lui 2B8-MX-DTPA) și s-a amestecat cu grijă prin turbionare.
- După 15 min de incubare, reacția s-a oprit prin adăugarea a 0,05 x 20 mM volum EDTA și 0,05 x 2M volum acetat de sodiu. 1400
- Radioactivitatea concentratului s-a determinat prin diluarea a 5,0 μ l de amestec de reacție în 2,5 ml 1 x PBS care conține 75 mg/ml HSA și 1 mM DTPA ("formulare tampon"). Număratoarea s-a realizat prin adăugarea de 10,0 μ l la 20 ml de amestec de scintilare Ecolume™. Amestecul reactiv rămas s-a adăugat la 3,0 ml formulare tampon, s-a filtrat steril și s-a depozitat la 2-8°C până la utilizare. 1405
- S-a calculat activitatea specifică (14 mCi/mg la momentul injectării) folosind concentrația de radioactivitate și concentrația proteinei, calculate pe baza cantității anticorpului adăugat amestecului de reacție.
- Radioactivitatea asociată proteinei s-a determinat folosind cromatografia instantanee în strat subțire. Radioîncorporarea a fost 95 %. S-a diluat Y2B8 în formularea tampon imediat înaintea folosirii și s-a filtrat steril (concentrația radioactivității finale a fost 1,0 mCi/ml). 1410
- B. *Prepararea lui C2B8*
- C2B8 s-a preparat cum s-a descris mai sus. C288 s-a asigurat ca reactiv steril în soluție salină normală la 5,0 mg/ml. Înainte de injectare C2B8 s-a diluat în soluție salină normală până la 2,0 mg/ml și s-a filtrat steril. 1415
- C. *Rezultate*
- După tratament, mărimea tumorii s-a exprimat ca un produs al lungimii și al lățimii și măsurătorile s-au făcut în zilele indicate în fig.11 (Y2B8 vs. salin); fig.12 (C2B8 vs. salin); și fig.13 (Y2B8 + C2B8 salin). De asemenea, s-a determinat eroarea standard. 1420
- Așa cum s-a indicat în fig.13, combinația lui Y2B8 și C2B8 prezintă efecte tumoricide comparabile efectelor evidențiate, fie de către Y2B8, fie de către C2B8.
- Exemplul V. Strategii de terapie alternativă**
- Strategiile terapeutice alternative recunoscute din punctul de vedere al exemplelor anterioare sunt evidente. 1425
- O asemenea strategie folosește utilizarea unei doze terapeutice de C2B8 urmată în circa 1 săptămână de o combinație de, fie 2B8, fie 2B8 radiomarcant (de exemplu, Y2B8); sau 2B8, C2B8 și de exemplu, Y2B8; sau C2B8 și de exemplu, Y2B8.
- O strategie suplimentară este utilizarea de C2B8 radiomarcant. O asemenea strategie permite utilizarea avantajelor porțiunii active imunologic ale lui C2B8 plus acele avantaje asociate cu un radiomarcant. 1430
- Marcajele radioactive preferate includ ytriu-90 care dă o viață de înjumătățire a lui C2B8 în circulație, mai mare față de anticorpurul murin 2B8.

RO 118524 B1

1435 Datorită capacității lui C2B8 de a distruge celule B, și avantajelor de a fi derivat de la folosirea unui radiomarcaj, o strategie alternativă preferată este de a trata pacientul cu C2B8 (fie cu o doză unică, fie cu doze multiple), astfel, încât majoritatea, dacă nu toate celulele periferice B să fie distruse. Aceasta ar fi apoi urmată de utilizarea lui 2B8 radiomarcant datorită distrugerii celulelor periferice B; 2B8 radiomarcant menține o șansă crescută de țintire a celulelor tumorale.

1440 Este preferată utilizarea lui 2B8 marcat cu iod (131) dat fiind tipurile rezultatelor raportate în literatură cu acest marcaj (vezi Kaminski).

1445 O preferință alternativă implică utilizarea unui 2B8 radiomarcant (sau C2B8) inițial într-un efort de creștere a permeabilității unei tumori, urmată de tratamente unice sau multiple cu C2B8; intenția acestei strategii este creșterea șanselor lui C2B8 de a ajunge atât în exteriorul, cât și în interiorul masei tumorale. O strategie ulterioară implică utilizarea agenților chemoterapeutici în combinație cu C2B8.

Aceste strategii includ așa-numitele tratamente "înșelatoare" adică tratament cu agent chemoterapeutic urmat de tratament cu C2B8, urmat de o repetiție a acestui protocol.

1450 Alternativ, este viabil tratamentul inițial cu o doză unică sau doze multiple de C2B8, după care urmează tratamentul chemoterapeutic. Agenți chemoterapeutici preferați, includ, dar nu se limitează la, ciclofosfamidă, doxorubicină, vincristină și prednison, vezi Armitage, J.O. et al., Cancer 60:1695 (1982), încorporat aici ca referință.

LISTA SECVENȚELOR

1455

(1) INFORMAȚII GENERALE

(i) SOLICITANT: Darrell Anderson, Nabil Hanna, John Leonard, Roland Newman, Mitchell Reff și William Resteter

1460

(ii) TITLUL INVENȚIEI: APLICARE TERAPEUTICĂ A ANTICORPILOR HIMERICI ȘI RADIOMARCAȚI FAȚĂ DE ANTIGENUL LOMFOCITAR B UMAN DIFERENȚIAT RESTRICTIV PENTRU TRATAMENTUL LIMFOMULUI CELULEI B

(iii) NUMĂRUL SECVENȚELOR : 8

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ:

1465

(A) ADRESANT : IDEC Pharmaceuticals Corporation
(B) STRADA : 11011 Torreyana Road
(C) ORAȘ : San Diego
(D) STAT : California
(E) ȚARA : SUA
(F) ZIP : 92 121

1470

(v) FORMA CITIBILĂ PE COMPUTER:

(A) TIP SUPORT : 3,5 inch, 1,44Mb (dischetă)
(B) COMPUTER : Macintosh
(C) SISTEM DE OPERARE: MS.DOS
(D) SOFTWARE : Microsoft Word 5.0

1475

(vi) DATE CURENTE ALE CERERII:

(A) NUMĂRUL CERERII :
(B) DATA DEPOZITULUI:
(C) CLASIFICARE:

1480

(viii) INFORMAȚII MANDATAR:

(A) NUME : Burgoon, Richard P.
(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 34,787
(C) REFERINȚA/DOSAR NUMĂRUL

RO 118524 B1

(ix) INFORMAȚII PENTRU TELECOMUNICATII:

(A) TELEFON : (619) 550-8500

(B) TELEFAX : (619) 550-8750

1485

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 1:

(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI :

(A) LUNGIME : 8540 baze

(B) TIP : acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE : circulară

1490

(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genomic)

(iii) IPOTETICĂ: da

(iv) ANTI-SENS: nu

1495

(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvența ID nr. 1:

GACGTCGCGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	
AATAGCTCAG	60				
AGGCCGAGGC	GGCCTCGGCC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	1500
TGCATGGGGC	120				
GGAGAAATGGG	CGGAACTGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	
GGGCGGGACT	180				
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTG	GCCTGCTGG	
GGAGCCTGGG	240				1505
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCATACT	
TCTGCCTGCT	300				
GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	
TAATTCCCCT	360				
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTCATA	GCCCATATAT	1510
GGAGTTCCGC	420				
GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	
CCGCCCATTG	4				
ACGTCAATAA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	
TTGACGTCAA	5				1515
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	
TCATATGCCA	600				
AGTACGCCCC	ATATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCG	CCTGGCATT	
TGCCAGTAC	660				
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	1520
CGCTATTACC	720				
ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	
CTCACGGGGB	780				
TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	
AAATCAACGG	840				1525
GACTTTCCAA	AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	
TADGCGTGTA	900				
CGGTGGGAGG	TGTATATAAG	CAGAGCTGGG	TACGTGAACC	GTCAGATCGC	
CTGGAGACGC	960				
CATCACAGAT	CTCTCACCAT	GAGGGTCCCC	GCTCAGCTCC	TGGGGCTCCT	1530
GCTGCTCTGG	1020				

RO 118524 B1

	CTCCCAGGTG	CACGATGTGA	TGGTACCAAG	GTGGAAATCA	AACGTACG:GT
	GGCTGCACCA	1080			
	TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAACTGC
1535	CTCTGTTGTG	1140			
	TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGGAAGGT
	GGATAACGCC	1200			
	CTCCAATCGG	GTAACTCCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAG.CAAGGA
	CAGCACCTAC	1260			
1540	AGCCTCAGCA	GCACCCTGAG	GCTGAGCAAA	GGAGAGTACG	AGAAACACAA
	AGTCTACGCC	1320			
	TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCGTAGCTCG	CCCGTCACAA	AGAGCTTCAA
	CAGGGGAGAG	1380			
	TGTTGAATTC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTCTG
1545	GACAACATGC	1440			
	GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	AGTGTGCCTT	CTAGTTGCCA
	GCCATCTGTT	1500			
	GTTTGCCCCT	CCCCCGTGCC	TTCCTTG~CC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC
	TGTCCTTTCC	1560			
1550	TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCATTCTAT
	TCTGGGGGGT	1620			
	GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA
	TGCTGGGGAT	1680			
	GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG
1555	CCCCCTATTG	1740			
	ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC
	AAATGGGACT	1800			
	TTCTACTTGG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG
	ATGCGGTTTT	1860			
1560	GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTTCCA
	AGTCTCCACC	1920			
	CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTTGGC	ACCAAATCA	ACGGGACTTT
	CCAAAATGTC	1980			
	GTAACAACCTC	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGG~GG
1565	GAGGTCTATA	2040			
	TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG
	ACCCGTCGAC	2100			
	ATGGGTTGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTCGCTGTTG	CTACGGGTGT
	CGCTAGCACC	2160			
1570	AAGGGCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCACCC	TCCTCCAAGA	GCACCTCTGG
	GGGCACAGCG	2220			
	GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC
	GTGGAACCTCA	2280			
	GGCGCCCTGA	CCAGCGGCGT	GCACACCTTG	CCGGCTGTCC	TACAGTCCTC
1575	AGGACTCTAC	2340			
	TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAGCTTGG	GCACCCAGAC
	CTACATCTGC	2400			
	AACGTGBATC	ACAAGCCCAG	CAABACCAAG	GTGGACAAGA	AAGCAGAGCC
	CAAATCTTGT	2460			

