

(11) **Número de Publicação:** PT 752248 E

(51) **Classificação Internacional:** (Ed. 6)

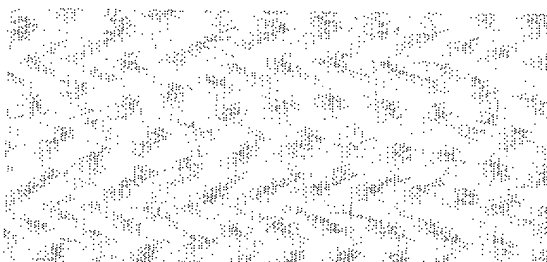
A61K039/395 A A61K051/10 B
C12N015/02 B C12P021/08 B
C07K016/46 B C07K016/28 -

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

(22) Data de depósito: 1993.11.12 (30) Prioridade: 1992.11.13 US 978891 1993.11.03 US 149099 (43) Data de publicação do pedido: 1997.01.08 (45) Data e BPI da concessão: 2000.09.27	(73) Titular(es): IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION 11011 TORREYANA ROAD SAN DIEGO, CA 92121-1104 US (72) Inventor(es): DARRELL R. ANDERSON US WILLIAM H. RASTETTER US JOHN E. LEONARD US NABIL HANNA US ROLAND A. NEWMAN US (74) Mandatário(s): JOSÉ LUÍS FAZENDA ARNAUT DUARTE RUA DO PATROCÍNIO, 94 1350 LISBOA PT
---	--

(54) **Epígrafe:** APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTICORPOS QUIMÉRICOS E MARCADOS RADIOATIVAMENTE CONTRA ANTIGÉNIOS DE DIFERENCIAÇÃO RESTRITA DE LINFÓCITOS B HUMANOS PARA O TRATAMENTO DO LINFOMA DE CÉLULAS B

(57) **Resumo:**



DESCRIÇÃO

"APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTICORPOS QUIMÉRICOS E MARCADOS RADIOACTIVAMENTE, CONTRA ANTIGÉNIOS DE DIFERENCIAÇÃO RESTRITA DE LINFÓCITOS B HUMANOS, PARA O TRATAMENTO DO LINFOMA DE CÉLULAS B"

Uma porção da descrição deste documento de patente contém material que está sujeito à protecção de direitos de autor. O detentor do direito de autor não se opõe à reprodução por ninguém do documento de patente ou descrições da patente, uma vez que esta pode ser encontrada nos ficheiros ou registos de patente do Gabinete de Patentes e Marcas Registadas, mas reserva-se todos e quaisquer direitos de autor.

O presente pedido é um pedido divisional da patente europeia número 0669836.

A presente invenção refere-se à produção de uma preparação combinada para a utilização separada ou sequencial no tratamento de linfomas de célula B num paciente.

O sistema imune dos vertebrados (por exemplo primatas, que incluem humanos, símios, macacos, etc) consiste de um número de órgãos e tipos de células que evoluíram no sentido de reconhecer de forma precisa e específica microorganismos estranhos ("antigénios"), que invadem o hospedeiro vertebrado; se ligam especificamente a estes microorganismos estranhos; e eliminam/destroem estes microorganismos estranhos. Os linfócitos, entre outros, são críticos para o sistema imune. Os linfócitos são produzidos no timo, baço e medula óssea (adulto) e representam cerca de 30% dos glóbulos brancos totais presentes no sistema circulatório de humanos (adultos).

Existem duas sub-populações principais de linfócitos: as células T e as células B. As células T são responsáveis pela imunidade mediada por células, enquanto que as células B são responsáveis pela produção de anticorpos (imunidade humoral). No entanto, as células T e B podem ser consideradas como interdependentes - numa resposta imunitária típica, as células T são activadas quando o receptor da célula T se liga a fragmentos de um antigénio que estão ligados às glicoproteínas do complexo principal de histocompatibilidade ("MHC"), na superfície de uma célula que apresenta antígenos; esta activação origina a libertação de mediadores biológicos ("interleucinas") que, na sua essência, estimulam as células B a diferenciar e produzir anticorpos ("imunoglobulinas") contra o antigénio.

Cada célula B no hospedeiro expressa um anticorpo diferente na sua superfície - assim, uma célula B irá expressar um anticorpo específico para um antigénio, enquanto que outra célula B irá expressar um anticorpo específico para um antigénio diferente. Deste modo, as células B são bastante diversificadas, sendo esta diversidade crítica para o sistema imunitário. Nos humanos, cada célula B pode produzir um número enorme de moléculas de anticorpo (ie cerca de 10^7 a 10^8). Esta produção de anticorpos cessa muitas vezes tipicamente (ou decresce substancialmente), quando o antigénio estranho foi neutralizado. Ocasionalmente, no entanto, a proliferação de uma célula B particular permanecerá, sem diminuir; esta proliferação pode resultar num cancro, designado por "linfoma de células B".

As células T e B compreendem ambas proteínas de superfície celular que podem ser utilizadas como "marcadores" para a diferenciação e identificação. Um destes marcadores de células B humanas é o antigénio de diferenciação restrita de linfócito B humano, Bp35, designado por "CD20". O CD20 é expresso durante o desenvolvimento inicial de células pré-B e permanece até à diferenciação das células plasmáticas. Especificamente,

a molécula de CD20 pode regular um passo no processo de activação necessário para a iniciação do ciclo celular e diferenciação e é geralmente expressa a níveis muito elevados em células B neoplásicas ("tumor"). O CD20, por definição, está presente tanto em células B "normais", como em células B malignas, i.e., as células B cuja proliferação não diminuída pode conduzir a um linfoma de células B. Assim, o antígeno de superfície CD20 tem o potencial de servir como candidato para o "direccionamento" para linfomas de célula B.

