

(11) Número de Publicação: **PT 1329459 E**

(51) Classificação Internacional:  
**C07K 14/715** (2006.01) **C12N 15/06** (2006.01)  
**C07K 16/24** (2006.01)

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

(22) Data de pedido: <b>1993.03.30</b>	(73) Titular(es): <b>MEDAREX INC.</b>	
(30) Prioridade(s): <b>1992.03.31 EP 92400902</b>	<b>707 STATE ROAD PRINCETON, NJ 08540</b>	<b>US</b>
(43) Data de publicação do pedido: <b>2003.07.23</b>	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: <b>2007.07.25</b>	<b>PATRICK BENOIT</b>	<b>FR</b>
<b>116/2007</b>	<b>DEBBORAH MAGUIRE</b>	<b>FR</b>
	<b>IVAN PLAVEC</b>	<b>FR</b>
	<b>FRANCOIS MEYER</b>	<b>FR</b>
	<b>MICHAEL TOVEY</b>	<b>FR</b>
	(74) Mandatário:	
	<b>MANUEL GOMES MONIZ PEREIRA</b>	
	<b>RUA ARCO DA CONCEIÇÃO, N.º 3, 1º ANDAR 1100-028</b>	
	<b>LISBOA</b>	<b>PT</b>

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O RECEPTOR DO INTERFERÃO, COM NEUTRALIZAÇÃO DA ACTIVIDADE CONTRA O INTERFERÃO TIPO I**

(57) Resumo:

## DESCRIÇÃO

### **ANTICORPOS MONOCLONAIS CONTRA O RECEPTOR DO INTERFERÃO, COM NEUTRALIZAÇÃO DA ACTIVIDADE CONTRA O INTERFERÃO TIPO I**

Os interferões (IFN) constituem um grupo de proteínas segregadas, as quais apresentam uma larga gama de actividades biológicas e são caracterizadas pela sua capacidade para induzir um estado antiviral nas células de vertebrados (I. Gresser e M.G. Tovey Biochem Biophys. Acta 516: 231, 1978). Há três classes antigénicas de IFN: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ) e gama. O IFN $\alpha$  e o IFN $\beta$  em conjunto são conhecidos como o interferão tipo I.

O interferão tipo I humano natural inclui 12 ou mais proteínas relacionadas codificadas por genes distintos com um grau elevado de homologia estrutural (Weissmann e Weber, Prog. Nucl. Ácido. Res. Mol. Biol. 33: 251, 1986).

O locus IFN $\alpha$  humano inclui duas subfamílias. A primeira subfamília consiste em 14 genes não alélicos e 4 pseudogenes que possuem pelo menos 80% de homologia. A segunda subfamília,  $\alpha$ II ou omega ( $\omega$ ), contém 5 pseudogenes e 1 gene funcional que exibem 70% de homologia com os genes de IFN $\alpha$  (Weissmann e Weber 1986).

Os subtipos de IFN $\alpha$  têm diferentes actividades específicas mas possuem o mesmo espectro biológico (Streuli et al. PNAS - USA 78: 2848, 1981) e possuem o mesmo receptor celular (Agnet M. et al. Em "Interferon 5" Ed. I. Gresser p. 1 - 22, Academic Press, Londres 1983).

O interferão  $\beta$  (IFN  $\beta$ ) é codificado por um único gene que tem aproximadamente 50% de homologia com os genes de IFN $\alpha$ .

Os subtipos de interferão  $\alpha$  e o interferão  $\beta$  ligam-se ao mesmo receptor na superfície da célula.

O interferão gama (IFN gama) também é codificado por uma única cópia, a qual tem pequena homologia com os genes de IFN $\alpha$  e de IFN $\beta$ . O receptor para o IFN gama é distinto do receptor dos interferões  $\alpha$  e  $\beta$ .

Para o objectivo da presente invenção o receptor das classes  $\alpha$  e  $\beta$  dos IFN serão designados IFN-R. Este representa o receptor tipo I natural. O grupo de proteínas que formam interferão natural  $\alpha$  será designado por IFN $\alpha$ , e o tipo I-IFN representará os IFN $\alpha$ , IFN $\omega$  e IFN $\beta$  naturais.

Apesar do facto do interferão ser um potente agente antiviral, há uma considerável evidência que sugere que muitos dos sintomas característicos de doenças virais agudas, como as infecções do tracto respiratório superior, são causadas por um sobreprodução de interferão alfa. Além disso, foi mostrado que o IFN alfa contribui para a patogénese de certas infecções crónicas de vírus, em animais de laboratório, e as evidências disponíveis sugerem que também é este o caso para certas doenças virais crónicas humanas, como os causados pelo vírus do sarampo.

Os interferões  $\alpha$  são, também, potentes moléculas imunoregulatórias que estimulam a activação policlonal da célula B, aumentam a citotoxicidade da célula NK, inibem o funcionamento da célula T, e modulam a expressão dos

antígenos de classe I do complexo de histocompatibilidade principal (MHC), os quais estão todos implicados na indução da autoimunidade e na rejeição do enxerto. A produção anormal de interferão  $\alpha$  está associada com um número de doenças autoimunes e de desordens inflamatórias incluindo o lúpus eritematoso sistémico (SLE), o diabetes do tipo I, a psoríase, a artrite reumatóide, a esclerose múltipla, a doença de Behçets, a anemia aplástica, o síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e as doenças graves de imunodeficiência combinada. A presença do interferão  $\alpha$  no soro de pacientes com lúpus sistémico está correlacionado quer com os sinais clínicos quer com os sinais humorais do aumento da actividade da doença. A produção de interferão  $\alpha$  em pacientes com HIV positivo está, também, relacionada com a evolução da doença.

Foi informado que a administração de interferão  $\alpha$  agrava a doença subjacente em pacientes com psoríase e com esclerose múltipla e induz um síndrome do tipo SLE em pacientes sem uma história prévia de doenças autoimunes. Também foi mostrado que o interferão  $\alpha$  induz a glomerulonefrite em ratos normais e acelera o início das doenças autoimunes espontâneas em ratos NZB/W.

O interferão  $\alpha$  também é produzido durante o curso da doença de enxerto-contrá-hospedeiro (GVHD), em paralelo com o aumento da actividade da célula NK, característica da GVHD. O interferão  $\alpha$  é o principal modulador da citotoxicidade da célula NK, e foi mostrado que a administração de interferão  $\alpha$  aumenta as consequências intestinais da GVHD em ratos normais.

O objecto da presente invenção é proporcionar novos antagonistas contra as actividades biológicas do IFN tipo I humano. Estes antagonistas poderiam ser usados para terapia, incluindo para fins profiláticos, em casos onde o IFN tipo I (IFN  $\alpha/\beta$ ) seja produzido de forma anormal e quando esta produção anormal esteja associada com sintomas patológicos. Tais antagonistas também poderiam ser utilizados para diagnosticar várias doenças ou para o estudo da evolução de tais doenças.

Para definir tais antagonistas, os inventores tomaram em consideração o facto de que o IFN tipo I humano natural é constituído, de facto, por uma mistura de interferões (subespécies) e no facto de que a composição desta associação dos diferentes subtipos de interferões varia quer quantitativamente quer qualitativamente.