RO 118524 B1

GACAAAAC	ACACATGCC	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	1580
ACCGTCAGTC	2520				
TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	
TGAGGTCACA	2580				
TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	
GTACGTGGAC	2640				1585
GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	
CAGCACGTAC	2700				
CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGG	TGAATGGCAA	
GGAGTACAAG	2760				
TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCACCTC	1590
CAAAGCCAAA	2820				
GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA	
GCTGACCAAG	2880				
AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	
CGCCGTGGAG	2940				1595
TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	
GGTGGACTCC	3000				
GACGGCTCCT	TCTTCCTCTA	CAGCAAGCTS	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	
GCAGCAGGGG	3060				
ACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGGATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	1600
GGAGAAGAGC	3120				
CTCTCCCTGT	CTCCGGGTAA	ATGAGGATCC	GTAAACGGTT	ACCAAGTACC	
TAGACTGGAT	3180				
TCGTGACAAC	ATGCGGCCGT	GATATCTACG	TATGATCAGC	CTCGAGTGTG	
CCTTCTAGTT	3240				1605
GCCAGCCATC	TGTTGTTTGC	CCCTCCCCCG	TGCCTTCCTT	GACCCTGGAA	
GGTGCCACTC	3300				
CCACTGTCCT	TTCCTAATAA	AATGAGGAAA	TTGCATCGCA	TTGTCTGAGT	
AGGTGTCATT	3360				
CTATTCTGGG	GGGTGGGGTG	GGGCAGGACA	GCAAGGGGGA	GGATTGGGAA	1610
GACAATACCA	3420				
GGCATGCTGG	GGATGCGGTG	GGCTCTATGG	AACCAGCTGG	GGCTCGACAG	
CGCTGGATCT	3480				
CCCGATCCCC	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	
AAGGAAAATT	3540				1615
AATTTAAGA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	
GATGCTTTAG	3600				
AGACAGTGTT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	
CCAGAGCTGA	3660				
GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	1620
CATCACCGAA	3720				
GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	
GATAGAGAGG	3780				
GCAGGAGCCA	GGGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	
AGATTTGCTT	3840				1625
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATAG	CTTGGACAGC	TCAGGGCTGC	
GATTCGCGC	3900				

RO 118524 B1

	CAAAC TTGAC	GGCAATCCTA	GCGTGAAGGC	TGGTAGGATT	TTATCCCCGC
	TGCCATCATG	3960			
1630	GTTCBACCAT	TGAACTGCAT	CGTCGCCGTG	TCCCAAATA	TGGGGATTGG
	GAAGAACGGA	4020			
	GACCTACCCT	GGCCTCCGCT	CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAAGAAT
	GACCACAACC	4080			
	TCTTCAGTGG	AAGGTAAACA	GAATCTGGTG	ATTATGGGTA	GGAAAAGCTG
1635	GTTCTCCATT	4140			
	CCTGAGAAGA	ATCGACCTTT	AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG
	AGAACTCAA	4200			
	GAACCACCAC	GAGGAGCTCA	TTTTCTTGCC	AAAAGTTTGG	ATGATGCCTT
	AAGACTCATT	4260			
1640	GAACAACCGG	AATT6GCAAG	TAAAGTAGAC	ATGGTTTGG	TAGTCGCAGG
	CAGTTCTGTT	4320			
	TACCAGGAAG	CCATGAATCA	ACCAGGCCAC	CTTAGACTCT	TTGTGACAAG
	GATCATGCAG	4380			
	GAATTTGAAA	GTGACACGTT	TTTCCCAGAA	ATTGATCTGG	GGAAATATAA
1645	ACTTCTCCCA	4440			
	GAATACGCAG	GCGTCCTCTC	TGAGGTCCAG	GAGGAAAAG	GCATCAAGTA
	TAAGTTTGAA	4500			
	GTCTACGAGA	AGAAAGACTA	ACAGGAAGAT	G4TTTCAAGT	TGTCTGCTCC
	CCTCCTAAAG	4560			
1650	CTATGCATTT	TTATAAGACC	ATGGGACTTT	TGCTGGCTTT	AGATCAGCGT
	CGACTGTGCC	4620			
	TTCTAGTTGC	CAGCCATCTG	TTGTTTGCCC	CTCCCCCGTG	CCTTCCTTGA
	CCCTGGAAGG	4680			
	TGCCACTCCC	ACTGTCCTTT	CCTAATAAAA	TGAGGAAATT	GGATCGCATT
1655	GTCTGAGTAG	4740			
	GTGTCATTCT	ATTCTGGGGG	GTGGGGTGGG	GCAGGACAGC	AAGGGGGAGG
	ATTGGGAAGA	4800			
	CAATAGCAGG	CATGGTGGGG	ATGCGGTGGG	CTCTATGGAA	CCAGCTGGGG
	CTCGAGCTAC	4860			
1660	TAGCTTTGCT	TCTCAATTC	TTATTTGQBT	AATGAGAAAA	AAAGGAAAAT
	TAATTTTAAC	4920			
	ACAATTCAG	TAGTTGATTG	AGCAAATGCG	TTGCCAAAAA	GGATGCTTTA
	GAGACAGTGT	4980			
	TCTCTGCACA	GATAAGGACA	AACATTATTC	AGAGGGAGTA	CCCAGAGCTG
1665	AGACTCCTAA	5040			
	GCCAGTGAGT	GGCACAGCAT	TCTAGGGAGA	AATATGCTTG	TCATCACCGA
	AGCCTGATTC	5100			
	CGTAGAGCCA	CACCTTGGTA	AGGGCCAATC	TGCTCACACA	GGATAGAGAG
	GGCAGGAGCC	5160			
1670	AGGGCAGAGC	ATATAAGGTG	AGGTAGGATC	AGTTGCTCCT	CACATTTGCT
	TCTGACATAG	5220			
	TTGTGTTGGG	AGCTTGGATC	GATCCTCTAT	GGTTGAACAA	GATGGATTGC
	ACGCAGGTTT	5280			
	TCCGGCCGCT	TGGGTGGAGA	GGCTATTCCG	CTATGACTGG	GCACAACAGA
1675	CAATCGGCTG	5340			

RO 118524 B1

CTCTGATGCC	GCCGTGTTCC	GGCTGTCAGC	GCAGGGGCGC	CCGGTTCTTT	
TTGTCAAGAC	5400				
CGACCTGTCC	GGTGCCCTGA	ATGAACTGCA	GGACGAGGCA	GCGCGGCTAT	
CGTGGCTGGC	5460				
CACGACGGGC	GTTCCCTGCG	CAGCTGTGCT	CGACGTTGTC	ACTGAAGCGG	1680
GAAGGGACTG	5520				
GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGGCAGGA	TCTCCTGTCA	TCTCACCTTG	
CTCCTGCCGA	5580				
GAAAGTATCC	ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGTCGCAT	ACGCTT6ATC	
CGGCTACCTG	5640				1685
CCCATTGGAC	CACCAAGCGA	AACATCGCAT	CGAGCGAGCA	CGTACTSGGA	
TGGAAGCCGG	5700				
TCTTGTCGAT	CAGGATGATC	GGGACGAAGA	GCATCAGGGG	CTCGCGCCAG	
CCGAACTGTT	5760				
CGCAAGGCTC	AAGGCGCGCA	TGCCCGACGG	GCAGGARGiC	GTCGTGACCC	1690
ATGGCGATGG	5820				
CTGCTTGCCG	AATATCATGG	TGGAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTCATCG	
ACTGTGGCCG	5880				
GCTGGGTGTG	GCGGACCGCT	ATCAGGACAT	AGCGTTGGCT	ACCCGIGATA	
TTGCTGAAGA	5940				1695
GCTTGCGCGC	GAATGGGCTG	AGCGCTTCCT	CGTGCTTTAC	GGTATCGCCG	
CTCCCGATTC	6000				
GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	GCCTTCTTGA	CGAGTTCTTC	TGAGCGGGAC	
TGTGGGGTTC	6060				
GAAATGACCG	ACCAAGCGAC	GCCCAACGTG	CCATCACGAG	ATTTCGATTC	1700
CACCGCCGCC	6120				
TTCTATGAAA	GGTTGGGCTT	CGGAATCGTT	TTCCGGGACG	CCGGCTGGAT	
GATCCTCCAG	6180				
CGCGGGGATC	TCATGCTGGA	GTTCTTCGCC	CACCCCAACT	TGTTTATTGC	
AGCTTATAAT	6240				1705
GGTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAAT	TTCACAAATA	AAGCATTTTT	
TTCACTGCAT	6300				
TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	CTATCTTATC	ATGTCTGGAT	
CGCGGCCGCG	6360				
ATCCCGTCGA	GAGCTTGCGG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	1710
AATTGTTATC	6420				
CGCTCACAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCCG	GAAGCAIAAA	GTGTAAAGCC	
TGGGGTGCCT	6480				
AATGAGTGAG	CTAACTCAGA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT	GCCCGCTTTC	
CAGTCGGGAA	6540				1715
ACCTGTCGTG	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACGCGC	GGGGAGAGGC	
GGTTTGCGTA	6600				
TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACSG	ACTCGCTGCG	CTCGGTGTTT	
CGGCTGCGGC	6660				
GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATG	CACAGAATCA	1720
GGGGATAAGC	6720				
CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	
AAGGCCGCGT	6780				