No essencial, este direccionamento pode ser generalizado como se segue: os anticorpos específicos para o antígeno de superfície CD20 de células B são, e.g. injectados num paciente. Estes anticorpos CD20 ligam-se especificamente ao antígeno de superfície celular CD20, quer (ostensivamente) de células B normais, quer malignas; o anticorpo anti-CD20 ligado ao antígeno de superfície CD20 pode conduzir à destruição e depleção de células B neoplásicas. Para além disso, os agentes químicos ou marcadores radioactivos com o potencial para destruir o tumor podem ser conjugados com o anticorpo anti-CD20, de modo que o agente é especificamente "fornecido" a, e.g. as células B neoplásicas. Independentemente da aproximação, um objectivo principal é destruir o tumor; a aproximação específica pode ser determinada pelo anticorpo anti-CD20 particular utilizado e, assim, as aproximações disponíveis para direccionamento do antígeno CD20 podem variar consideravelmente.

Por exemplo, foram referidas tentativas deste direccionamento do antígeno de superfície CD20. Foi referido que o anticorpo monoclonal 1F5 de murídeo (ratinho) (um anticorpo anti-CD20) foi administrado por infusão intravenosa contínua a pacientes com linfoma de células B. Foi referido que seriam necessários níveis extremamente elevados (> 2 gramas) de 1F5 para depletar as células de tumor circulantes e os resultados foram descritos como sendo "transientes". Press et al., "Monoclonal antibody 1F5 (anti-CD20) Serotherapy of

Human B-Cell Lymphomas" *Blood* 69/2:584-591 (1987). Um problema potencial com esta aproximação é o de que os anticorpos monoclonais não-humanos (e.g. anticorpos monoclonais de murídeo) tipicamente não possuem uma funcionalidade efectora humana, i.e. não são capazes de, *inter alia*, mediar a lise dependente de complemento ou lisar as células alvo humanas através da toxicidade celular dependente de anticorpos, ou fagocitose mediada por receptor Fc. Para além disso, os anticorpos monoclonais não-humanos podem ser reconhecidos pelo hospedeiro humano como uma proteína estranha; assim, as injeções repetidas destes anticorpos estranhos poderão conduzir à indução de uma resposta imunitária que conduz a reacções de hipersensibilidade prejudiciais. Para os anticorpos monoclonais baseados em murídeo, esta é muitas vezes referida como resposta de anticorpos humanos anti-ratinho, ou resposta "HAMA". Além disso, estes anticorpos "estranhos" podem ser atacados pelo sistema imunitário do hospedeiro, de modo que são, de facto, neutralizados antes de atingirem o seu local alvo.

Os linfócitos e células de linfoma são inerentemente sensíveis à radioterapia por várias razões: a emissão local de radiação ionizante dos anticorpos marcados radioactivamente pode matar células com ou sem o antigénio alvo (e.g. CD20), que se encontram próximas do anticorpo ligado ao antigénio; a radiação penetrante pode obviar o problema do acesso limitado ao anticorpo em tumores volumosos ou fracamente vascularizados; e a quantidade total de anticorpo necessária pode ser reduzida. O radionuclídeo emite partículas radioactivas que podem danificar o ADN celular, até ao ponto em que os mecanismos de reparação celular não conseguem permitir que a célula continue a viver; assim, se as células alvo são tumores, a marcação radioactiva mata com benefício as células de tumor. Os anticorpos marcados radioactivamente, por definição, incluem a utilização de uma substância radioactiva que pode necessitar de precauções, quer para o paciente (ie possível transplante de medula óssea), quer para o clínico (ie

f. L. A.

necessidade de ter o máximo cuidado aquando do trabalho com radioactividade).

Deste modo, uma aproximação para melhorar a capacidade dos anticorpos monoclonais de murídeo serem eficazes no tratamento de desordens das células B tem sido conjugar um marcador radioactivo ou toxina ao anticorpo, de modo que o marcador ou toxina se localiza no local do tumor. Por exemplo, o anticorpo 1F5 acima referido, tem sido "marcado" com iodo-131 (^{131}I) e está descrito que foi analisado quanto à biodistribuição, em dois pacientes. Veja-se Eary, J.F. et al., "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" *J Nuc. Med.* 31/8: 1257-1268 (1990), veja-se também 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) (indicação de que um paciente tratado 1F5 marcado com ^{131}I alcançou uma "resposta parcial"); Goldenberg, D.M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-labeled LL2 Monoclonal antibody" *J. Clin. Onc.* 9/4:548-564 (1991) (foi referido que três de entre oito pacientes que receberam injeções múltiplas desenvolveram uma resposta HAMA); Appelbaum, F.R. "Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" *Hem/Onc. Clinics of N.A.* 5/5:1013-1025 (1991) (artigo de revisão); Press, O.W. et al. "Radiolabeled-antibody therapy of B-cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support". *New England Journal of Medicine* 329/17:1219-12223 (1993) (anticorpo anti-CD20 IF5 e B1 marcado com iodo-131); e Kaminski, M.G. et al. "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with [^{131}I]anti-B1 (anti-CD20) antibody". *NEJM* 329/7 (1993) (anticorpo B1 anti-CD20 marcado com iodo-131; daqui para a frente "Kaminski").

As toxinas (i.e. agentes quimioterapêuticos como a doxorubicina ou mitomicina C) também foram conjugados com anticorpos. Veja-se, por exemplo, pedido PCT publicado WO 92/07466 (publicado em 14 de Maio, 1992).

Os anticorpos "quiméricos", i.e. anticorpos que compreendem porções de duas ou mais espécies diferentes (e.g., ratinho e humano) foram desenvolvidos como uma alternativa aos anticorpos "conjugados". Por exemplo, Liu, a.Y. et al., "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biological Activity" *J. Immun.* 139/10:3521-3526 (1987), descreve um anticorpo quimérico ratinho/humano direccionado contra o antigénio CD20. Veja-se também, publicação PCT No. WO 88/04936. No entanto, não é fornecida nenhuma informação sobre a capacidade, eficácia ou praticabilidade da utilização destes anticorpos quiméricos para o tratamento de desordens da célula B, na referência. Deve notar-se que os testes funcionais *in vitro* (e.g. lise dependente de complemento ("CDC"); citotoxicidade celular dependente de anticorpo ("ADCC"), etc.) não podem prever inerentemente a capacidade *in vivo* de um anticorpo quimérico destruir ou depletar as células alvo que expressam o antigénio específico. Veja-se, por exemplo, Robinson, R.D. et al., "Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities", *Hum. Antibod. Hybridomas* 2:84-93 (1991) (os anticorpos quiméricos ratinho-humano com actividade ADCC não detectável). Assim, a eficácia terapêutica potencial do anticorpo quimérico apenas pode ser verdadeiramente determinada por experimentação *in vivo*.