Alguns interferões naturais, como os segregados pelas células Namalwa (interferão Namalwa) ou pelos leucócitos (interferão leucócito) têm sido estudados detalhadamente (N. B. Finter e K. H. Fautes, Interferon 2, 1980, p 65 - 79 I Gresser Editor Academic Press, K. Cantell et al, Interferon 1, 1979, p. 2 - 25, I. Gresser Editor Academic Press), e foram utilizados pelos inventores para definir os interferões tipo I naturais.

Em alguns casos patológicos, como a SIDA, foram descritos os interferões que possuem algumas propriedades especiais (O. T. Preble et al, Annals of New York Academy of Sciences p. 65 - 75). Contudo, este interferão envolvido em casos patológicos, como a SIDA, liga-se ao mesmo receptor, como descrito acima.

Um objecto da presente invenção é proporcionar antagonistas do IFN tipo I, que sejam capazes de inibir ou neutralizar, até uma determinada extensão, as propriedades biológicas do IFN tipo I humano, que é o mesmo que dizer, neutralizar in vivo uma mistura das subespécies  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ .

Deste modo os inventores têm determinados anticorpos, em especial anticorpos monoclonais, que possuem a propriedade de serem antagonistas do IFN tipo I. Estes anticorpos estão direccionados para o receptor do IFN tipo I humano.

A invenção está relacionada com um método para obtenção de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer o domínio extracelular do receptor do interferão tipo I humano (IFN-R) e com a capacidade de neutralizar as propriedades biológicas dos interferões humanos Tipo I incluindo  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ , compreendendo a etapa de imunização de animais não-humanos com um péptido ou polipéptido seleccionado do grupo constituído por:

- a) a sequência da posição 27 para a posição 427 da Figura 2, ou uma porção desta,
- b) a sequência da posição 1 para a posição 229 da Figura 2 ou uma porção desta,
- c) a sequência da posição 27 para a posição 229 da Figura 2, e
- d) o péptido ou polipéptido modificado por substituição de um ou mais aminoácidos da sequência de (a) a (c), e que é reconhecido por um anticorpo direccionado para os domínios extracelulares não-modificados do IFN-R

Os anticorpos monoclonais podem ser usados para a preparação de composições farmacêuticas, úteis no tratamento de sintomas

associados com a produção anormal de IFN tipo I. Estes anticorpos monoclonais são, também, apropriados para a preparação de reagentes de diagnóstico.

Um anticorpo monoclonal obtido pelo método reivindicado está direccionado contra o receptor do interferão tipo I (IFN-R) e é caracterizado pelas seguintes propriedades:

- reconhece o domínio extracelular do IFN-R humano, e
- possui a capacidade de neutralizar as propriedades biológicas do IFN tipo I humano.

A habilidade para neutralizar as propriedades biológicas do IFN tipo I podem ser estimadas como uma função da capacidade do anticorpo monoclonal para neutralizar a actividade antiviral do IFN tipo I. Os procedimentos detalhados são dados nos exemplos, de modo a permitir a realização do teste para a actividade antiviral. As células testadas devem ser, vantajosamente, células Daudi, cuja afinidade para os IFN tipo I é bem conhecida. Os passos principais deste teste consistem em:

- incubar uma determinada concentração de células humanas, que respondam ao IFN tipo I humano, com IFN tipo I humano, na presença de uma determinada concentração de anticorpos monoclonais a serem analisados, durante um tempo suficiente para permitir a formação do complexo entre os anticorpos monoclonais e os IFN-R das células humanas e/ou entre os IFN tipo I e os IFN-R das células humanas;
- infectar as células incubadas com um determinado vírus, numa determinada concentração;

- lavar as células;
- resuspender as células no meio de cultura;
- incubar, durante um período de tempo suficiente para permitir a replicação do vírus;
- fazer a lise das células;
- medir a replicação do vírus, ou medir a inibição do efeito citopático.

A habilidade dos anticorpos monoclonais obtida pelo método reivindicado para neutralizar as propriedades biológicas, dos IFN tipo I humanos, pode ser modulada como uma função da dose de anticorpos utilizada. Assim, pode ser obtida uma inibição das propriedades biológicas de 100%, ou uma inibição parcial.

Os anticorpos monoclonais direccionado contra o receptor do IFN tipo I humano, são ainda caracterizados pelo facto de serem capazes de inibir a ligação do IFN tipo I humano ao IFN-R humano.

Um anticorpo monoclonal que possui a capacidade de reconhecer o domínio extracelular do IFN-R humano e que é capaz de inibir a ligação do IFN tipo I humano ao seu receptor, pode ser seleccionado pelos seguintes passos:

- pré-incubar uma determinada concentração de anticorpos monoclonais purificados ou o sobrenadante de uma cultura de hibridoma que contém os anticorpos monoclonais a serem analisados, com células humanas capazes de hospedar o IFN-R;
- adicionar, ao meio pré-incubado, IFN tipo I humano marcado, numa determinada concentração;
- incubar ao meio que contém as células humanas, os anticorpos monoclonais e os IFN tipo I marcados,



durante um período de tempo suficiente para permitir que se atinja o equilíbrio, por um lado entre os anticorpos monoclonais e por outro lado entre o IFN tipo I, com o IFN-R celular;

-lavar as células;

-determinar a formação do complexo de ligação entre as células humanas e os IFN tipo I marcados, contando a quantidade de IFN tipo I marcado ligado.

Alguns dos anticorpos monoclonais obtidos pelo método reivindicado possuem também a capacidade de neutralizar as propriedades proliferativas do IFN tipo I humano. Esta propriedade pode, também, ser avaliada em células Daudi, realizando os passos seguintes:

- permitir que as células cresçam na presença de IFN tipo I humano e determinar a concentração de mAb;
- contar as células de modo a detectar uma inibição do efeito antiproliferativo do IFN tipo I humano.

Uma propriedade de um anticorpo monoclonal obtido pelo método reivindicado reside na sua capacidade para reconhecer o domínio extracelular do receptor de IFN humano. Esta propriedade dos anticorpos monoclonais pode ser avaliada em células humanas que possuam o receptor humano natural, mas também no domínio extracelular de um IFN-R recombinante tal como o expresso numa célula procariótica, por exemplo, na E.coli ou um IFN-R recombinante tal como o expresso numa célula eucariótica como as células dos mamíferos, por exemplo uma célula CHO.

Este receptor pode, de facto, apresentar diferentes propriedades, dependendo do facto de ser produzido numa

célula procariótica ou eucariótica e dependendo do facto da maturação pos-translational ter ou não ocorrido. Os inventores mostraram, de maneira interessante, que podem ser realizados ensaios pertinentes para avaliar a capacidade de um anticorpo monoclonal obtido de acordo com o método reivindicado, isto é, para reconhecer o IFN-R celular, estes ensaios podem ser realizados num receptor recombinante expresso em células de mamíferos. De facto, tais receptores recombinantes têm as mesmas propriedades que o receptor celular, no que diz respeito à sua actividade.

Os anticorpos monoclonais podem ser obtidos em relação às várias formas do receptor, inclusive o receptor completo, um domínio particular ou um péptido característico da sequência de aminoácidos do receptor representado na figura 3.