RO 118524 B1

	TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGAGGAGCA	TCACAAAAT
1725	CGACGCTCAA	6840			
	GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC
	CCTGGAAGCT	6900			
	CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC
	GCCTTTCTCC	6960			
1730	CTTCGGGAAG	CGTGGCGCTT	TCTCAATGCT	CACGCTGTAG	GTATCTCAGT
	TCGGTGTAGG	7020			
	TCGTTGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCGAC
	CGCTGCGCCT	7080			
	TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG
1735	CCACTGGCAG	7140			
	CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GGTATGTAGG	CGGTGCTACA
	GAGTTCTTGA	7200			
	AGTGGTGGCC	TAACTACGGC	TACTACTAGAA	GGACAGTATT	TGGTATCTGC
	GCTCTGCTGA	7260			
1740	AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA
	ACCACCGCTG	7320			
	GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTT	TGCAAGCAGC	AGATTACGCG	CAGAAAAAAA
	GGATCTCAAG	7380			
	AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC
1745	TCACGTTAAG	7440			
	GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA
	AATTA AAAAT	7500			
	GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT
	TACCAATGCT	7560			
1750	TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTCC	TTCATCCATA
	GTTGCCTGAC	7620			
	TCCCCGTCGT	GTAGATAACT	ACGAT6CGGG	AGGGCTTACG	ATCTGGCCCC
	AGTGCTGCAA	7680			
	TGATACCGCG	AGACCCAGGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC
1755	CBGCCAGCCG	7740			
	GAAGGGCCGA	GCGCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG
	TCTATTAATT	7800			
	GTTGCGGGGA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC
	GTTGTTGCCA	7860			
1760	TTGCTACAGG	CATCGTG6TG	TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC
	AGCTCCGGTT	7920			
	CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG
	GTTAGCTCCT	7980			
	TCGGTCCTCC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGGAGT	GTTATCACTC
1765	ATGGTTATGG	8040			
	CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCATGC	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT
	GTGACTGGTG	8100			
	AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GTATGCGGCG	ACCGAGTTGC
	TCTTGCCCGG	8160			
1770	CGTCAATACG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC
	ATCATTGGAA	8220			

RO 118524 B1

AACGTTCTTC	GGGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	
AGTTCGATGT	8280				
AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAG	CATCTFTTAC	TTTCACCAGC	
GTTTCTGGGT	8340				1775
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAACCCAAT	AAGGGCGACA	
CGGAAATGTT	8400				
GAATACTCAT	ACTCTTCCTT	TTFCAATATT	ATTGAAGCAT	TTATCAGGGT	
TATTGTCTCA	8460				
TGAGCGGATA	CATATTTGAA	TGTATTTAGA	AAAATAAACA	AATAGGGGTT	1780
CCGCGCACAT	8520				
TTCCCCGAAA	AGTGCCACCT	8540			

(3) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR: 2

(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI

(A) LUNGIME: 9209 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) ÎMPLETITURĂ: simplă

(D) TOPOLOGIE: circulară

(ii) MOLECULĂ : ADN (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS : nu

(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECVENȚA ID NR. 2:

GACGTGCGGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	1795
AATAGCTCAG	60				
AGGCCGAGGA	GGCCTCGGCC	TCTGGATAAA	TAAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	
TGCATGGGGC	120				
GGAGAATGGG	CGGAACTGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	
GGGCGGGACT	180				1800
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	
GGAGCCTGGG	240				
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCATACT	
TCTGCCTGCT	300				
GGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	1805
TAATTCCCCT	360				
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGG-CA	TTAGTTCATA	GCCCATATAT	
GGAGTTCCGC	420				
GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	
CCGCCATTG	480				1810
ACGTCAATAA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	
TTGACGTCAA	540				
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	
TCATATGCCA	600				
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCG	CCTGGCATT	1815
TGCCAGTAC	660				
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	
CGCTATTACC	720				
ATGGTGATGC	GGTTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	
CTCACGGGGA	780				1820

RO 118524 B1

	TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA
	AAATGAACGG	840			
	GACTTTCCAA	AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG
	TAGGCGTGTA	900			
1825	CGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTGGG	TACGTGAACC	GTCAGATCGC
	CTGGAGACGC	960			
	CATCACAGAT	CTCTCACTAT	GGATTTTCAG	GTGCAGATTA	TCAGCTTCCT
	GCTAATCAGT	1020			
	GCTTCAGTCA	TAATGTCCAG	AGGACAAATT	GTTICTCTCCC	AGTCTCCAGC
1830	AATCCTGTCT	1080			
	GCATCTCCAG	GGGAGAAGGT	CACAATGACT	TGCAGGGCCA	GCTCAAGTGT
	AAGTTACATC	1140			
	CACTGGTTCC	AGCAGAAGCC	AGGATCCTCC	CCCAAACCCT	GGATTTATGC
	CACATCCAAC	1200			
1835	CTGGCTTCTG	GAGTCCCTGT	TCGCTTCAGT	GGCAGTGGGT	CTGGGACTTC
	TACTCTCTC	1260			
	ACAATCAGCA	GAGTGGAGGC	TGAAGATGCT	GGGACTTATT	ACTGCCAGCA
	GTGGACTAGT	1320			
	AACCCACCCA	CGTTCGGAGG	GGGGACCAAG	CTGGAAATCA	AACGTACGGT
1840	GGCTGCACCA	1380			
	TCTGTCTTCA	TCTTCCCGGC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAACTGC
	CTCTGTTGTG	1440			
	TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGGAAGGT
	GGATAACGCC	1500			
1845	CTCCAAPCGG	GTAACTCCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA
	CAGCACCTAC	1560			
	AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA
	CGTCTACGCC	1620			
	TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCGTCACAA	AGAGCTTCAA
1850	CAGGGGAGAG	1680			
	TGTTGAATTC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTTCGT
	GACAACATGC	1740			
	GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT	CTAGTTGCCA
	GCGATCTGTT	1800			
1855	GTTTGCCCT	CCCCCGTGCC	TTCCTTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC
	TGTCCTTCC	1860			
	TATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCATTCTAT
	TCT6GGGGGT	1920			
	GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA
1860	TGCTGGGGAT	1980			
	GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG
	CCCCCTATTG	2040			
	ACGTCAATGA	CGGTAATGG	CCC GCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC
	TTATGGGACT	2100			
1865	TTCCTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG
	ATGCGGTTTT	2160			
	GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTTCCA
	AGTCTCCACC	2220			

RO 118524 B1

CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTTGTTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	
CCAAAATGTC	2280				1870
GTAACAACCTC	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	
GAGGTCTATA	2340				
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACCATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	
ACCCGTCGAC	2400				
ATGGGTTGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTCGCTGTTG	CTACGCGTGT	1875
CCTGTCCCAG	2460				
GTACAACTGC	AGCAGCCTGG	GGCTGAGCTG	GTGAAGCCTG	GGGCCTCAGT	
GAAGATGTCC	2520				
TGCAAGGCTT	CTGGCTACAC	ATTTACCAGT	TACAATATGC	ACTGGGTAAA	
ACAGACACCT	2580				1880
GGTCGGGGCC	TGGAATGGAT	TGGAGCTATT	TATCCCGGAA	ATGGTGATAC	
TTCCTACAAT	2640				
CAGAAGTTCA	AAGGCAAGGC	CACATTGACT	GCAGACAAAT	CCTCCAGCAC	
AGCCTACATG	2700				
CAGCTCAGCA	GCCTGACATC	TGAGGACTCT	GCGGTCTATT	ACTGTGCAAG	1885
ATCGACTTAC	2760				
TACGGCGGTG	ACTGGTACTT	CAATGTCTGG	GGCGCAGGGA	CCACGGTCAC	
CGTCTCTGCA	2820				
GCTAGCACCA	AGGGCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCACCCCT	CCTCCAAGAG	
CACCTCTGGG	2880				1890
GGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	
GACGGTGTCTG	2940				
TGGAACTCAG	GCGCCCTGAC	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC	CGGCTGTCCT	
ACAGTCCTCA	3000				
GGACTCTACT	CCCTCAGCAG	CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAGCTTGGG	1895
CACCCAGACC	3060				
TACATCTGCA	ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	
AGCAGAGCCC	3120				
AAATCTTGTG	ACAAAATCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	
CCTGGGGGGA	3180				1900
CCGTCAGTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAACCC	AAGGACACCG	TCATGATCTC	
CCGGACCCCT	3240				
GAGGTCACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC	CTGAGGTCAA	
GTTCAACTGG	3300				
TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA	1905
GCAGTACAAC	3360				
AGCACGTACC	GTGTGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCCTGCACC	AGGACTGGCT	
GAATGGCAAG	3360				
AGCACGTACC	GTGGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCCTGCACC	AGGACTGGCT	
GAATGGCAAG	3420				1910
GAGTACAAGT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGCG	CTCCCAGCCC	CCATCGAGAA	
AACCATCTCC	3480				
AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TGCCCCCATC	
CCGGGATGAG	3540				
CTGACCAAGA	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	1915
CAGCGACATC	3600				