O que é necessário, e isso representaria um grande avanço na arte, são aproximações terapêuticas que direccionem o antigénio CD20 para o tratamento de linfomas de célula B em primatas, incluindo, mas não se limitando, a humanos.

Descrevem-se aqui métodos terapêuticos concebidos para o tratamento de desordens de células B e em particular, linfomas de células B. Estes protocolos baseiam-se na administração de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos para a depleção de células B do sangue periférico, incluindo células B associadas com linfoma; administração de anticorpos anti-CD20 marcados radioactivamente para o direccionamento de

tumores associados com células B, localizados e periféricos; e administração de anticorpos quiméricos anti-CD20, que são anticorpos anti-CD20 marcados radioactivamente numa estratégia terapêutica cooperativa.

Em resumo, a presente invenção proporciona a utilização de um anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo num humano, em que o referido anticorpo anti-CD20 quimérico é derivado a partir de um transfectoma que compreende anti-CD20 em TCAE 8, depositado na American Type Culture Collection com o número de depósito da ATCC 69119 e um anticorpo anti-CD20 marcado radioactivamente no referido humano, para a produção de uma preparação combinada, para uso separado ou sequencial no tratamento do linfoma de células B num paciente.

A presente invenção proporciona também um transfectoma que compreende uma célula hospedeira, incluindo um ADN plasmídeo que é depositado na American Type Culture Collection com o número de depósito da ATCC 69119, plasmídeo este que compreende ADN que codifica para TCAE 8 anti-CD20.

Além disso, a presente invenção proporciona um método para a produção de um anticorpo anti-CD20 quimérico, que compreende:

(a) transfectar uma linha de célula hospedeira com ADN plasmídeo que está depositado na American Type Culture Collection com o número de depósito da ATCC 69119, plasmídeo esse que compreende ADN que codifica para anti-CD20 TCAE 8, para produzir um transfectoma;

(b) cultura do transfectoma do passo (a) sob condições que permitam a produção do anticorpo quimérico anti-CD20; e

(c) recolha do anticorpo quimérico anti-CD20.

A presente invenção será descrita em maior pormenor com referência às figuras anexas, em que:

A Figura 1 é uma representação diagramática de um vector de expressão de um anticorpo quimérico em sequência ("tandem"), útil na produção de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos ("TCAE 8");

As figuras 2A a 2E são a sequência de ácidos nucleicos do vector da Figura 1;

As Figuras 3A a 3F são a sequência de ácidos nucleicos do vector da 'figura 1, compreendendo ainda as regiões variáveis da cadeia leve e pesada de murídeo ("anti-CD20 em TCAE 8");

A Figura 4 são as sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos (incluindo as regiões CDR e as regiões de sequência ("framework") da região variável da cadeia leve de murídeo do anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, 2B8;

A Figura 5 são as sequências de ácidos nucleicos e aminoácidos (incluindo as regiões CDR e as regiões de sequência) da região variável da cadeia pesada de murídeo, do anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, 2B8;

A Figura 6 são resultados de citometria de fluxo que evidenciam a ligação do Clq humano marcado com fluorescência ao anticorpo anti-CD20 quimérico, incluindo como controlos, Clq marcado,; Clq marcado e anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, 2B8; e Clq marcado e IgG1,k humano;

A Figura 7 representa os resultados da lise relacionada com o complemento, comparando o anticorpo anti-CD20 quimérico e o anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, 2B8;

f l A

A Figura 8 representa os resultados da citotoxicidade celular mediada por anticorpo com células efectoras humanas *in vivo*, comparando o anticorpo anti-CD20 quimérico e 2B8;

A Figura 9A, 9B e 9C mostra os resultados da depleção de linfócitos B de sangue periférico de primata, não humano após infusão de 0,4 mg/kg (A); 1,6 mg/kg (B); e 6,4 mg/kg (C) de anticorpo anti-CD20 quimérico, imunologicamente activo;

A Figura 10 mostra os resultados, *inter alia*, da depleção de linfócitos B do sangue periférico de primatas, não humanos após infusão de 0,01 mg/kg de anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo;

A Figura 11 mostra os resultados do impacto tumoricida de Y2B8 num modelo de ratinho com enxerto, utilizando um tumor linfoblástico de células B;

A Figura 12 mostra os resultados do impacto tumoricida do C2B8 num modelo de ratinho com enxerto, utilizando um tumor linfoblástico de células B, e

A Figura 13 mostra os resultados do impacto tumoricida de uma combinação de Y2B8 e C2B8 num modelo de ratinho com enxerto, utilizando um tumor linfoblástico de células B; e

As figura 14A e 14B proporcionam resultados de uma análise clínica de fase I/II de C2B8, evidenciando depleção da população de células B ao longo do tempo, para pacientes que evidenciam uma remissão parcial da doença (14A) e uma remissão menor da doença (14B).

Em geral, os anticorpos são compostos por duas cadeias leves e duas moléculas de cadeia pesada; estas cadeias têm a forma geral de um "Y", formando ambas as cadeias leves e pesadas os braços do Y e formando as cadeias pesadas a base do Y. As cadeias leves e pesadas estão divididas em domínios de

f L A

homologia estrutural e funcional. Os domínios variáveis de ambas as cadeias leve ("V_L") e pesada ("V_H") determinam o reconhecimento e especificidade. Os domínios de região constante das cadeias leve ("C_L") e pesada ("C_H") conferem propriedades biológicas importantes, eg associação de cadeias de anticorpo, secreção, mobilidade transplacentária, ligação do receptor Fc, ligação do complemento, etc. A série de acontecimentos que conduzem à expressão de genes de imunoglobulinas nas células que produzem anticorpos é complexa. As sequências de genes da região de domínio variável estão localizadas em segmentos de gene de linhas germinativas separadas, referidas como "V_H", "D" e "J_H" ou "V_L" e "J_L". Estes segmentos de gene são ligados por rearranjos de ADN, para formar as regiões V completas, expressas em cadeias pesadas e leves, respectivamente. Os segmentos V ligados, rearranjados (V_L-J_L e V_H-DJ_H) codificam então as regiões variáveis completas ou os domínios de ligação a antigénio das cadeias leve e pesada, respectivamente.