Os anticorpos monoclonais podem, por exemplo, estar preparados em relação à forma solúvel do receptor. Está descrito na figura 2, u polipéptido hidrosolúvel que corresponde à forma solúvel do INF-R. De acordo com a presente invenção, uma forma solúvel do o IFN-R corresponde a um péptido ou a um polipéptido, capaz de circular no corpo.

Outros anticorpos monoclonais obtidos pelo método reivindicado podem, também, estar preparados em relação a um péptido incluído no domínio extracelular do receptor, como descrito na figura 2. Um péptido vantajoso corresponde, por exemplo à sequência de aminoácidos incluída entre o aminoácido 1 e o aminoácido 229. De acordo com outra forma de realização da invenção, os anticorpos podem ser preparados em relação a um polipéptido modificado por substituição de um ou mais aminoácidos, desde que os anticorpos direccionados com o

domínio de extracelular não modificado do IFN-R, reconheça o polipéptido modificado ou péptido.

Os anticorpos monoclonais preferidos de acordo com a invenção são do tipo IgG1.

Entre os anticorpos obtidos pelo método reivindicado, um anticorpo que tem a capacidade de inibir a ligação do IFN tipo I ao seu receptor é preferencialmente caracterizado por inibir in vitro a ligação do IFN tipo humano ao IFN-R celular humano quando é co-incubado com as células hospedeiras do hu-IFN-R, a uma concentração de anticorpos igual ou inferior a 100 µg/ml, preferencialmente igual ou inferior a 50 µg/ml, vantajosamente inferior a 20 µg/ml, mais preferencialmente no intervalo entre aproximadamente 0,5 a 2 µg/ml.

Os inventores mostraram que a elevada afinidade da capacidade de ligação de um anticorpo monoclonal não é suficiente para assegurar que este anticorpo seja capaz de inibir a actividade de ligação do IFN tipo I humano ao IFN-R. Não obstante, a elevada afinidade da capacidade de ligação do anticorpo monoclonal é necessária para investigar, adicionalmente, a habilidade do anticorpo para inibir a ligação do IFN tipo I ao seu receptor celular.

Outro anticorpo monoclonal é caracterizado por neutralizar in vitro a actividade antiproliferativa do IFN tipo I humano, em células com elava reposta a este IFN tipo I humano, por exemplo as células Daudi numa concentração situada no intervalo entre 1 a 10 µg/ml.

De acordo com outra forma de realização, um anticorpo monoclonal é, também, caracterizado por neutralizar in vitro a actividade antiproliferativa do IFN tipo humano, em células com fraca resposta a este IFN humano, por exemplo células Ly28 numa concentração compreendida no intervalo de 50 a 100 µg/ml.

Um grupo particular de anticorpos monoclonais é caracterizado por neutralizar a actividade antiviral do IFN tipo I humano, em células com elevada resposta a este IFN tipo I humano, por exemplo células de Daudi numa concentração compreendida no intervalo de 1 a 50 µg/ml, preferencialmente de 1 a 20 µg/ml, para uma concentração de IFN tipo I compreendida nno intervalo de 1 a 1000 unidades com referência ao internacional padrão MRC 69/19.

Vantajosamente, o anticorpo monoclonal obtido pelo método reivindicado é tal que estes anticorpos não fazem a ligação ao receptor humano para o IFN gama.

Um anticorpo particular que satisfaz estas exigências é tal que está direccionado para um epitopo na sequência de aminoácidos incluído entre o aminoácido 27 e o aminoácido 427 do domínio extracelular do IFN-R humano, como representado na figura 2.

Um anticorpo de monoclonal particularmente interessante é o anticorpo designado por 64G12 sob o n.º 92022605, que foi depositado na ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures Porton Down Salisbury, Wiltshire SP4 056, United Kingdom) a 26 de fevereiro de 1992.

Um método de obtenção destes anticorpos é descrito na reivindicação 1. Estes anticorpos podem ser preparados pelos métodos convencionais, que envolvem a preparação de células de hibridoma por fusão de células de mieloma e de células de baço de um animal anteriormente imunizado com o antígeno do péptido, em condições tais que o antígeno contra o qual os anticorpos são formados seja constituído pelo domínio de extracelular de IFN-R ou de qualquer polipéptido ou péptido deste domínio.

Os hibridomas são construídos de acordo com o protocolo de Kohler e Milstein (Nature, 1974, 256,: 495 - 497). Por exemplo, os hibridomas são derivados da fusão das células de baço, acima descrito, com ratos NS1 (BalbC) HGPRT como células de mieloma.

Um segundo procedimento para a produção de anticorpos monoclonais, consiste em realizar a fusão entre as células B de sangue imortalizou com o vírus de Epstein/Barr e linfócitos B humanos, anteriormente colocados em contato com o domínio extracelular ou com um fragmento do IFN-R, em relação ao qual se decidiu formar os anticorpos monoclonais. As células B, anteriormente colocadas em contato com o domínio extracelular de IFN-R ou com um fragmento em relação ao qual se decidiu formar os anticorpos monoclonais, podem ser obtidas por uma cultura in vitro em contacto com os antígenos, a recuperação das células B revestidas com estes antígenos, é precedida por um ou vários ciclos de excitação.

Os anticorpos humanos obtidos levando a cabo o procedimento acima, com as propriedades acima definidas, são aqui descritos.

Um anticorpo monoclonal, tal como descrito, é caracterizado em que as regiões variáveis ou complementares das suas cadeias pesadas e/ou leves são enxertadas no esqueleto e/ou nas regiões constantes de um anticorpo humano.

Uma composição que possui propriedades antagonistas para as propriedades biológicas do IFN tipo I humano, caracterizou por compreender anticorpos monoclonais como os definidos acima é também prevista.

Adequadamente, uma composição farmacêutica é apresentada, caracterizada por incluir anticorpos monoclonais como definidos acima, em conjunto com um veículo farmacêutico aceitável.

A utilização de um anticorpo monoclonal, como definido acima, para o fabrico de um fármaco para o tratamento de profilaxias ou de um estado patológico ou de sintomas associados com uma produção excessiva de IFN tipo I é também descrita.

De acordo com o primeiro exemplo os anticorpos podem ser utilizados como princípio activo em composições farmacêuticas para o tratamento de rejeição de enxerto.

De acordo com o primeiro exemplo, os anticorpos, da invenção, podem ser utilizados como princípio activo em composições farmacêuticas para o tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias. Tais doenças incluem o lúpus eritematoso sistémico, os diabetes do tipo I, a psoríase, a artrite reumatóide, a esclerose múltipla, a doença de Behçets, a anemia aplásica, o síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA), e outras doenças de imunodeficiências graves combinadas.

O tratamento de doenças graves causadas por vírus pode, também, ser realizado com estes anticorpos. Por exemplo, as infecções do tracto respiratório superior, as infecções crónicas virais, tais como o vírus do sarampo, podem ser efectuadas.

Estes anticorpos podem, também, ser utilizados para o diagnóstico in vitro da presença de receptor do IFN tipo I humano ou células.

Mais detalhes e informação adicional irá surgir com a descrição dos exemplos e com as figuras.