RO 118524 B1

	GCC6TGGAGT	GGGAGAGCAA	TGGGCAGCCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC
	GCCTCCCGTG	3660			
	CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT	CTTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA
1920	GAGCAGGTGG	3720			
	CAGCAGGGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA
	CCACTACACG	3780			
	CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGGTAAA	TGAGGATCCG	TTAACGGTTA
	CCAACTACCT	3840			
1925	AGACTGGATT	CGTGACAACA	TGCGGCCGTG	ATATCTACGT	ATGATCAGCC
	TGCACTGTGC	3900			
	CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTTGTTTGCC	CCTCCCCCGT	GCCTTCCTTG
	ACCCTGGAAG	3960			
	GTGCCACTCC	CACTGTCCTT	TCCTAATAAA	ATGAGGAAAT	TGGATCGCAT
1930	TGTCTGAGTA	4020			
	GGTGTCAATC	TATTCTGGGG	GGTGGGGTGG	GGCAGGACAG	CAAGGGGGAG
	GATTGGGAAG	4080			
	ACAATAGCAG	GCATGCTGGG	GATGCGGTGG	GCTCTATGGA	ACCAGCTGGG
	GCTCGACAGC	4140			
1935	GCTGGATCTC	CCGATCCCCA	GCTTTGCTTC	TCAATTTCTT	ATTTGCATAA
	TGAGAAAAAA	4200			
	AGGAAAATTA	ATTTAACAC	CAATTCAGTA	GTTGATTGAG	CAAATGCGTT
	GCCAAAAGG	4260			
	ATGCTTTAGA	GACAGTGTTT	TCTGCACAGA	TAAGGACAAA	CATTATTCAG
1940	AGGGAGTACC	4320			
	GAGAGCTGAG	ACTCCTAAGC	CAGTGAGTGG	CACAGCATT	TAGGGAGAAA
	TATGCTTGTC	4380			
	ATCACCGAAG	CCTGATTCCG	TAGAGCCACA	CCTTGGTAAG	GGCCAATCTG
	CTCACACAGG	4440			
1945	ATAGAGAGGG	CAGGAGCCAG	GGCAGAGCAT	ATAAGGTGAG	GTAGGBTCAG
	TTGCTCCTCA	4500			
	CATTTGCTTC	TGACATAGTT	GTGTTGGGAG	CTTGGATAGC	TTGGACAGCT
	GAGGGCTGCG	4560			
	ATTCGCGCC	AAACTTGACG	GCAATCCTAG	CGTGAAGGCT	GGTAGGATTT
1950	TATCCCCGCT	4620			
	GCCATCATGG	TTCGACCATT	GAACTGCATC	GTCGCCGTGT	CCCAAATAT
	GGGGATTGGC	4680			
	AAGAACGGAG	ACCTACCCTG	GCCTCCGCTC	AGGAACGAGT	TCAAGTACTT
	CCAAAGAATG	4740			
1955	ACCACAACCT	CTTCAGTGGA	AGGTAAACAG	AATCTGGTGA	TTATGGGTAG
	GAAAACCTGG	4800			
	TTCTCCATTC	CTGAGAAGAA	TCGACCTTTA	AAGGACAGAA	TTAATATAGT
	TGTCAGTAGA	4860			
	GAACTCAAAG	AACCACCACG	AGGAGTCAT	TTTCTTGCCA	AAAGTTTGGA
1960	TGATGCCTTA	4920			
	AGACTTATTG	AACAACCGGA	ATTGGCAAGT	AAAGTAGACA	TGGTTTGGAT
	AGTCGGAGGC	4980			
	AGTTCTGTTT	ACCAGGAAGC	CATGAATCAA	CCAGGCCACC	TTAGACTCTT
	TGTGACAAGG	5040			

RO 118524 B1

ATGATGCAGG GAAATATAAA	AATTTGAAAG 5100	TGACACGTTT	TTCCCAGAAA	TTGATTTGGG	1965
CTTCTCCCAG CATCAAGTAT	AATACCCAGG 5160	CGTCCTCTCT	GAGGTCCAGG	AGGAAAAAGG	
AAGTTTGAAG CTCTGGTCCC	TCTACGAGAA 5220	GAAAGACTAA	CAGGAAGATG	CTTTCAAGTT	1970
CTCCTAAAGC GATCAGCCTC	TATGCATTTT 5280	TATAAGACCA	TGGGACTTTT	GCTGGCTTTA	
CAGTGTGCCT CTTCCTTGAC	TCTAGTTGCC 5340	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC	TCCCCCGTGC	
CCTGGAAGGT CATCGCATTG	GCCACTCCCA 5400	CTGTCCTTTC	CTAATAAAAT	GAGGAAATTG	1975
TCTGAGTAGG AGGGGGAGGA	TGTCATTCTA 5460	TTCTGGGGGG	TGGGGTGGGG	GAGGACAGCA	
TTGGGAAGAC CAGCTGGGGC	AATAGCAGGC 5520	ATGCTGGGGA	TGCGGTGGGC	TCTATGGAAC	1980
TCGAGCTACT AAGGAAAATT	AGCTTTGCTT 5580	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	
AATTTTAAAC GATGCTTTAG	CCAATTCAGT 5640	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	
AGACAGTGTT CCAGAGCTGA	CTCTGCACAG 5700	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	1985
GACTCCTAAG CATCACCGAA	CCAGTGAGTG 5760	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	
GCCTGATTCC GATAGAGAGG	GTAGAGCCAC 5820	ACCTTGFFAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	1990
GAAGGAGCCA ACATTTGCTT	GGGCAGAGCA 5880	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	
CTGACATAGT ATGGATTGCA	TGTGTTGGGA 5940	GCTTGGATCG	ATCCTCTATG	GTTGAACAAG	
CGCAGGTTCT CACAAACAGAC	CCGGCCGCTT 6000	GGGTGGAGAG	GCTATTCGGC	TATGACTGGG	1995
AATCGGCTGC CGGTTCTTTT	TCTGATGCCG 6060	GGGTGTTCCG	GCTGTCAGCG	CAGGGG6GCC	
TGTCAAGACC CGCGGCTATC	GACCTGTCCG 6120	GTGCCCTGAA	TGAACTGCAG	GACGAGGCAG	2000
GTGGCTGGCC CTGAAGCGGG	ACGACGGGCG 6180	TTCCTTGCGC	AGCTGTGCTC	GACGTTGTCA	
AAGGGACTGG CTCACCTTGC	CTGCTATTGG 6240	G.CGAAGTGCC	GGGGCAGGAT	CTCCTGTCAT	
TCCTGCCGAG CGCTIGATCC	AAAGTATCCA 6300	TCATGGCTGA	TGCAATGCGG	CGGCTGCATA	2005
GGCTACCTGC GTACTIONGAT	CCATTGACCC 6360	ACCAAGCGAA	ACATCGCATC	GAGCGAGCAC	
GGAAGCCGGT TCGCGCCAGC	CTTGTGATC 6420	AGGATGATCT	GGACGAAGAG	CATCAGGGGC	2010
CGAACTGTTT TCGTGACCCA	GCCAGGCTCA 6480	AGGCGCGCAT	GCCCGACGGC	GAGGATCTCG	

RO 118524 B1

	TGGCGATGCC	TGCTTGCCGA	ATATCATGGT	GGAAAATGGC	CGCTTTTCTG
	GATTCATCGA	6540			
2015	CTGTGGCCGG	CTGGGTGTGG	CGGACCGCTA	TCAGGACATA	GCGTTGGCTA
	CCCGTGATAT	6600			
	TGCTGAAGAG	CTTGGCGGGC	AATGGGCTGA	CCGCTTCCTC	GTGCTTTACG
	GTATCGCCGC	6660			
	TGCTGAAGAG	CAGCGCATCG	CCTTCTATCG	CCTTCTTGAC	GAGTTCTTCT
2020	GAGCGGACT	6720			
	CTGGGGTTCC	AAATGACCGA	CCAAGCGACG	CCCAACCTGC	CATCACGAGA
	TTTCGATTCC	6780			
	ACCGCCGCCT	TCTATGAAAG	GTTGGGCTTC	GGAATCGTTT	TCCGGGACGC
	CGGCTGGATG	6840			
2025	ATCCTCCAGC	GCGGGGATCT	CATGCTGGAG	TTCTTCGCCC	ACCCCAACTT
	GTTTATTGCA	6900			
	GCTTATAATG	GTTACAAATA	AAGCAATAGC	ATCACAAATT	TCACAAATAA
	AGCATTTTTT	6960			
	TCACTGCATT	CTAGTTGFGG	TTTGTCCAAA	CTCATCAATC	TATCTTATGA
2030	TGTCTGGATC	7020			
	GCGGCCGCGA	TCCCGTCGAG	AGCTTGGCGT	AATCATGGTC	ATAGCTGTTT
	CCTGTGTGAA	7080			
	ATTGTTATCC	GCTCACAATT	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG
	TGTAAAGCCT	7140			
2035	GGGGTGCCTA	ATGAGTGAGC	TAACTCACAT	TAATTGCGTT	GCGCTCACTG
	CCCGCTTTCC	7200			
	AGTCGGGAAA	CCTGTCTGTC	CAGCTGCATT	AATCAATCGG	CCAACGCGCG
	GGGAGAGGCG	7260			
	GTTTGCGFAT	TGGGCGCTCT	TCCGCTTCCT	CGCTGACTGA	CTCGCTGCGC
2040	TCGGTCGTTT	7320			
	GGCTGCGGCG	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC
	ACAGAATCAG	7380			
	GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAGG
	AACCGTAAAA	7440			
2045	AGGCCGCGTT	GCTGGCGTTT	TTCCATAGGC	TCCGCCCCCC	TGACGAGCAT
	CACAAAAATC	7500			
	GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCCGA	CAGGACTATA	AAGATACCAG
	GCGTTTCCCC	7560			
	CTGGAAGCTC	CCTCGTGCGG	TCTCCTGTTC	CGACCCTGCC	GCTTACCGGA
2050	TACCTGTCCG	7620			
	CCTTTCTCCC	TTCGGGAAGC	GTGGCGCTTT	CTCAATGCTC	ACGCTGTAGG
	TATCTCAGTT	7680			
	CGGTGTAGGT	CGTTCGCTCC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCCCCGTT
	CAGCCCGACC	7740			
2055	GCTGCGCCTT	ATCCGGTAAC	TATCGTC7TG	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC
	GACTTATCGC	7800			
	CACTGGCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA	GCAGAGCGAG	GTATGTAGGC
	GGTGCTACAG	7860			
	AGTTCTTGAA	GTGGTGGCCT	AACTACGGCT	ACACTAGAAG	GACAGTATTT
2060	GGTATCTGCG	7920			