A seroterapia de linfomas de células B humana utilizando um anticorpo monoclonal de murídeo anti-CD20 (1F5) foi descrita por Press et al. (69 *Blood* 584, 1987, *supra*); as respostas terapêuticas descritas eram, infelizmente, transientes. Adicionalmente, 25% dos pacientes testados desenvolveram uma resposta de anticorpos humanos anti-ratinho (HAMA) à seroterapia. Press et al. sugerem que estes anticorpos conjugados com toxinas ou radioisótopos, poderão permitir um benefício clínico mais duradouro do que o anticorpo conjugado. Devido aos efeitos debilitantes do linfoma de células B e à necessidade bem real de proporcionar aproximações de tratamento viáveis para esta doença, os requerentes desenvolveram diferentes aproximações, tendo um anticorpo particular, 2B8, como elo comum entre as aproximações. Esta aproximação explora com vantagem a capacidade dos sistemas de mamífero recuperarem de forma rápida e eficiente as células B de sangue periférico; utilizando esta aproximação, os requerentes pretendem, na

f. L. A.

essência, purgar ou depletar o sangue periférico e tecido linfático de células B, como um meio de remover também os linfomas de células B. Os requerentes conseguiram isso por utilização, *inter alia*, de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos. Noutra aproximação, os requerentes tentam tornar as células de tumor alvos para a destruição, com marcadores radioactivos.

Tal como aqui utilizado, o termo "anticorpo anti-CD20" é um anticorpo que reconhece especificamente uma fosfoproteína não glicosilada de superfície celular, de 35.000 Daltons, designada tipicamente por antigénio Bp35 de diferenciação restrita de linfócitos B humanos, referida usualmente por CD20. Tal como aqui utilizado, o termo "quimérico" quando utilizado em referência aos anticorpos anti-CD20, inclui anticorpos que são mais preferencialmente derivados utilizando técnicas recombinantes de ácido desoxiribonucleico e que compreendem tanto componentes humanos (incluindo espécies imunologicamente "relacionadas", e.g., chimpanzé) como não humanos: a região constante do anticorpo quimérico é muito preferencialmente, substancialmente idêntica à região constante de um anticorpo humano natural; a região variável do anticorpo quimérico é muito preferencialmente derivada a partir de uma fonte não humana e tem a especificidade antigénica desejada para o antigénio de superfície celular CD20. A fonte não humana pode ser qualquer fonte de vertebrado que pode ser utilizada para produzir anticorpos contra um antigénio de superfície celular CD20 humano, ou material que compreende um antigénio de superfície de células CD20 humanas. Esta fonte não humana inclui, mas não se limita a, roedores (eg, coelho, rato, ratinho, etc.) e primatas não humanos (eg macaco do velho mundo, símios, etc.). Mais preferencialmente, o componente não humano (região variável) é derivado a partir de uma fonte de murídeo. Tal como aqui utilizada, a frase "imunologicamente activo" quando utilizada em referência a anticorpos anti-CD20 quiméricos, significa um anticorpo quimérico que se liga a C1q humano e medeia a lise dependente

f. L. A.

do complemento ("CDC") de linhas celulares linfóides B, humanas, e lisa as células alvo humanas através da citotoxicidade celular dependente de anticorpos ("ADCC"). Tal como aqui utilizadas, as frases "marcação indirecta" e "aproximação por marcação indirecta" significam ambas que o agente quelante está ligado de forma covalente a um anticorpo e que pelo menos um radionuclido é inserido no agente quelante. Os agentes quelantes e radionuclidos preferidos são descritos em Srivagtava, S.C. e Mease, R.C. "Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies", *Nucl. Med. Bio* 18/6: 589-603 (1991) ("Srivagtava") que é aqui incorporado para referência. Um agente quelante particularmente preferido é o ácido 1-isotiocicmatobenzil-3-metildioteleto triaminapentacético ("MX-DTPA"); os radionuclidos particularmente preferidos para a marcação indirecta incluem índio [111] e ítrio [90]. Tal como aqui utilizadas, as frases "marcação directa" e "aproximação de marcação directa" significam ambas que um radionuclido está ligado de forma covalente directamente a um anticorpo (tipicamente através de um resíduo de aminoácido). Os radionuclidos preferidos são fornecidos em Srivagtava; um radionuclido particularmente preferido para a marcação directa é o iodo [131] ligado de forma covalente através de resíduos de tirosina. A aproximação por marcação indirecta é particularmente preferida.

As aproximações terapêuticas aqui descritas baseiam-se na capacidade do sistema imune dos primatas recuperar rapidamente, ou rejuvenescer, as células B de sangue periférico. Adicionalmente, uma vez que a resposta imune principal dos primatas é desencadeada pelas células T, quando o sistema imune tem uma deficiência nas células B do sangue periférico, não são necessárias precauções "extraordinárias" (i.e. isolamento do paciente, etc.). Como resultado desta e outras "nuances" dos sistemas imunes dos primatas, a aproximação terapêutica dos requerentes em relação a desordens de células B permite purgar células B do sangue periférico,

f L A

utilizando anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos.

Uma vez que as desordens de células B de sangue periférico, por definição, podem indicar a necessidade de acesso ao sangue para o tratamento, a via de administração dos anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos e anticorpos anti-CD20 marcados radioactivamente é de preferência parentérica; tal como aqui utilizado, o termo "parentérico" inclui administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, rectal, vaginal ou intraperitoneal. De entre estas, a administração intravenosa é a mais preferida.

Os anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos e os anticorpos anti-CD20 marcados radioactivamente serão tipicamente proporcionados por técnicas convencionais num tampão farmacêuticamente aceitável, por exemplo, solução salina estéril, água tamponada estéril, propilenoglicol, combinações dos anteriores, etc. Os métodos para a preparação de agentes administráveis parentericamente são descritos em *Pharmaceutical Carriers & Formulations*, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Ed. (Mack Pub. Co., Easton, PA, 1975), que é aqui incorporada para referência.