## **FIGURAS**

- Figura 1: ligação dos anticorpos monoclonais  $^{125}\text{I}$ - marcados 34F10 e 64G12 para:
  - A: células Daudi
  - B: células Ly28

Resumidamente, foram incubadas  $10^6$  células durante 2 horas a 4 °C, na presença de diferentes quantidades dos anticorpos marcados diluídos em médio de RPMI que contém 10% de soro de bezerro fetal (FCS). As células foram, então, lavadas 4 vezes em RPMI-1% FCS e contadas para a radioactividade ligada aos filtros. Mediu-se a ligação não específica através da incubação com um excesso 100 vezes de anticorpos frios e foram subtraídas das contagens totais.

- Figura 2: nucleótido e correspondente sequência de aminoácidos do domínio extracelular do IFN-R humano.

Os anticorpos monoclonais foram produzidos em relação às formas recombinantes solúveis do receptor de alfa-beta do interferão humano (IFN-R) sintetizado quer em células procariótas (E.coli) ou num sistema de células de mamífero (Células Cos). Estas formas solúveis foram baseadas na sequência de DNA descrita na figura 2.

- Figura 3: nucleótido e correspondente sequência de aminoácidos do IFN-R humano.

## **EXEMPLOS**

### **EXEMPLO 1:**

#### Síntese dos receptores solúveis

##### Síntese em E.coli

Um fragmento de DNA que contém a sequência da codificação para o domínio extracelular (aminoácidos 27 a 427) do INF-R humano (figura 2), na qual foi introduzida, mesmo antes do codão de terminação, uma sequência extra de codificação com 5 resíduos de histidil, foi clonado nos vectores de expressão pKK233-2. Este fragmento foi produzido pela Reacção em cadeia da Polimerase (PCR) e os plasmídeos resultantes foram sequenciados para confirmar a inserção na estrutura com o com a sequência Shine-Dalgarno e com a sequência apropriada para codificar o receptor.

A cauda de poli-histidil introduzida na proteína recombinante possibilita-a a ser rapidamente purificada por cromatografia de afinidade num suporte de níquel quelante (Coluna de NTA) como previamente descrito (Hochuli E. et al, Bio/technology, 1988, 1321 - 1325).

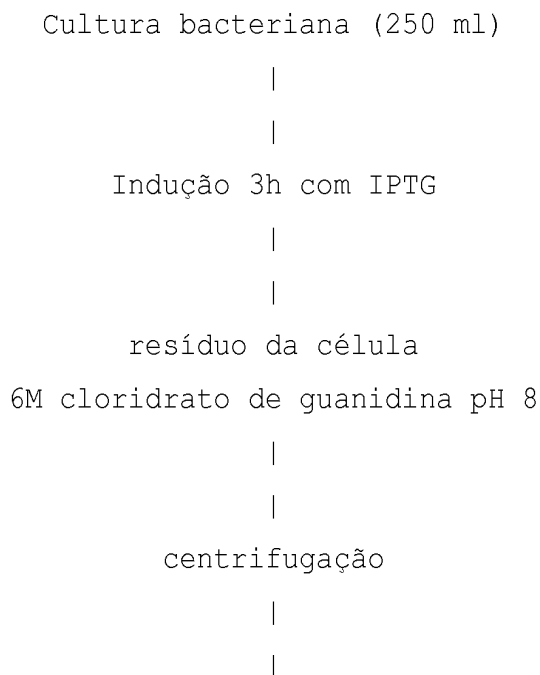


O plasmídeo foi introduzido na estirpe de E.coli, JM105, e a síntese de proteína foi induzida por adição de IPTG no médio de cultura (pKK233-2, promotor tac).

As proteínas foram do resíduo bacteriano e o receptor solúvel foi purificado até à homogeneidade por cromatografia de afinidade, como aqui descrito. Este procedimento originou uma proteína que migra 2 faixas à volta de 50 kDa sob condições de redução e três faixas sob condições de não redução. A concentração máxima de proteína obtida, por diferentes procedimentos, foi de aproximadamente 20 µg/ml.

A sequência N-terminal das duas proteínas, detectada por electroforese em gel, mostrou que ambas as proteínas são o fragmento esperado do receptor.

#### Síntese e purificação de um receptor não glicosilado solúvel:



Coluna de NTA:Lavagem	pH 8	ureia 8M
		pH 6,3 ureia 8M
		pH 5.9 ureia 8M
Eluição	pH 4	ureia 8M
re-enrolamento	diluição, diálise,	
		com Tris 0,1 M pH 9
	diálise com PBS	

Usando a mesma aproximação de PCR, também construímos um vector de expressão que codifica a sequência 1 - 427 de aminoácidos de IFN-R, com uns resíduos 5-histidil adicionais no C-terminal, inserido no vector de expressão pXHT-3. A sucessão exacta de nucleótidos da inserção foi, também, confirmada.

O plasmídeo resultante foi introduzido por electroporação em células Cos7 na expressão transiente e a proteína recombinante foi purificadas até à homogeneidade por cromatografia de afinidade seguida por cromatografia de troca iónica em mono-Q (Pharmacia) como aqui descrito.

#### Purificação do IFN-R solúvel a partir de células Cos7

electroporação preparativa das células cos
18h
meio livre de soro

sobrenadantes recolhidos a 48h, 72h, 96h,

|

|

concentração

|

|

Coluna de NTA

|

|

lavagem com PBS

eluição com NaOAc 0,1 M a pH 5,5

|

|

neutralização

concentração, 30 000 retirados

|

|

Mono Q (NaCl 0 - 0,5 M)

Esta purificação originou uma proteína de 76 kDa, cuja sequência N-terminal corresponde à sequência prevista para o receptor, com alguma heterogeneidade no processamento da sequência líder.

## **EXEMPLO 2:**

### Produção de anticorpos monoclonais em relação ao receptor do interferão tipo I

#### 1) Produção dos anticorpos monoclonais

Os ratos foram imunizados por injeção do interferão solúvel recombinante (r sIFN-R) purificado a partir de E. coli ou de um sobrenadante da cultura de células COS7. Inicialmente os ratos foram injectados intraperitonealmente e subcutaneamente com a proteína purificada num adjuvante de Freund's completo.

Subsequentemente os ratos foram injectados, uma vez por semana intraperitonealmente, com as proteínas purificadas diluídas numa solução salina tamponada. De cada vez foram injectadas dez microgramas de proteínas recombinantes.

Depois da quarta injeção, foi recolhido sangue e foi testada a presença de anticorpos de soro específicos quer por ELISA quer por Western blot, em relação ao receptor recombinante. As respostas mais fortes foram, então, fortalecidas com um total de 10 µg de antigene, metade foi injectada intravenosamente e a outra metade foi injectada intraperitonealmente.

## 2) Fusão de célula

Quatro dias depois do fortalecimento, recolheram-se as células de baço do animal imunizado e fez-se a fusão com células de mieloma NS1 (rato) (Balbc) HGPRT, de acordo com o método descrito por S. Fazekas et al. (J. Immunol. Methods 35: 1 - 32, 1980). Rapidamente, fez-se a fusão de  $5 \times 10^7$  células de baço a  $3 \times 10^7$  células de mieloma em 1 ml de solução de polietilenoglicol e foram distribuídas em cinco poços com 96 pratos numa camada de alimentação de macrofago peritoneal em médio HAT (hipoxantina, aminoproteína e timidina). Este procedimento foi repetido 4 vezes à medida que eram obtidas  $20 \times 10^7$  células do baço do rato imunizado. Realizaou-se a filtração para hibridomas específicos quando se detectaram grandes colónias nos poços de cultura.