RO 118524 B1

CTCTGGTGAA	GCCAGTTACC	TTCGGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	
GGCAAACAAA	7980				
CCACCGCTGG	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACGCGC	
AGAAAAAAG	8040				
GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATGTTTTCTA	CGGGGTCTGA	CGCTCAGTGG	2065
AACGAAAAC	8100				
CACGTTAAGG	GATTTTGGTC	ATGAGATTAT	CAAAAAGGAT	CTTCACCTAG	
ATCCTTTTAA	8160				
ATAAAAATG	AAGTTTTTAAA	TGAATCTAAA	GTATATATGA	GTAAACTTGG	
TCTGACAGTT	8220				2070
ACCAATGCTT	AATCAGTGAG	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTTTCTG	
TCATCCATAG	8280				
TTGCCTGACT	CCCCGTCGTG	TAGATAACTA	CGATACGGGA	GGGCTTACCA	
TCTGGCCCCA	8340				
GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC	AGATTTATCA	2075
GCAATAAACC	8400				
AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAGTG	GTCCTGCAAC	TTTATCCGCC	
TCCATCCAGT	8460				
CTATTAATTG	TTGCCGGGAA	GC2AGAGTAA	GTAGTTCGCC	AGTTAATAGT	
TTGCGCAACG	8520				2080
TTGTTGCCAT	TGCTACAGGC	ATCGTGGTGT	CACGCTCGTC	GTTTGGTATG	
GCTTCATTCA	8580				
GCTCCGGTTC	CCAACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC	
AAAAAAGCGG	8640				
TTAGTCTCCT	CGGTCCTCCG	ATCGTTGTCA	GAAGTAAGTT	GGCCGCAGTG	2085
TTATCACTCA	8700				
TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATTCTCTTA	CTGTCATGCC	ATCCGTAAGA	
TGCTTTTCTG	8760				
TGACTGGTGA	GTACTIONAACC	AAGTCATTCT	GAGAATAGTG	TATGCGGCGA	
CCGAGTTGCT	8820				2090
CTTGCCCGGC	GTCAATACGG	GATAATACCG	CGCCACATAG	CAGAACTTTA	
AAAGTGCTCA	8880				
TCATTGAAA	ACGTTCTTCG	GGGCGAAAC	TCTCAAGGAT	CTTACCGCTG	
TTGAGATCCA	8940				
GTTTCGATGTA	ACCCACTCGT	GCACCCAACT	GATCTTCAGC	ATCTTTTACT	2095
TTCACCAGCG	9000				
CCCGTGGGTG	AGCAAAAACA	GGAAGGCAAA	ATGCCGCAAA	AAAGGGAATA	
AGGGCGACAC	9060				
TTTCTGGGTG	AATACTCATA	CTCTTCCTTT	TTCAATATTA	TTGAAGCATT	
TATCAGGGTT	9120				2100
ATTGTCTCAT	GAGCGGATAC	ATATTTGAAT	GTATTTAGAA	AAATAAACAA	
ATAGGGGTTT	9180				
CGCGCACATT	TCCCCGAAAA	GTGCCACCT			9209

- (4) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 3 2105
- (i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI :
- (A) LUNGIME: 54 baze
 - (B) TIP: acid nucleic
 - (C) ÎMPLETIRE : simplă
 - (D) TOPOLOGIE: lineară
- 2110

RO 118524 B1

(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTI-SENS : nu

(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECVENȚA ID NR: 3

2115 5' ATC ACA GAT CTC TCA CCA TGG ATT TTC AGG TGC AGA TTA TCA GCT 52
TC 3' 2

(5) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 4

(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI:

2120 (A) LUNGIME: 30 baze

(B) TIP : acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE : simplă

(D) TOPOLOGIE: lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genomic)

2125 (iii) IPOTETIC :da

(iv) ANTI-SENS

(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECVENȚA ID NR. 4:

5' TGC AGC ATC CGT ACG TTT GAT TTC CAG CTT 3'

2130 (6) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 5

(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI

(A) LUNGIME: 384 baze

(B) TIP : acid nucleic

(C) ÎMPLETIRE : simplă

2135 (D) TOPOLOGIE : lineară

(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genomic)

(iii) IPOTETIC : da

(iv) ANTI-SENS : nu

(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECVENȚA ID NR. 5:

2140 ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT CTA GTC
51

ATA ATG TCC AGA GGG CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT
102

GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA
153

2145 AGT TAG ATC CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG
204

ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC
255

2150 AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA
306

GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC
357

GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA

384

2155

(7) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 6

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI

(A) LUNGIME : 27 baze

(B) TIP: acid nucleic

RO 118524 B1

(C) ÎMPLETIRE : simplă	2160
(D) TOPOLOGIE ; lineară	
(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genom)	
(iii) IPOTETIC: da	
(iv) ANTI-SENS : nu	
(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI : SECVENȚA ID NR. 6 :	2165
5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3'	27
(8) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 7	
(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI	
(A) LUNGIME : 29 baze	2170
(B) TIP: acid nucleic	
(C) ÎMPLETIRE: simplă	
(D) TOPOLOGIE : lineară	
(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genomic)	
(iii) IPOTETIC : da	2175
(iv) ANTI-SENS : da	
(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI; SECVENȚA ID NR. 7 :	
5' GGS TGT TGT GCT AGC TGM RGA GAC RGT GA 3'	29
(9) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 8;	2180
(i) CARACTERISTICILE SECVENȚEI	
(A) LUNGIME : 420 baze	
(C) TIP: acid nucleic	
(C) ÎMPLETIRE: simplă	
(D) TOPOLOGIE : lineară	2185
(ii) TIPUL MOLECULEI : ADN (genomic)	
(iii) IPOTETIC : da	
(iv) ANTI-SENS : nu	
(ix) DESCRIEREA SECVENȚEI: SECVENȚA ID NR. 8 :	2190
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT CGT GCT ACG GTC	
51	
CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG	
102	
GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC	2195
153	
AAT ATG CAC TGG GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA	
204	
GCT ATT TAT CCC GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC	
255	
AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC	2200
306	
AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT	
357	
TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TCC AAC GTC TGG GGC GCA GGG ACC ACG GTC	2205
408	
ACC GTC TCT GCA 420	

Revendicări

- 2210 1. Metodă pentru tratarea unei tulburări legată de celulele B, **caracterizată prin aceea că**, cuprinde administrarea parenterală la un pacient care are nevoie de un asemenea tratament, a unei cantități de dozare eficientă terapeutic a unui prim anticorp himeric anti-CD20 având o secvență variabilă cu catenă ușoară substanțial la fel cu secvența arătată în fig.4, o secvență variabilă cu catenă grea substanțial la fel cu secvența arătată în fig.5, și
- 2215 domenii constante IgG1 umane, sau a unui al doilea anticorp himeric anti-CD20 având substanțial aceeași activitate de epuizare a celulelor B ca primul anticorp himeric anti-CD20 menționat, în care o cantitate eficientă terapeutic este în domeniul 0,001...30 mg/kg greutate corporală, administrată pe o perioadă de 1...7 zile.
- 2220 2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, primul anticorp himeric anti-CD20 are secvența variabilă cu catenă ușoară arătată în fig.4 și secvența variabilă cu catenă grea arătată în fig.5.
3. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, primul anticorp himeric anti-CD20 este produs de produsul de transfecție ATTC 69 119.
- 2225 4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, acest prim anticorp este produs din transfectoma care cuprinde anti-CD20 în TCAE8 ca parte a depozitului ATTC nr. 69 119, activ imunologic.
- 2230 5. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, mai cuprinde faza de administrare a unei a doua cantități eficiente terapeutic, a cel puțin unei a doua doze dintr-un al doilea anticorp himeric anti-CD20 activ imunologic, cu activitate de epuizare a celulelor B.
- 2235 6. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** se administrează o a treia cantitate eficientă terapeutic a numitului anticorp, în decursul a 14 zile de la prima administrare.
7. Metodă, conform revendicării 1 sau 4, **caracterizată prin aceea că**, un anticorp anti-CD20 marcat radioactiv se administrează într-o a doua perioadă de administrare.
- 2240 8. Metodă, conform revendicării 7, **caracterizată prin aceea că**, anticorpul radiomarcant cuprinde un anticorp monoclonal secretat de un hibridom, identificat prin depozitul ATCC nr. HB 11 388.
9. Metodă, conform revendicării 8, **caracterizată prin aceea că**, anticorpul este radiomarcant cu ytriu (90), indiu (111), iod (131), de preferință ytriu (90).