A quantidade específica, terapeuticamente eficaz de anticorpos anti-CD20 quiméricos, imunologicamente activos, úteis para produzir um único efeito terapêutico em qualquer paciente pode ser determinada por técnicas convencionais bem conhecidas dos peritos na arte.

As dosagens eficazes (ie quantidades terapeuticamente eficazes) de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos varia de 0,001 a cerca de 30 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente de cerca de 0,01 a cerca de 25 mg/kg de peso corporal e mais preferencialmente, de cerca de 0,4 a cerca de 20,0 mg/kg de peso corporal. São viáveis outras dosagens; os factores que influenciam as dosagens incluem, mas não se limitam, à gravidade da doença; aproximações de

f. L. A.

tratamento anteriores; saúde geral do paciente; outras doenças presentes, etc. O perito na arte está facilmente habilitado para avaliar um paciente e determinar uma dosagem adequada que esteja dentro dos limites, ou se necessário fora destes.

A introdução dos anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos nestas gamas de dosagem pode ser realizada como um único tratamento, ou ao longo de uma série de tratamentos. No que se refere aos anticorpos quiméricos, é preferido que essa introdução seja realizada ao longo de uma série de tratamentos, sendo esta aproximação preferida baseada na metodologia de tratamento associada a esta doença. Embora não pretendendo estar cingido a qualquer teoria particular, uma vez que os anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos são ao mesmo tempo imunologicamente activos e se ligam a CD20, após a introdução inicial dos anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos ao indivíduo, terá início a depleção de células B do sangue periférico; os requerentes observaram uma depleção quase completa em 24 horas após a infusão de tratamento. Devido a isto, a introdução subsequente de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos (ou anticorpos anti-CD20 marcados com radioactivos) no paciente irá presumivelmente: a) eliminar as células B de sangue periférico remanescentes; b) começar a depleção de células B a partir dos nódulos linfáticos; c) começar a depleção de células B a partir de outras fontes de tecido, e.g. medula óssea, tumor, etc. Mais uma vez, utilizando introduções repetidas de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos, ocorre uma série de acontecimentos, sendo cada um visto como importante para o tratamento eficaz da doença. O primeiro "acontecimento" pode ser então visto como essencialmente direccionado para a depleção substancial das células B de sangue periférico do paciente; os "acontecimentos" subsequentes podem ser vistos quer como essencialmente direccionados para eliminar simultaneamente ou em série as células B remanescentes do

f L A

sistema, eliminar as células B de nódulos linfáticos ou eliminar outras células B de tecidos.

De facto, enquanto que uma única dosagem proporciona benefícios e pode ser eficazmente utilizada para o tratamento/controlo da doença, uma via de tratamento preferida pode ocorrer em várias fases; mais preferencialmente, introduzem-se no paciente entre cerca de 0,4 e cerca de 20 mg/kg de peso corporal dos anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos, uma vez por semana, durante cerca de 2 a 10 semanas, mais preferencialmente durante cerca de 4 semanas.

No que se refere à utilização de anticorpos anti-CD20 marcados radioactivamente, é preferido que o anticorpo seja não quimérico; esta preferência baseia-se na semi-vida de circulação significativamente maior dos anticorpos quiméricos, comparativamente aos anticorpos de murídeo (i.e. com uma semi-vida mais longa, o radionuclido está presente no paciente por períodos alongados). No entanto, os anticorpos quiméricos marcados radioactivamente podem ser utilizados com benefício com dosagens de mili-Curies ("mCi") inferiores, utilizados em conjunção com o anticorpo quimérico relativamente ao anticorpo de murídeo. Este cenário permite um decréscimo da toxicidade na medula óssea para um nível aceitável, mantendo ao mesmo tempo uma utilidade terapêutica.

Podem-se aplicar na presente invenção uma variedade de radionuclidos e os peritos na arte estão habilitados para determinar facilmente qual o radionuclido mais adequado, sob uma variedade de circunstâncias. Por exemplo, o iodo [131] é um radionuclido bem conhecido, utilizado para imunoterapia por direccionamento para um alvo. No entanto, a utilidade clínica do iodo [131] pode ser limitada por vários factores, incluindo: semi-vida física de oito dias; deshalogenação do anticorpo iodado, quer no sangue, quer em locais de tumor; e características de emissão (e.g. componente gama grande) que poderão ser sub-óptimas para a deposição de doses localizadas

no tumor. Com o aparecimento de agentes quelantes superiores, a oportunidade para ligar grupos quelantes de metais a proteínas tem aumentado as oportunidades de utilizar outros radionuclídeos, como o índio [131] e o ítrio [90]. O ítrio [90] proporciona alguns benefícios para a utilização em aplicações radioimunoterapêuticas: a semi-vida de 64 horas do ítrio [90] é suficientemente longa para permitir a acumulação de anticorpos pelo tumor e, ao contrário e.g. do iodo [131], o ítrio [90] é um emissor beta puro de energia elevada, sem irradiação gama acompanhante no seu decaimento, com um alcance em tecido de 100 a 1000 diâmetros celulares. Para além disso, a quantidade mínima de radiação penetrante permite a administração de anticorpos marcados com ítrio [90], fora do paciente. Além disso, a internalização de anticorpo marcado não é necessária para matar as células e a emissão local da radiação ionizante deverá ser letal para as células de tumor adjacentes que não possuem o antígeno alvo.

Uma limitação não terapêutica do ítrio [90] baseia-se na ausência de uma radiação gama significativa, tornando a imagiologia com este difícil. Para evitar este problema, pode-se utilizar um radionuclídeo para "imagiologia" de diagnóstico, como o índio [111], para determinar a localização e tamanho relativo de um tumor, antes da administração de doses terapêuticas de anti-CD20 marcado com ítrio [90]. O índio [111] é particularmente preferido como radionuclídeo de diagnóstico porque: podem-se administrar com segurança, entre cerca de 1 a cerca de 10 mCi, sem nenhuma toxicidade detectável; e os dados de imagiologia são geralmente predictivos da distribuição subsequente de anticorpos marcados com ítrio [90]. A maioria dos estudos de imagiologia utilizam anticorpo marcado com índio [111] 5 mCi porque esta dose é não só segura, como possui também uma eficácia de imagiologia aumentada, comparada com doses menores, ocorrendo a imagiologia ótima aos três a seis dias após a administração de anticorpo. Veja-se, por exemplo, Murray J.L., 26 *J. Nucl.*

Med. 3328 (1985) e Carraguiillo, J.A. et al., 26 J. Nucl. Med. 67 (1985).