Para a filtração, a presença de anticorpos específicos foi determinada pelo método de ELISA directo:

- a) os pratos de ELISA foram cobertos durante a noite, a 4 °C, com sIFN-R expresso E.coli ou expresso célula Cos7 purificado, diluído em PBS. Os pratos cobertos com BSA foram usados para detectar a não ligação específica,
- b) os pratos foram saturados por incubação com BSA 3% em PBS durante 1 hora a 37 °C,
- c) os pratos foram incubados durante 4 horas, à temperatura ambiente, com os sobrenadantes de hibridoma diluídos de 1 para 4 com PBS-0,05% Tween 20,
- d) os anticorpos ligados foram detectados por um procedimento de dois passos, incluindo uma primeira incubação com imunoglobulina de cabra biotinilada anti-rato, seguida por complexos de peroxidase streptavidina-rábano (ambos de Amersham e diluídos 1/1000 em PBS-0,05% Tween 20).

O anticorpo positivo que segrega os hibridomas foram transferidos para um prato de 24 poços, numa camada alimentadora de células de baço e a sua reactividade foi, novamente, conferida por ELISA, e Western-blot.

### 3) Identificação da reactividade para o receptor do interferão tipo Inatural

A reactividade dos anticorpos monoclonais (mAbs) que reconhecem o sIFN-R recombinante foi testada em relação ao receptor do tipo I natural expresso à superfície das células Daudi, através de imunofluorescência de membrana. Resumidamente, foram incubadas  $5 \times 10^5$  células Daudi, em 100  $\mu$ l de sobrenadante de cultura de hibridomas escolhidos, durante 30 min a 4 °C. As células foram, então, lavadas 4 vezes em meio de RPMI que continha BSA 1%, e foram ainda incubadas com FITC de cabra anti-rato diluído e marcado  $F(ab')_2$  durante

30 min a 4 °C. As células foram, finalmente, analisadas através de citometria de fluxo após a lavagem. Um dos 35 anticorpos testados produziu um receptor recombinante em relação a E.coli e 5 dos 6 anticorpos testados produzidos em relação ao receptor recombinante de COS, reconhecem o receptor natural nas células Daudi.

A clonagem destes hibridomas foi, então, realizada por diluição limitante. O isótopo deste mAbs foi determinado por um método de ELISA que utiliza o anticorpos isotópicos específicos. Detectou-se que todos os 6 mAbs são IgG1 com cadeias leves kappa. A Tabela 1 apresenta um resumo da reactividade destes 6 mAbs.

Foram purificados anticorpos monoclonais dos sobrenadantes da cultura através de cromatografia G da proteína.

Tabela 1  
Reactividade dos anticorpos monoclonais IFN-R

	Reactividade em relação ao receptor recombinante				Reactividade em relação ao receptor celular*
	E.COLI		COS		imunofluorescência
	ELISA	Western	ELISA	Western	
34F10	+	+	+	+	+
64G12	+	+	+	+	+
63F6	-	-	+	+ fraco	+
64G2					
64D10					
6508					

\* medida em células Daudi.

### **EXEMPLO 3:**

#### Inibição da ligação do interferão às linhas de células humanas

A inibição da ligação do interferão às linhas de células humanas foi avaliada como se segue. Foram pré-incubadas  $10^6$  células, a 4 °C durante 30 min, com várias diluições dos sobrenadantes da cultura de hibridoma ou purificadas com mAbs ou apenas com o meio. Adicionou-se IFN alfa 8 ou alfa 2  $I^{125}$ -marcado, numa concentração de 100 pM e as células foram incubadas durante um período adicional de 2 horas a 4 °C. Estas incubações foram realizadas em meio de RPMI que continha HEPES 20mM pH 7,4 e soro de bezerro de fetal 10% (FCS). As células foram, no final, lavadas 4 vezes com RPMI - FCS 1% e contadas para determinar a radioactividade remanescente presa aos filtros.

Neste ensaio mostrou-se que o mAb segregado pelo linha hibridoma 64612 (nomeado posteriormente mAb 64612) inibia a ligação do IFN marcado às células de uma forma dependente da dosagem. Foi obtida 50% de inibição de ligação para as células Daudi (Burkitt lymphoma cell line; Klein al et., Cancer Research, 28: 1300 - 1310, 1968) a uma concentração de mAb de 0,4 µg/ml. Foi obtida a mesma inibição obtido com células K562 (chronic myelogenous leukemia, Lozzio e Lozzio, Cell, 45: 321 - 334, 1975) mas foi obtida 50% de inibição a 11 µg/ml para células HL60 (Promyelocytic Leukemia, Collins S. J. al et., Nature, 270: 347 - 349, 1977) e 60 µg/ml para células Ly28 (Klein G. et al. Int. J. Cancer, 10 :44 - 57, 1972).

Tabela 2:

A inibição de ligação do IFN alfa 2 marcado a várias linhas de células por mAB64G12

Linhas de células	Concentração de mAB que origina 50% de inibição na ligação
Daudi K562	0,4 µg/ml
H160	11 µg/ml
Ly28	60 µg/ml

A diferença na concentração de mAb na qual há 50% de inibição de ligação do IFN foi obtida e foi investigada pela ligação directa de mAbs 64G12 e 34F10 I<sup>125</sup>marcado às mesmas linhas de células e por análise gráfica de Scatchard dos resultados. No intervalo de concentração de 0,1 a 1,5 µg/ml, verificou-se uma elevada afinidade de ligação do mAb 34F10 ( $\cong 10\text{nM}$ ) em todas as linhas de células, considerando que uma elevada afinidade de ligação de mAB 64G12 só tinha sido encontrada em células Daudi e em células K562 (Figura 1).

#### **EXEMPLO 4:**

##### Inibição da função do interferão tipo I

A inibição funcional do interferão tipo I pelo mAb 64G12 purificado foi demonstrado num ensaio antiviral em células Daudi, usando quer um IFN recombinante alfa2, IFN beta e IFN omega, quer interferões Namalwa ou leucócitos purificados, e numa análise antiproliferativa com IFN recombinante alfa 2.



#### \* Actividade Antiviral

Foi realizado um ensaio antiviral em células Daudi como descrito (M. Dron e M. G. Tovey, J. Gen. Virol. 64 : 2641 - 2647, 1983) . As células ( $0,5 \times 10^6$ /ml) foram incubadas durante 24 horas na presença do interferão e de anticorpos.  $10^6$  células em 1 ml foram, então, infectadas durante 1 hora a 37 °C com vírus de estomatite vesicular (VSV), foram então lavadas 3 vezes, resuspensas no meio de cultura e incubadas durante 18 horas a 37 °C. As células foram então lisadas por congelamento-descongelamento e a replicação do vírus foi medida por titulação dos sobrenadantes em células L929. Demonstrou-se, para o mAb 64G12, que há uma inibição dependente da dose da actividade de antiviral dos vários subtipos do IFN tipo I.

Para o ensaio antiviral com as células Wish, células, as células foram incubadas, durante 24 horas, com várias concentrações de interferões na presença do mAbs anterior para o desafio com VSV. Neste ensaio, demonstrou-se que o mAb 64G12 bloqueia a completamente actividade antiviral do IFN Leucócito (50U/ml), do IFN alfa 2 recombinante (50U/ml) e do interferão do soro dos pacientes com SIDA (50, 75 e 150U/ml).