Președintele comisiei de examinare: **ing. Georgescu Mirela**

Examinator: **dr.med.vet. Moroianu Iuliana-Emilia**

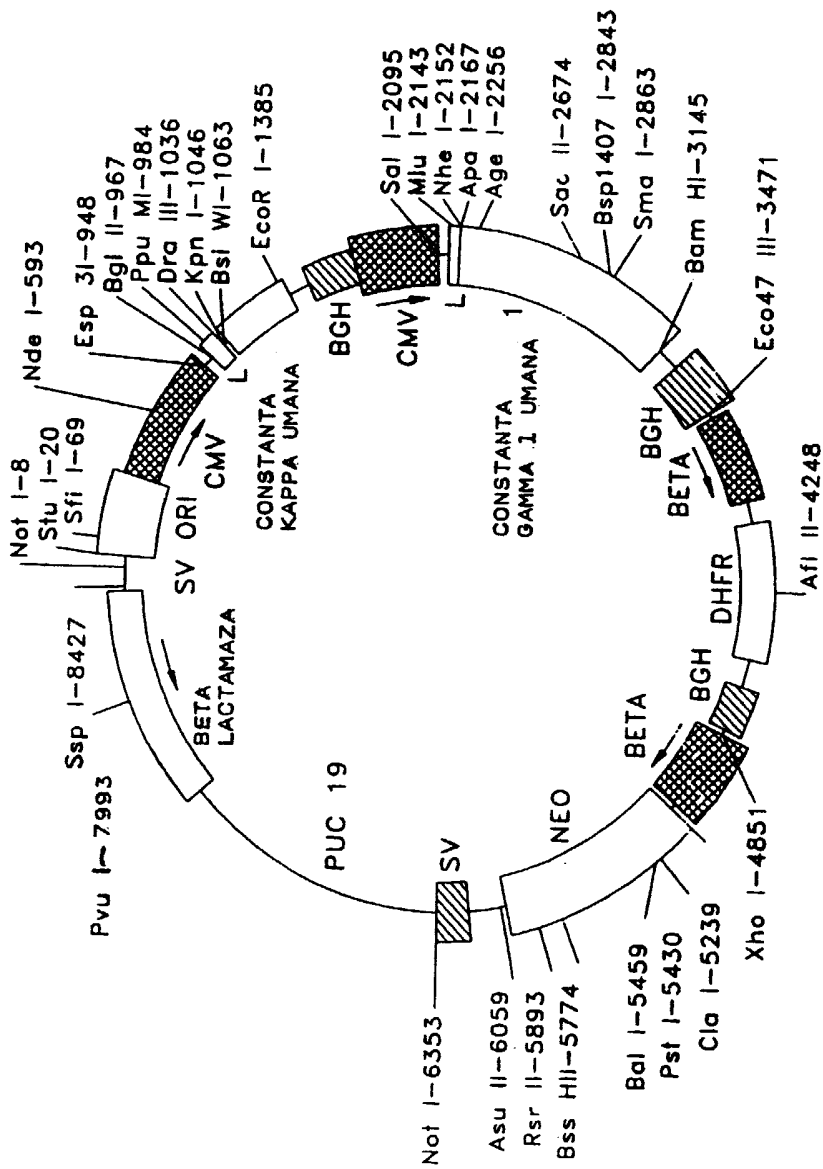


Fig. 1

LINKER #1 15bp | ORIGINE SV40 =332bp
GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCTCTCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
AGGCCGAGGC GGCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120
GGAGAATGGG CGGAACGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCA¹TGCTT TGCATACTTC TGCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAA³⁴⁷TAAATCCCCT³⁶⁰ | LINKER #2=13bp 360
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480
ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
PROMOTOR-INTENSIFICATOR CMV=567bp
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGA TCATATGCCA 600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
TTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
LINKER #3=78bp
CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020
Bgl II 978 | 9
CTCCAGGTG CACGATGTA TGGTACCAAG GTGGAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080
+1 | 101 102 107 108
1038 | 9 1062 | 3 Bsi VI
TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1140
TGCTGCTGA ATACTTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC 1200
CONSTANTA KAPPA UMANA 324bp 107 AMINOACID SI CODON STOP
CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260
AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320
TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380
CATENA
USOARA
STOP Eco RI LINKER #4=85bp
TGTGAAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCGT GACAACATGC 1440
1386 | 7
GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500
1471 | 2

Fig. 2A

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
CATENA GREA STOP | Bam HI LINKER #7=81bp
CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
3144 15
TCGTGACAAC ATGCGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT 3240
3225 6
GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3300
REGIUNEA DE POLIADENILARE A HORMONULUI DE CREȘTERE BOVIN=231bp
CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360
CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAAATAGCA 3420
GGCATGCTGG GGATCGGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480
LINKER #8=34bp
3456 7
CCCCATCCCC | AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 3540
3490 1
AATTTTAAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
PROMOTOR MAJOR AL BETA GLOBINEI DE SOARECE = 388bp
AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720
GCCTGATTC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCCGCGC 3900
LINKER #9=19bp DHFR NETRADUS LA 5' =82bp
3856 7 3875 8
CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG 3960
START DHFR
3957 8
GTTCGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020
GACCTACCCT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140
DHFR DE SOARECE =584bp=187 AMINOACID SI CODON STOP
CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAA 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 TAAGTTTGA 4500

Fig. 2C

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

DHFR STOP
GTCTACGAGA AGAAAGACTA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560
4521²

DHFR NETRADUS LA 3' =82bp LINKER #10=10bp
TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCC 4620
4603⁴ 4613⁴

TCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGGCC CTCCCCGCTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG 4580

REGIUNEA DE POLIADENILARE A HORMONULUI DE CRESTERE BOVIN*231bp
TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740

GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800

CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC 4860
4844⁵ LINKER #11=17bp

TAGCTTTGCT TCTCAATTC TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAAT TAATTTAAC 4920

ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980

PROMOTOR MAJOR AL BETA GLOBINEI DE SOARECE =366bp
TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040

GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATTC 5100

CGTAGAGCCA CACCTTGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160

AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220

TTGTGTTGGG LINKER #12=21bp NEO START
5227⁸ AGCTTGGATC GATCCTCTAT GTTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTT 5280
5248⁹

TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTGCG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340

CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGGCG CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400

NEOMYCIN FOSFOTRANSFERAZA
CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460

795bp=264 AMINOACIZI SI CODON STOP
CACGACGGGC GTTCCTTGGC CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520

GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCTGCCGA 5580

GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CGGCTACCTG 5640

CCCATTGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGAAGCCGG 5700

TCTTGTGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760

CGCCAGGCTC AAGGGCGCGA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820

CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880

GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940

GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCCCGATTG 6000

Fig. 2D

GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA ^{NEO STOP |} CGAGTTCTTC ^{6043 | 4} TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060
 GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCAGCAG ATTTTCGATTC CACCGCCGCC 6120
 TTCTATGAAA GGTGGGCTT ^{NEO NETRADUSA LA 3' = 173bp} CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180
 CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC ^{6216 | 7} CACCCCAACT TGTATTATGC AGCTTATAAT 6240
 GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTCACTGCAT 6300
 TCTAGTTGTG ^{POLI-A INCIPIENT SV40 = 133bp} GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ^{LINKER #13=19bp} ATGTCTGGAT ^{6349 | 50} CGCGGCCCGC 6360
 ATCCCGTGA ^{6368 | 9} GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTATC 6420
 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT 6480
 AATGAGTGAG CTAATCACA TTAATTGCGT TCGGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540
 ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA 6600
 TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC ^{PVC 19} TCGTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCTT CGGCTGCGC 6660
 GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720
 CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT 6780
 TGCTGGCGTT ^{8792= ORIGINEA BACTERIANA A REPLICATIEI} TTCCATAGG CTCCGCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840
 GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGTTTTCCC CCTGGAAGCT 6900
 CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTCTCC 6960
 CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020
 TCGTTCCGC ⁸⁷⁹² CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCGCT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT 7080
 TATCCGTA ⁸⁷⁹² CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140
 CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200
 AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGTGA 7260
 AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAACAA ACCACCGCTG 7320
 GTAGCGGTGG TTTTTTGTG TGCAAGCAGC AGATTACCGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380
 AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAC TCACGTTAAG 7440
 GGATTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTACCTA GATCCTTTTA AATTAATAAT 7500

Fig. 2E

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG **BETA LACTAMAZA STOP** | **TACCAATGCT** 7560
| **7550**
TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCCTGAC 7620
TCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740
GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT **BETA LACTAMAZA=861bp**
286 AMINOACID SI CODON STOP
GGTCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800
GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA 7860
TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920
CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG 8040
CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160
CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220
AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT 8280
AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTACCAGC GTTCTGGGT 8340
GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 8400
BETA LACTAMAZA START
GAATACTGAT **8410** ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460
TGAGCGGATAGAT **8410** TGTATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
TTCCCGGAAA AGTGCCACCT

Fig. 2F

LINKER #1=15bp |
GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTECTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAS 60
15 6

AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120

ORIGINEA SV40 =332bp
GGAGAATGGG CGGAAGTGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180

ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGAATAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300

GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAA TAATTCCCCT | 360
347 8 LINKER #2=13bp

AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG 480

ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

PROMOTOR-INTENSIFICATOR CVM =567bp
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600

AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660

ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720

ATGGTGATGC GTTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840

GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900

CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
927 8 934 5 LINKER #3=7bp

Bgl 2 CATENA USOARA START LEADER NATURAL =88bp
CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020
978 9

GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080
1044 5+1

GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140

CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200

REGIUNEA VARIABILA A CATENEI USOARE 318bp 106 AMINO ACID
CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTA CTCTCTC 1260

ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGECAGCA GTGGACTAGT 1320

AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGACCAAG CTGGAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380
1382 3 BstWI

TCTGTCTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1440

TGCTGCTGA ATA ACTTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGG GGATAACGCC 1500

Fig. 3A

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

CONSTANTA KAPPA UMANA =324bp=107 AMINOACID SI CODON STOP
 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1560
 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620
 JGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG : 680
CATENA
USOARA
STOP... Eco RI **LINKER #4=81bp**
 TGTGATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1740
 1648 17
 GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCCT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800
 1771 12
 GTTTGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCITTTCC 1860
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920
REGIUNEA DE POLIADENILARE A HORMONULUI DE CRESTERE BOVIN=231bp
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGTGGGGAT 1980
LINKER #5=15bp
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC ACCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040
 2002 3 2017 8
 ACGTCAATGA CGGTAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2160
PROMOTOR-INTENSIFICATOR CMV=334bp
 GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCOA AGTCTCCACC 2220
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280
 GTAACAACCT CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGCGG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2340
LINKER #6=7bp **Sal I**
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTGCAG 2400
 START 2351 2 2358 9
CATENA GREA **LEADER SINTETIC SI NATURAL** **Mlu I** **2457 8**
 ATGGGTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTG CTACGGGTGT CCTGTCCAG 2460
 2401 -5 -4 -3 -2 -1 +1
 GTACAACCTG AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520
 TGCAAGCCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580
REGIUNEA
VARIABILA A CATENEI GRELE =363bp=121 AMINO ACID
 GGTCCGGGCC 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
 GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCC 2940
CONSTANTA GAMMA I UMANA =993bp
 TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGCGGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCA 3000

Fig. 3B

330 AMINO ACID SI CODON STOP

GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060

TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120

AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180

CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240

GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300

TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAAC 3360

AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAAG 3420

GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480

AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG 3540

CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600

GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660

CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720

CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780

CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840

CATENA GRETA STOP Bam HI LINKER #7=81bp

3813⁴

AGACTGGATT CGTGACAACA TGCGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900

3894⁵

CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTITGCC CCTCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960

GTGCCACTCC CACTGTCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020

REGIUNEA DE POLIADENILARE A HORMONULUI DE CRESTERE BOVIN=231bp

GGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080

ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGCA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC 4140

LINKER #8=34bp

4125⁶

GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200

AGGAAAATTA ATTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260

PROMOTOR MAJOR AL BETA GLOBINEI DE SÓARECE =366bp

ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTCAG AGGGAGTACC 4320

CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTG TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380

ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGTAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440

ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

Fig. 3C

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

CATTGCTTC TGACATAGTT **LINKER #9=19bp** | **DHFR NETRADUS LA 5' =82bp**
 GTGTTGGGAG CTTGGATAGC TTGGACAGCT CAGGGCTGC 4560
 4525⁶ 4544⁵
 ATTTCCGCC AACTTGACG GCAATCCTAG CGTGAAGGCT GGTAGGATT TATCCCCGCT 4620
DHFR START
 GCCATCATGG TTCGACCATT GAACTGCATC GTCGCCGTGT CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680
 4628⁷
 AAGAACGGAG ACCTACCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAAGAATG 4740
 ACCACAACCT CTTCACTGGA AGGTAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAAACCTGG 4300
DHFR=564bp=187 AMINOACID SI CODON STOP
 TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860
 GAACTCAAAG AACCACCAGG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGA TGATGCCTTA 4920
 AGACTTATTG AACAACCGGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980
 AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040
 ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAAA 5100
 CTTCTCCCAG AATACCCAGG CGTCCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT 5160
DHFR STOP | **DHFR NETRADUS LA 3' =82bp**
 AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220
 5140¹
 CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA **LINKER #10**
 =10bp | GATCAGCCTC 5280
 5272³
 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCTTGAC 5340
REGIUNEA DE POLIADENILARE A HORMONULUI DE CREȘTERE BOVIN=231bp
 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTCTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG 5400
 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460
 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGAAC **LINKER #11**
 =17bp | CAGCTGGGGC 5520
 5513⁴
 TCGAGCTCTT AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 5580
 5530¹
 AATTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 5640
PROMOTOR MAJOR AL BETA GLOBINEI DE SOARECE=366bp
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5700
 GACTCCTAAG CCAAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 5820
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 5880
LINKER #12=21bp | **NEO START**
 CTGACATAGT TGTTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940
 5896⁷ 5917⁸
 CGCAGGTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

Fig. 3D

AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT 6060

NEOMYCIN FOSFOTRANSFERAZA =795bp=284 AMINOACID SI CODON STOP
 TGTC AAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120

GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCCG AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG 6180

AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC 6240

TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300

GGCTACCTGC CCATTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC G TACTCGGAT 6360

GGAAGCCGGT CTTGTGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420

CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480

TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGCC CGCTTTTCTG GATTCATCGA 6540

CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600

TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660

TCCCGATTCC GAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT **NEO STOP** GAGCGGGACT 6720
 6712 3

CTGGGGTTCC AAATGACCGA CCAAGCGAGC CCCAACCTGC CATCAGGAGA TTTTCGATTCC 6780

NEO NETRADUS LA 3* =173bp
 ACCGCCGCTT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG 6840

ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCAACTT GTTTATTGCA 6900
 6885 6

GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960

REGIUNE DE POLIADENILARE INCIPIENTA SV40=133bp
 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020
 7018 9

LINKER #13=19bp
 GCGGCCGCGA TCCCGTCCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 7037 8

PUC 19
 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCT 7140

GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCATAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTC 7200

AGTCCGGAAA CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 7260

GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCTT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGCTTC 7320

GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380

GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440

7481= ORIGINEA BACTERIANA A REPLICATIEI
 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TCCCATAGGC TCCGCCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

Fig. 2E

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 7560
CTGGAAGCTC CCTCGTGCCG TCTCCTGTTC CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTC AATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7680
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCAGC 7740
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800
CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTGCG 7920
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA 7980
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTT GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG 8040
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC 8100
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAGGAT CTTCACCTAG ATCCTTTTAA 8160
ATTAATAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT **BETA** 8220
LACTAMAZA STOP
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 8280
TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA GCATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 8400
BETA LACTAMAZA=861bp=286 AMINOACID SI CODON STOP
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCCAACC 8520
TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTGA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640
TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTC GAAGTAAGTT GGCCGAGTG TTATCACTCA 8700
TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
TGACTGGTGA GACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820
CTTGCCCCGG GTCAATACGG GATAATACCG GCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTC 8880
TCATTGGAAA ACGTTCCTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
GGTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000
TTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060
GGAAATGTTG AATACTCATA **BETA LACTAMAZA START**
CTCTTCTTTT TTCAATATTA TTGAAGCAAT TATCAGGGTT 9120
ATGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT 9180
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