As doses de tratamento único eficazes (i.e. quantidades terapeuticamente eficazes) de anticorpos anti-CD20 marcados com ítrio [90] variam entre cerca de 5 a cerca de 75 mCi, mais preferencialmente entre cerca de 10 a cerca de 40 mCi. As dosagens de tratamento único eficazes não ablativas de medula de anticorpos anti-CD20 marcados com iodo [131] variam entre cerca de 5 e cerca de 70 mCi, mais preferencialmente entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi. As dosagens ablativas de tratamento único eficazes (i.e. poderá ser necessário um transplante autólogo de medula óssea) de anticorpos anti-CD20 marcados com iodo [131] varia entre cerca de 30 e cerca de 600 mCi, mais preferencialmente entre cerca de 50 e menos que cerca de 500 mCi. Juntamente com um anticorpo anti-CD20 quimérico, devido à maior semi-vida de circulação, em relação com anticorpos de murídeo; uma dosagem eficaz, não ablativa de medula, num tratamento único, de anticorpos anti-CD20 quiméricos marcados com iodo [131] varia entre cerca de 5 e cerca de 40 mCi, mais preferencialmente menos que cerca de 30 mCi. Os critérios de imagiologia para, e.g. a marcação com índio [111], são tipicamente inferiores a cerca de 5 mCi.

No que se refere a anticorpos anti-CD20 marcados com radioactivos, a terapia com estes pode também ocorrer utilizando um tratamento de terapia único, ou utilizando tratamentos múltiplos. Devido ao componente de radionuclido, é preferido que antes do tratamento, os hemocitoblastos periféricos ("PSC") ou a medula óssea ("BM") sejam "recolhidos", para pacientes que apresentam uma toxicidade de medula óssea potencialmente fatal, resultante da radiação. A BM ou os PSC são recolhidos utilizando técnicas convencionais e em seguida são purgados e congelados, para possível re-infusão. Adicionalmente, é mais preferido que antes do tratamento seja realizado um estudo de dosimetria de diagnóstico no paciente, utilizando um anticorpo marcado de diagnóstico (e.g. utilizando índio [111]), tendo como um dos

f w A

objectivos assegurar que o anticorpo terapeuticamente marcado (e.g. utilizando ítrio [90]) não se torne desnecessariamente "concentrado" em qualquer órgão ou tecido normal.

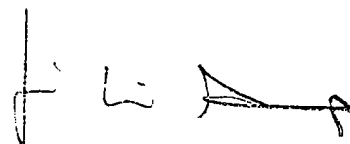
Foram descritos anticorpos ratinho/humano quiméricos. Veja-se por exemplo, Morrison, S.L. et al. *PNAS* II: 6851-6854 (Novembro, 1984); Patente Europeia publicação No 173494; Boulianno, C.L. et al. 312:642 (Dezembro, 1984); Neubeiger, M.S. et al. *Nature* 314:268 (Março, 1985); Patente europeia Publicação No. 125023; Tan et al., *J. Immunol.* 135:8564 (Novembro, 1985); Sun, L.K. et al. *Hybridoma* 5/1:517 (1986); Sahagan et al., *J. Immunol.* 137:1066-1074. Veja-se, genericamente, Muron, *Nature* 312:597 (Dezembro, 1984); Dickson, *Genetic Engineering News* 5/3 (Março, 1985); Marx, *Science* 229 455 (Agosto, 1985); e Morrison *Science* 229:1202-1207 (Setembro, 1985). Robinson et al. na PCT publicação Número WO 88/04936 descrevem um anticorpo quimérico com uma região constante humana e uma região variável de murídeo, com especificidade para um epítopo de CD20; a porção de murídeo do anticorpo quimérico das referências de Robinson é derivado a partir de anticorpo monoclonal de ratinho 2H7 (gama 2b, kapa). Apesar das notas de referência de que o anticorpo quimérico descrito é um "candidato principal" para o tratamento de desordens de células B, esta afirmação pode ser vista como não mais de que uma sugestão para os peritos na arte determinarem se esta sugestão é ou não precisa para este anticorpo particular, particularmente porque a referência não tem quaisquer dados que suportem a determinação da eficácia terapêutica e, de modo significativo, dados que utilizam mamíferos de ordem superior, como os primatas ou humanos.

As metodologias para produzir anticorpos quiméricos estão disponíveis aos peritos na arte. Por exemplo, as cadeias leve e pesada podem ser expressas em separado, utilizando, por exemplo, a cadeia leve da imunoglobulina e a cadeia pesada de imunoglobulina em plasmídeos separados. Estes podem ser purificados e organizados *in vitro* em anticorpos completos; as

f L A

metodologias para alcançar esta organização já foram descritas. Veja-se, por exemplo, Scharff, M. *Harvey Lectures* 69:125 (1974). Também foram descritos os parâmetros reaccionais *in vitro* para a formação de anticorpos IgG a partir das cadeias leve e pesada isoladas, reduzidas. Veja-se, por exemplo, Beychok, S. *Cells of Immunoglobulin Synthesis*, Academic Press, Nova Iorque, p. 69, 1979. A co-expressão das cadeias leve e pesada nas mesmas células para alcançar a associação intracelular e ligação das cadeias leve e pesada em anticorpos IgG H_2L_2 completos é também possível. Esta co-expressão pode ser conseguida utilizando quer o mesmo, quer plasmídeos diferentes na mesma célula hospedeira.