#### \* Actividade antiproliferativa

Para o ensaio antiproliferativo, as células Daudi foram colocadas numa concentração de  $10^5$  células por ml num prato com 96 poços, na presença de interferão com anticorpo de inibição ou de controle e purificadas. As células foram, então, contadas após 24, 48 e 72 horas com um contador de Coulter e foi conferida a viabilidade através da exclusão com azul de tripiano. Demonstrou-se que o mAb 64G12 purificado

apresenta uma inibição, da actividade antiproliferativa dependente da dose, do interferão alfa 2.

25-10-2007

## REIVINDICAÇÕES

1. Método para obtenção de anticorpos monoclonais capazes de reconhecer o domínio extracelular do receptor do interferão tipo I humano (IFN-R) e com a capacidade de neutralizar as propriedades biológicas dos interferões humanos tipo I incluindo  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ , compreendendo a etapa de imunização de animais não-humanos com péptidos ou polipéptidos seleccionados do grupo constituído por:

- (a) a sequência da posição 27 para a posição 427 da Figura 2, ou uma porção desta,
- (b) a sequência da posição 1 para a posição 229 da Figura 2 ou uma porção desta
- (c) a sequência da posição 27 para a posição 229 da Figura 2, e
- (d) um péptido ou polipéptido modificado por substituição de um ou mais aminoácidos da sequência de (a) a (c), que é reconhecido por um anticorpo direccionado para os domínios extracelulares não-modificados do IFN-R,

2. Método da reivindicação 1, compreende ainda a etapa de preparação de células hibridomas pela fusão de células de mieloma e células de baço do referido animal não-humano.

3. Método para obtenção de anticorpos monoclonais que reconhecem o domínio extracelular do receptor do interferão tipo I humano (IFN-R) e com a capacidade de neutralizar direccionada às propriedades biológicas dos interferões humanos tipo I incluindo  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\omega$ , compreendendo as etapas de:

- colocação de linfócitos B humanos em contacto com um péptido ou poleipétido seleccionado do grupo que consiste em:

- (a) a sequência da posição 27 para a posição 427 da Figura 2, ou uma porção desta,
- (b) a sequência da posição 1 para a posição 229 da Figura 2 ou uma porção desta
- (c) a sequência da posição 27 para a posição 229 da Figura 2, e
- (d) um péptido ou poleipétido modificado por substituição de um ou mais aminoácidos da sequência de (a) a (c), que é reconhecido por um anticorpo para os domínios extracelulares não-modificados do IFN-R, e que é reconhecido por um anticorpo direccionado para o domínio extracelular não modificado do IFN-R.

- realização da fusão destes linfócitos com células B imortalizadas.

4. Método da reivindicação 3, em que as células imortalizadas B são imortalizadas com o vírus Epstein-Barr.

25-10-2007

1/5

Anticorpo ligado (pM)

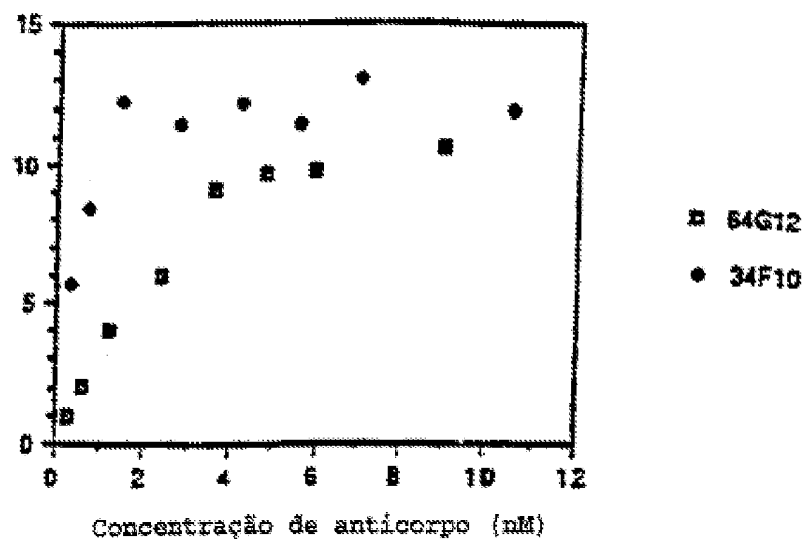


FIGURA 1A

Anticorpo ligado (pM)

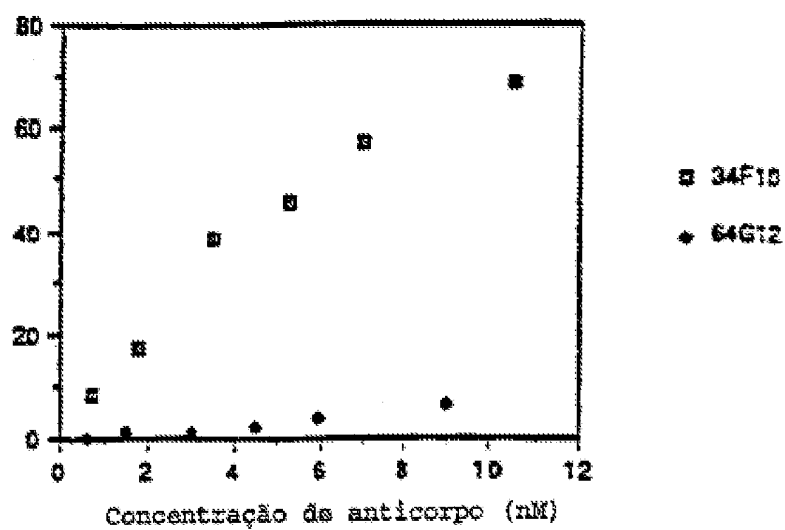


FIGURA 1B

FIGURA 2A

CTGCAGGCGATCTCCGGGCGCTCCAG

ATG ATG GTC GTC CTC CTC GCG GCG AGG ACC CTA GTG CTC GTC GCG GTG GCG CCA  
 Met Met Val Val Leu Leu Gly Ala Thr Thr Leu Val Leu Val Ala Val Gly Pro  
  
 TGG GTC TTG TCC GCA GCG GCA GGT GCA AAA AAT CTA AAA TCT CCT CAA AAA GTA  
 Trp Val Leu Ser Ala Ala Ala Gly Gly Lys Asn Leu Lys Ser Pro Gln Lys Val  
  
 GAG GTC GAC ATC ATA GAT GAC AAC TTT ATC CTC AGG TGG AAC AGG AGG GAT GAG  
 Glu Val Asp Ile Ile Asp Asp Asn Phe Ile Leu Arg Trp Asn Arg Ser Asp Glu  
  
 TCT GTC GCG AAT GTC ACT TTT TCA TTC GAT TAT CAA AAA ACT GCG ATG GAT AAT  
 Ser Val Gly Asn Val Thr Phe Ser Phe Asp Tyr Gln Lys Thr Gly Met Asp Asn  
  
 TGG ATA AAA TTG TCT GCG TCT CAG AAT ATT ACT AGT ACC AAA TGC AAC TTT TCT  
 Trp Ile Lys Leu Ser Gly Cys Gln Asn Ile Thr Ser Thr Lys Cys Asn Phe Ser  
  