Fig. 3F

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

LEADER

```

-19          -15          -10          -5
FRAME 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          FR1          10          15
Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ala 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          35 | 36
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          70
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 TCG 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

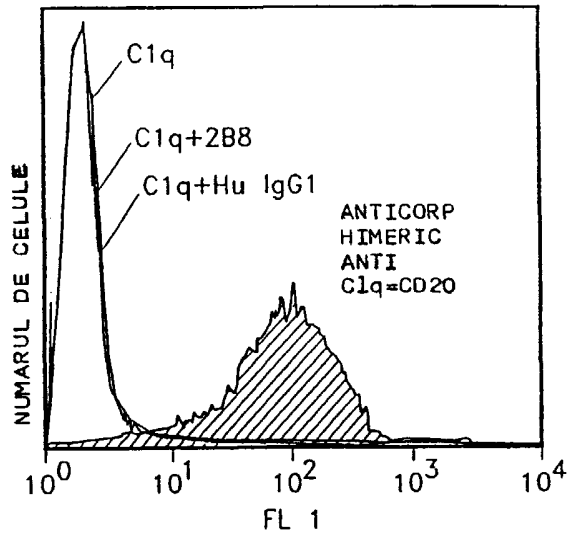


Fig. 6

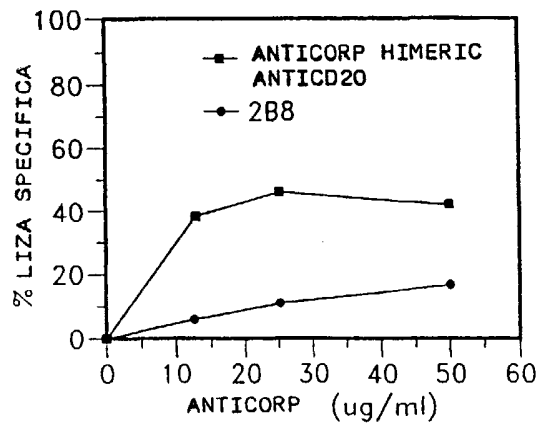


Fig. 7

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

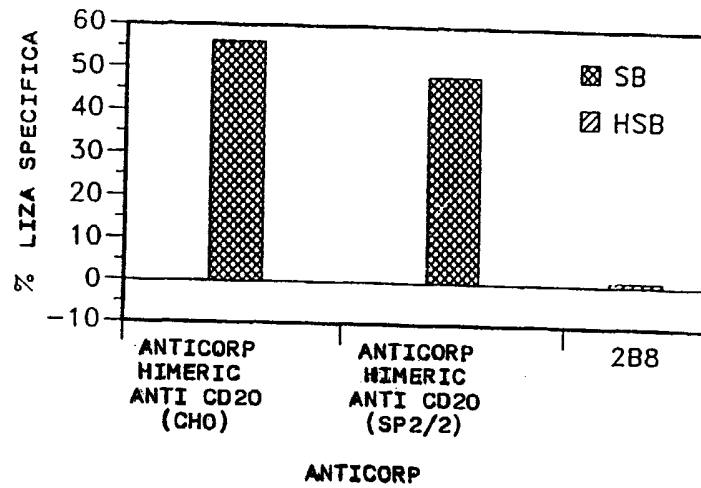


Fig. 8

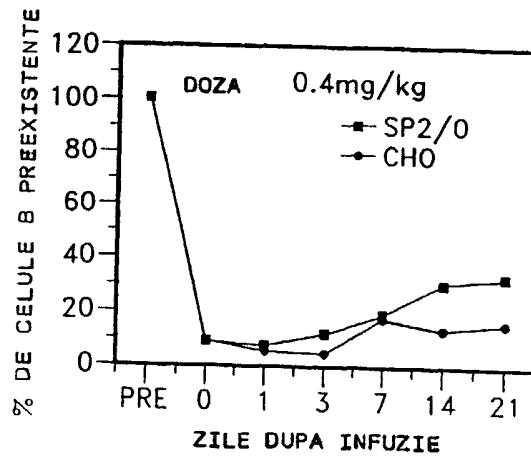


Fig. 9A

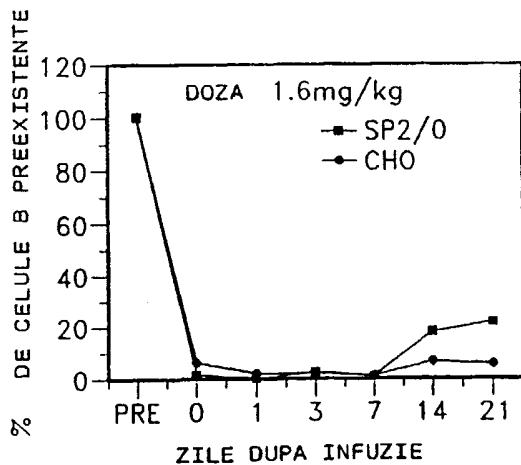


Fig. 9B

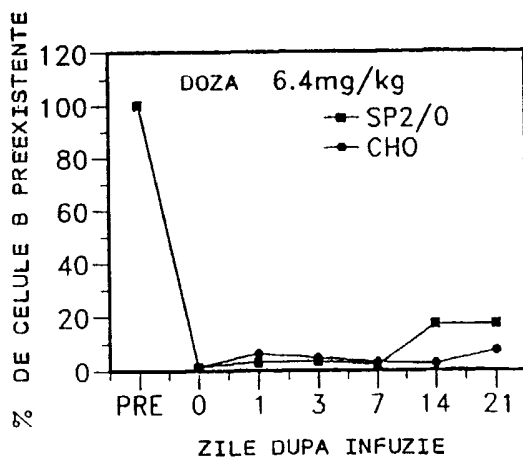


Fig. 9C

RO 118524 B1

(51) Int.Cl.⁷ A 61 K 39/395;
C 12 N 15/02; C 12 P 21/08

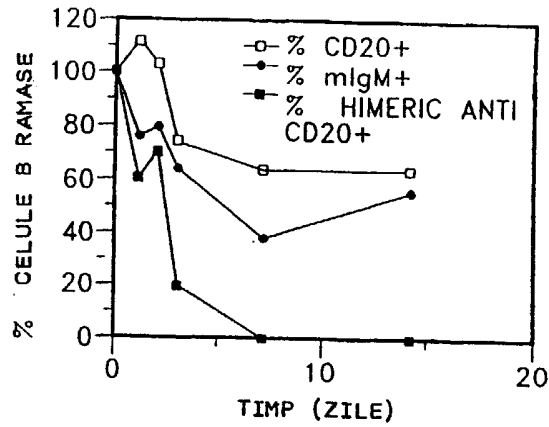


Fig. 10

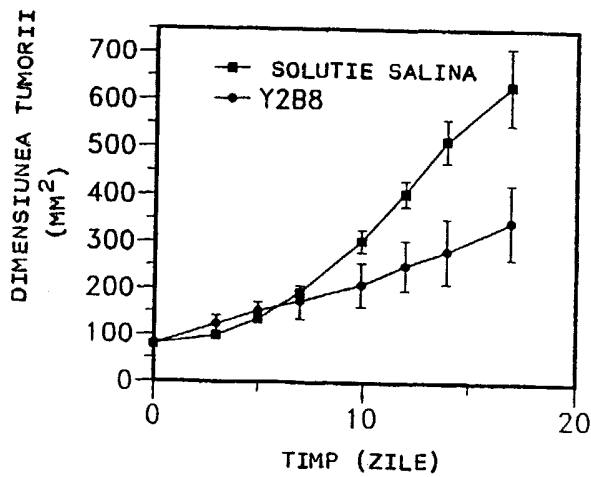


Fig. 11

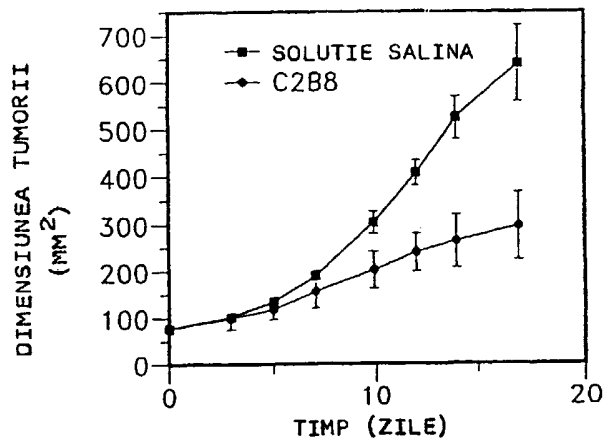


Fig. 12

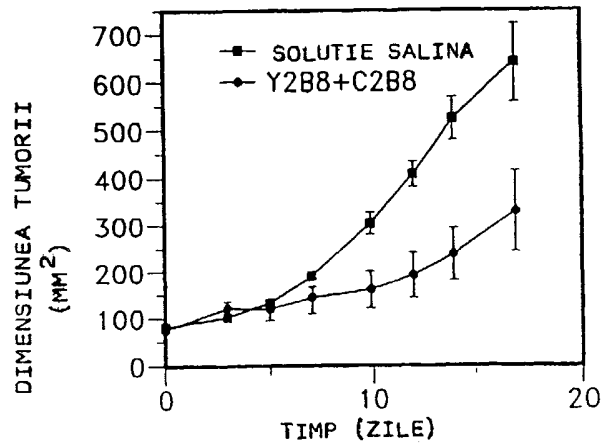


Fig. 13

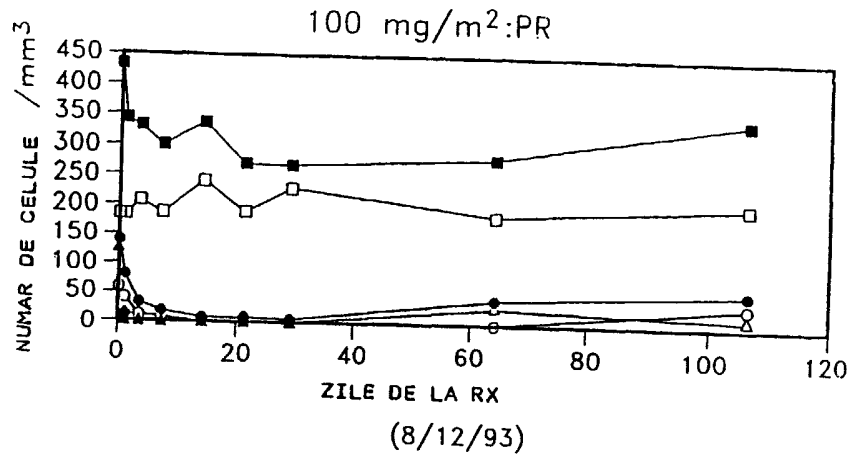


Fig. 14A

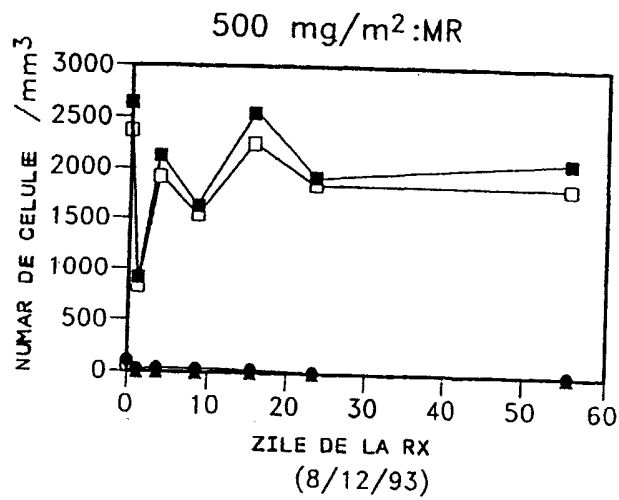


Fig. 14B