Uma outra aproximação, e que é a aproximação mais preferida dos requerentes, para o desenvolvimento de um anticorpo anti-CD20 quimérico não humano/humano, baseia-se na utilização de um vector de expressão que inclui, *ab initio*, ADN que codifica para as regiões constantes da cadeia pesada e leve a partir de uma fonte humana. Um vector deste tipo permite inserir o ADN que codifica para uma região variável não humana, de modo que se pode produzir, pesquisar e analisar uma variedade de anticorpos anti-CD20 não humanos, quanto a várias características (e.g. tipo de especificidade de ligação, regiões de ligação ao epítipo, etc); podendo em seguida o ADNc que codifica para as regiões variáveis de cadeia leve e pesada de um anticorpo anti-CD20 preferido ou desejado, ser incorporadas no vector. Estes tipos de vectores são designados por vectores de "Tandem Chimeric Antibody Expression" ("TCAE"). Um vector TCAE bastante preferido utilizado para produzir anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos para o tratamento terapêutico de linfomas, é o TCAE 8. O TCAE 8 é derivado de um vector que pertence ao cessionário deste documento de patente, referido como TCAE 5,2, consistindo a diferença em que no TCAE 5,2, o local de iniciação da tradução do marcador seleccionável dominante (neomicina fosfotransferase, "NEO") ser uma sequência Kozak de consenso, enquanto que para o TCAE 8 esta



região é uma sequência Kozak de consenso, parcialmente desemparelhada. Os pormenores referentes ao impacto do local de iniciação do marcador selecionável dominante dos vectores TCAE (também referido como "vector ANEX") em comparação com a expressão de proteína são apresentados em pormenor no pedido co-pendente aqui apresentado.

O TCAE 8 compreende (4) cassetes transcrpcionais e estas estão por ordem sequencial, i.e. uma cadeia leve de imunoglobulina humana ausente uma região variável; uma cadeia pesada de imunoglobulina humana ausente uma região variável; DHFR e NEO. Cada cassete transcricional contém o seu próprio promotor eucariótico e região de poliadenilação (faz-se referência à figura 1, que é uma representação diagramática do vector TCAE 8). Especificamente:

- 1) o promotor/potenciador de CMV em frente da cadeia pesada de imunoglobulina é uma versão truncada do promotor/potenciador em frente da cadeia leve, do local Nhe I a -350, até ao local Sst I a -16 (veja-se 41 Cell 521, 1985)
- 2) derivou-se uma região constante de cadeia leve de imunoglobulina humana através da amplificação de ADNc por uma reacção de PCR. No TCAE 8, esta era a região constante kappa de cadeia leve de imunoglobulina humana (numeração de Kabat, aminoácidos 108-214, alotipo Km 3), (veja-se Kabat, E.A. "Sequences of proteins of immunological interest", publicação NIH, 5ª ed. No. 91-3242, 1991)) e a região constante gama 1 de cadeia pesada de imunoglobulina humana (numeração de Kabat, aminoácidos 114-478, alotipo Gmla, Gmlz). A cadeia leve foi isolada a partir de sangue humano normal (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA); utilizou-se o ARN deste para sintetizar o ADNc que foi em seguida amplificado utilizando técnicas de PCR (os iniciadores de síntese ("primers") foram derivados no contexto do consenso de Kabat). A cadeia pesada foi isolada (utilizando técnicas de PCR) a partir de ADNc preparado a partir de ARN, que foi por sua vez derivado a

f. L. A.

partir de células transfectadas com um vector IgG1 humano (veja-se 3 *Prot. Eng.* 531, 1990; vector pN_Y162). Alteraram-se dois aminoácidos na IgG1 humana isolada, para equiparar com a sequência de aminoácidos de consenso de Kabat, em que: o aminoácido 225 foi alterado de valina para alanina (GTT para GCA) e o aminoácido 287 foi alterado de metionina para lisina (ATG para AAG);

3) As cassetes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana contêm sequências sinal sintéticas para a secreção das cadeias de imunoglobulina;

4) As cassetes de cadeia leve e pesada de imunoglobulina humana contêm locais de restrição de ADN específicos que permitem a inserção de regiões variáveis leves e pesadas de imunoglobulina, que mantêm a sequência de leitura de transição e não alteram os aminoácido normalmente encontrados nas cadeias de imunoglobulina;

5) a cassette DHFR continha o seu próprio promotor eucariótico (promotor principal de betaglobina de ratinho, "BETA") e a região de poliadenilação (poliadenilação da hormona de crescimento bovina, "BGH"); e

6) a cassette NEO continha o seu próprio promotor eucariótico (BETA) e região de poliadenilação (poliadenilação inicial de SV40, "SV")

No que respeita ao vector TCAE 8 e à cassette NEO, a região Kozak era uma sequência Kozak de consenso parcialmente emparelhada (que incluía um local Cla I a montante)

Cla I -3 +1
GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt

(no vector TCAE 5,2 a alteração é entre as regiões ClaI e ATG, para: ccAcc)

f L A

A listagem de sequência completa de TCAE 8 (incluindo os componentes específicos das quatro cassetes transcrpcionais) é apresentada na figura 2 (SEQ ID NO. 1).

Tal como será considerado pelos peritos na arte, os vectores TCAE permitem com benefício a redução substancial do tempo de produção de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos. A produção e isolamento de regiões variáveis de cadeia leve e pesada, não humanas, seguido da sua incorporação numa cassette transcricional de cadeia leve constante humana e cassette transcricional de cadeia pesada constante humana, permite a produção de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos.

Os requerentes derivaram uma região variável não humana preferida com especificidade para o antigénio CD-20, utilizando uma fonte de murídeo e tecnologia de hibridoma. Utilizando técnicas de reacção em cadeia com polimerase ("PCR"), as regiões variáveis leve e pesada de murídeo foram clonadas directamente no vector TCAE 8 - esta é a via mais preferida para a incorporação da região variável não humana no vector TCAE. Esta preferência baseia-se principalmente na eficácia da reacção de PCR e na precisão da inserção. No entanto, estão disponíveis outros processos equivalentes para desempenhar esta tarefa. Por exemplo, utilizando TCAE 8 (ou um vector equivalente), pode-se obter a sequência da região variável de um anticorpo anti-CD20 não humano, seguido de síntese de oligonucleótidos de porções da sequência, ou, se adequado, a sequência total; em seguida, as porções ou a sequência total sintética, pode ser inserida nos locais adequados dentro do vector. Os peritos na arte têm a capacidade de desempenhar esta tarefa.