 TCA CTC AAG CTG AAT GTT TAT GAA GAA ATT AAA TTG CGT ATA AGA CCA GAA AAA  
 Ser Leu Lys Leu Asn Val Tyr Glu Glu Ile Lys Leu Arg Ile Arg Ala Glu Lys  
  
 GAA AAC ACT TCT TCA TGG TAT GAG GTT GAC TCA TTT ACA CCA TTT GCG AAA GCT  
 Glu Asn Thr Ser Ser Trp Tyr Glu Val Asp Ser Phe Thr Pro Phe Arg Lys Ala  
  
 CAG ATT CGT CCT CCA GAA GTA CAT TTA GAA CGT GAA CAT AAG GCA ATA CTC ATA  
 Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val His Leu Glu Ala Glu Asp Lys Ala Ile Val Ile  
  
 CAC ATC TCT CCT GCA ACA AAA GAT AGT GTT ATG TCG GCT TTG CAT GGT TTA ACC  
 His Ile Ser Pro Gly Thr Lys Asp Ser Val Met Trp Ala Leu Asp Gly Leu Ser  
  
 TTT ACA TAT AGC TTA CTT ATC TGG AAA AAC TCT TCA GGT GTA GAA GAA AGC ATT  
 Phe Thr Tyr Ser Leu Leu Ile Trp Lys Asn Ser Ser Gly Val Glu Glu Arg Ile  
  
 GAA AAT ATT TAT TCC AGA CAT AAA ATT TAT AAA CTC TCA CCA GAG ACT ACT TAT  
 Glu Asn Ile Tyr Ser Arg His Lys Ile Tyr Lys Leu Ser Pro Glu Thr Thr Tyr  
  
 TCT CTA AAA GTT AAA GCA GCA CTA CTT ACG TCA TCG AAA ATT GGT CTC TAT AGT  
 Cys Leu Lys Val Lys Ala Ala Leu Leu Thr Ser Trp Lys Ile Gly Val Tyr Ser  
  
 CCA GTA CAT TCT ATA AAG ACC ACA GTT GAA AAT GAA CTA CCT CCA CCA GAA AAT  
 Pro Val His Cys Ile Lys Thr Thr Val Glu Asn Glu Leu Pro Pro Pro Glu Asn  
  
 ATA GAA CTC AGT GTC CAA AAT CAG AAC TAT GTT CTT AAA TGG GAT TAT ACA TAT  
 Ile Glu Val Ser Val Gln Asn Gln Asn Tyr Val Leu Lys Trp Asp Tyr Thr Tyr  
  
 GCA AAC ATC ACC TTT CAA GTT CAG TCG CTC CAC GCG TTT TTA AAA AGG AAT CCT  
 Ala Asn Met Thr Phe Gln Val Gln Trp Leu His Ala Phe Leu Lys Arg Asn Pro  
  
 GCA AAC CAT TTG TAT AAA TCG AAA CAA ATA CCT GAC TGT GAA AAT GTC AAA ACT  
 Gly Asn His Leu Tyr Lys Trp Lys Gln Ile Pro Asp Cys Glu Asn Val Lys Thr  
  
 ACC CAG TGT GTC TTT CCT CAA AAC GTT TTC CAA AAA GCA ATT TAC CTT CTC GCG  
 Thr Gln Cys Val Phe Pro Gln Asn Val Phe Gln Lys Gly Ile Tyr Leu Leu Arg  
  
 GTA CAA GCA TCT GAT GCA AAT AAC ACA TOT TTT TCG TCT CAA GAG ATA AAG TTT  
 Val Gln Ala Ser Asp Gly Asn Asn Thr Ser Phe Trp Ser Glu Glu Ile Lys Phe  
  
 GAT ACT GAA ATA CAA GCT TTC CTA CTT CCT GCA CTC TTT AAC ATT AGA TCG CTT  
 Asp Thr Glu Ile Gln Ala Phe Leu Leu Pro Pro Val Phe Asn Ile Arg Ser Leu

FIGURA 2B

AGT GAT TCA TTC CAT ATC TAT ATC GGT GCT CCA AAA CAG TCT GGA AAC ACG CCT  
 Ser Asp Ser Phe His Ile Tyr Ile Gly Ala Pro Lys Gln Ser Gly Asn Thr Pro  
  
 CTG ATC CAG GAT TAT CCA CTG ATT TAT GAA ATT ATT TTT TGG GAA AAC ACT TCA  
 Val Ile Gln Asp Tyr Pro Leu Ile Tyr Glu Ile Ile Phe Trp Glu Asn Thr Ser  
  
 AAT GCT GAG AGA AAA ATT ATC CAG AAA AAA ACT GAT GTT ACA GTT COT AAT TTG  
 Asn Ala Glu Arg Lys Ile Ile Glu Lys Lys Thr Asp Val Thr Val Pro Asn Leu  
  
 AAA CCA CTG ACT GTA TAT TGT CTG AAA GCC AGA GCA CAC ACC ATG GAT GAA AAG  
 Lys Pro Leu Thr Val Tyr Cys Val Lys Ala Arg Ala His Thr Met Asp Glu Lys  
  
 CTG AAT AAA AGC AGT GTT TTT ACT CAC GCT GTA TGT GAG AAA ACA AAA CCA GGA  
 Leu Asn Lys Ser Ser Val Phe Ser Asp Ala Val Cys Glu Lys Thr Lys Pro Gly  
  
 AAT ACC TCT AAA TGA GGT ACC  
 Asn Thr Ser Lys

FIGURA 3A

**CITIZENSHIP**

ATG ATG CTC CTC CTC CTC GGC GGC ACC ACC CTA GTG CTC GTC GGC GGC CCA  
 Met Met Val Val Leu Leu Gly Ala Thr Thr Leu Val Leu Val Ala Val Gly Pro  
  
 TGG GTC TTG TCC GCA GGC CCA GGT CCA AAA AAT CTA AAA TCT CCT CAA AAA GTA  
 Trp Val Leu Ser Ala Ala Ala Gly Gly Lys Asn Leu Lys Ser Pro Gln Lys Val  
  
 GAG GTC GAC ATC ATA GAT GAC AAC TTT ATC CTC AGG TGG AAC AGG AGC GAT GAG  
 Glu Val Asp Ile Ile Asp Asp Asn Phe Ile Leu Arg Trp Asn Arg Ser Asp Glu  
  
 TCT CTC GGG AAT GTG AGT TTT TCA TTC GAT TAT CAA AAA ACT GCG ATC GAT AAT  
 Ser Val Gly Asn Val Thr Phe Ser Phe Asp Tyr Gln Lys Thr Gly Met Asp Asn  
  
 TGG ATA AAA TTG TCT GGC TGT CAG AAT ATT ACT AGT ACC AAA TGC AAC TTT TCT  
 Trp Ile Lys Leu Ser Gly Cys Gln Asn Ile Thr Ser Thr Lys Cys Asn Phe Ser  
  
 TCA CTC AAG CTC AAT GTT TAT GAA GAA ATT AAA TGC GGT ATA AGA CCA GAA AAA  
 Ser Leu Lys Leu Asn Val Tyr Glu Glu Ile Lys Leu Arg Ile Arg Ala Glu Lys  
  
 GAA AAC ACT TCT TCA TGG TAT GAG GTT GAC TCA TTT ACA CCA TTT CCG AAA GCT  
 Glu Asn Thr Ser Ser Trp Tyr Glu Val Asp Ser Phe Thr Pro Phe Arg Lys Ala  
  
 CAG ATT GGT CCT CCA GAA GTA CAT TTA GAA GCT GAA GAT AAG CCA ATA CTC ATA  
 Gln Ile Gly Pro Pro Glu Val His Leu Glu Ala Glu Asp Lys Ala Ile Val Ile  
  
 CAC ATC TCT CCT GGA ACA AAA GAT AGT GTT ATG TGG GCT TTC GAT GGT TTA AGC  
 His Ile Ser Pro Gly Thr Lys Asp Ser Val Met Trp Ala Leu Asp Gly Leu Ser  
  
 TTT ACA TAT AGC TTA CTT ATC TGG AAA AAC TCT TCA GGT GTA GAA GAA AGC ATT  
 Phe Thr Tyr Ser Leu Leu Ile Trp Lys Asn Ser Ser Gly Val Glu Glu Arg Ile  
  
 GAA AAT ATT TAT TCC AGA CAT AAA ATT TAT AAA CTC TCA CCA GAC ACT ACT TAT  
 Glu Asn Ile Tyr Ser Arg His Lys Ile Tyr Lys Leu Ser Pro Glu Thr Thr Tyr  
  
 TCT CTA AAA GTT AAA CCA CCA CTA GTT ACC TCA TGG AAA ATT GGT CTC TAT ACT  
 Cys Leu Lys Val Lys Ala Ala Leu Leu Thr Ser Trp Lys Ile Gly Val Tyr Ser  
  
 CCA GTA CAT TGT ATA AAG ACC ACA GTT GAA AAT GAA CTA CCT CCA CCA GAA AAT  
 Pro Val His Cys Ile Lys Thr Thr Val Glu Asn Glu Leu Pro Pro Pro Glu Asn  
  
 ATA GAA CTC AGT CTC CAA AAT CAG AAC TAT GTT CTT AAA TGG GAT TAT ACA TAT  
 Ile Glu Val Ser Val Gln Asn Gln Asn Tyr Val Leu Lys Trp Asp Tyr Thr Tyr  
  
 GCA AAC ATG ACC TTT CAA GTT CAG TGG CTC CAC GCG TTT TTA AAA AGC AAT CCT  
 Ala Asn Met Thr Phe Gln Val Gln Trp Leu His Ala Phe Leu Lys Arg Asn Pro  
  
 CCA AAC CAT TTG TAT AAA TGG AAA CAA ATA CCT CAC TGT GAA AAT GTC AAA ACT  
 Gly Asn His Leu Tyr Lys Trp Lys Gln Ile Pro Asp Cys Glu Asn Val Lys Thr  
  
 ACC CAG TGT CTC TTT CCT CAA AAC GTT TTC CAA AAA GGA ATT TAC CTT CTC GCG  
 Thr Gln Cys Val Phe Pro Gln Asn Val Phe Gln Lys Gly Ile Tyr Leu Leu Arg  
  
 GTA CAA CCA TCT GAT GGA AAT AAC ACA TCT TTT TGG TCT GAA CAG ATA AAG TTT  
 Val Gln Ala Ser Asp Gly Asn Asn Thr Ser Phe Trp Ser Glu Glu Ile Lys Phe  
  
 GAT ACT GAA ATA CAA GGT TTC CTA CTT CCT CCA CTC TTT AAC ATT AGA TGG CTT  
 Asp Thr Glu Ile Gln Ala Phe Leu Leu Pro Pro Val Phe Asn Ile Arg Ser Leu



FIGURA 3B

AGT GAT TCA TTC CAT ATC TAT ATC GGT GGT CCA AAA CAC TGT GGA AAC ACG GGT  
 Ser Asp Ser Phe His Ile Tyr Ile Gly Ala Pro Lys Gln Ser Gly Asn Thr Pro  
  
 CTG ATC CAG GAT TAT CCA CTG ATT TAT GAA ATT ATT TTT TCG GAA AAC ACT TCA  
 Val Ile Gln Asp Tyr Pro Leu Ile Tyr Glu Ile Ile Phe Trp Glu Asn Thr Ser  
  
 AAT GGT GAG AGA AAA ATT ATC GAG AAA AAA ACT GAT GTT ACA GTT CCT AAT TTG  
 Asn Ala Gln Arg Lys Ile Ile Glu Lys Lys Thr Asp Val Thr Val Pro Asn Leu  
  
 AAA CCA CTG ACT GTA TAT TGT GTC AAA GCC AGA GCA CAC ACC ATG GAT GAA AAC  
 Lys Pro Leu Thr Val Tyr Cys Val Lys Ala Arg Ala His Thr Met Asp Glu Lys  
  
 CTC AAT AAA AGC AGT GTT TTT AGT GAC GGT GTA TGT CAG AAA ACA AAA CCA GGA  
 Leu Asn Lys Ser Ser Val Phe Ser Asp Ala Val Cys Glu Lys Thr Lys Pro Gly  
  
 AAT ACC TCT AAA ATT TGG CTT ATA GTT GGA ATT TGT ATT GCA TTA TTT GGT CTC  
 Asn Thr Ser Lys Ile Trp Leu Ile Val Gly Ile Cys Ile Ala Leu Phe Ala Leu  
  
 CCG TTT GTC ATT TAT GGT GCG AAA GTC TTC TTG AGA TGC ATC AAT TAT GTC TTC  
 Pro Phe Val Ile Tyr Ala Ala Lys Val Phe Leu Arg Cys Ile Asn Tyr Val Phe  
  
 TTT CCA TCA CTT AAA COT TCT TCC AGT ATA GAT GAC TAT TTC TCT GAA CAG CCA  
 Phe Pro Ser Leu Lys Pro Ser Ser Ile Asp Gln Tyr Phe Ser Glu Gln Pro  
  
 TTG AAG AAT CTT CTG CTT TCA ACT TCT CAG GAA CAA ATC GAA AAA TGT TTC ATA  
 Leu Lys Asn Leu Leu Leu Ser Thr Ser Glu Glu Gln Ile Glu Lys Cys Phe Ile  
  
 ATT GAA AAT ATA AGC ACA ATT GGT ACA GTA GAA GAA ACT AAT CAA ACT GAT GAA  
 Ile Glu Asn Ile Ser Thr Ile Ala Thr Val Glu Glu Thr Asn Gln Thr Asp Glu  
  
 GAT CAT AAA AAA TAC AGT TCC CAA ACT ACC CAA GAT TCA GGA AAT TAT TCT AAT  
 Asp His Lys Lys Tyr Ser Ser Gln Thr Ser Gln Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Asn  
  
 GAA GAT GAA AGC GAA AGT AAA ACA ACT GAA GAA CTA CAG CAG GAC TTT GTA TGA  
 Glu Asp Glu Ser Glu Ser Lys Thr Ser Glu Glu Leu Gln Gln Asp Phe Val  
  
 CCGAATGCAACTGTCTCAAGTATACCTTTTTCAGCAGGAGTTACACTGCTACG