Os anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos mais preferidos são os derivados da utilização do vector TCAE 8, que inclui as regiões variáveis de murídeo do anticorpo monoclonal contra CD20; este anticorpo (a ser

discutido em pormenor, *infra*) é designado por "2B8". A sequência completa das regiões variáveis obtida a partir de 2B8 em TCAE 8 ("anti-CD20 em TCAE 8) é apresentada na figura 3 (SEQ ID NO 2)

A linha de células hospedeiras utilizada para a expressão de proteína, é, de preferência, de origem mamífera; os peritos na arte têm a capacidade de determinar preferencialmente linhas de células hospedeiras particulares, que são melhor adequadas para que o produto genético adequado seja nelas expresso. Exemplos de linhas celulares hospedeiras incluem, mas não se limitam, a DG44 e DUXB11 (linhas de ovário de Hamster chinês; DHFR menos), HELA (carcinoma cervical humano), CVI (linha de rim de macaco), COS (um derivado de CVI com antigénio T de SV40), R1610 (fibroblastos de Hamster Chinês) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratinho), HAK (linha de rim de Hamster), SP2/O (mieloma de ratinho), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratinho), BFA-lclBPT (células endoteliais de bovino), RAJI (linfócitos humanos) e 293 (rim humano). As linhas de células hospedeiras estão tipicamente disponíveis a partir de serviços comerciais, na American Tissue Culture Collection ou na literatura publicada.

De preferência, a linha celular hospedeira é, ou DG44 ("CHO") ou SP2/O. Veja-se Urland, G. *et al.* "Effect of gamma rays and the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions". *Som. Cell & Mol. Gen.* 12/6:555-566 (1986) e Shulman, M. *et al.*, "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies". *Nature* 276:269 (1978), respectivamente. Mais preferencialmente, a linha celular hospedeira é DG44. A transfecção do plasmídeo na célula hospedeira pode ser realizada por qualquer técnica disponível na arte. Estas incluem, mas não limitam a, transfecção (incluindo electroforese e electroporação), fusão celular com ADN em envelope, microinjecção e infecção com vírus intacto. Veja-se Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors" Capítulo 24.2, pp. 470.472 *Vectors*, Rodriguez e Denhardt, Eds.

f L A

(Butterworths, Boston, MA 1988). Mais preferencialmente, a introdução do plasmídeo no hospedeiro é feita por electroporação.

F. EXEMPLOS

Os exemplos seguintes não pretendem , nem são construídos de modo a limitar a invenção. Os exemplos pretendem evidenciar: imagiologia de dose utilizando um anticorpo anti-CD20 marcado radioactivamente ("I2B8"); anticorpo anti-CD20 marcado radioactivamente ("Y2B8"); um anticorpo anti-CD20 quimérico, imunologicamente activo ("C2B8") derivado utilizando um vector específico ("TCAE 8") e regiões variáveis derivadas a partir de anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo ("2B8").

I. ANTICORPO ANTI-CD20 MARCADO RADIOACTIVAMENTE, 2B8

A. Produção de anticorpo monoclonal anti-CD20 (de murídeo) ("2B8")

Os ratos BALB/C foram repetidamente imunizados com a linha celular linfoblastóide humana SB (veja-se 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); esta linha celular está disponível na American Tissue Culture Collection, Rockville, MD, com o número de acesso da ATCC ATCC CCL 120), com injeções semanais durante um período de 3-4 meses. Identificaram-se os ratinhos que apresentavam títulos séricos elevados de anticorpos anti-CD20, tal como determinado pela inibição de anticorpos anti-CD20 conhecidos (os anticorpos anti-CD20 utilizados eram Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA Cat. No. 7670; e B1, Coulter Corp., Hialeah, FL, Cat. No. 6602201); os baços destes ratinhos foram em seguida removidos. Os esplenócitos foram fundidos com o mieloma de ratinho SP2/O, de acordo com o

protocolo descrito em Einfeld, D.A. et al. (1988) *EMBO* 7:711 (O SP2/O tem o número de acesso da ATCC, ATCC CRL 8006).

Os testes para a especificidade de CD20 foram realizados por radioimunoensaio. Em resumo, os anti-CD20 B1 purificados foram marcados radioativamente com I^{125} pelo método da esfera de iodo, tal como descrito em Valentine, M.A. et al. (1989) *J. Biol. chem* 264:11282 (I^{125} iodeto de sódio, ICN, Irvine, CA, Cat. No. 28665H). Os hibridomas foram pesquisados por co-incubação de 0,05 ml de meio de cada um dos poços de fusão, juntamente com 0,05 ml de anti-CD20 B1 marcado com I^{125} (10 ng) em BSA 1%, PBS (pH 7,4) e 0,5 ml do mesmo tampão contendo 100.000 células SB. Após incubação durante 1 h à temperatura ambiente, as células foram recolhidas por transferência para placas de microtítulo de 96 poços (V & P Scientific, San Diego, CA) e muito bem lavadas. Utilizaram-se como controles positivos e negativos, respectivamente, poços duplicados contendo anti-CD20 B1 não marcados e poços não contendo anticorpo inibidor. Os poços que contêm mais que 50% de inibição foram expandidos e clonados. O anticorpo que apresentou a inibição mais elevada foi derivado a partir da linha celular clonada aqui designada por "2B8"

B. Preparação do conjugado 2B8-MX-DTPA

i. MX-DTPA

Utilizou-se ácido 1-isotiocianatobenzil-3-metildietilenotriaminopentacético marcado com carbono 14 ("MX-DTPA marcado com carbono-14") como agente quelante para a conjugação da marcação radioactiva a 2B8. Realizaram-se manipulações do MX-DTPA para manter condições isentas de metais, i.e. utilizaram-se reagentes isentos de metais e, quando possível, utilizaram-se também contentores de plástico polipropileno (frascos, vasos, provetas graduadas, pontas de pipeta) lavados com Alconox e passados por água Milli-Q. O MX-DTPA foi obtido na forma de um sólido seco do Dr. Otto Gansow (National Institute of Health, Bethesda, MD) e armazenado seco

a 4°C (protegido da luz), sendo as soluções mãe preparadas em água Milli-Q a uma concentração de 2-5 mM, com armazenamento a -70°C. O MX-DTPA foi também obtido da Coulter Immunology (Hialeah, florida) na forma de sal dissódico em água e armazenado a -70°C.

ii. Preparação de 2B8

Preparou-se 2B8 purificado por conjugação com MX-DTPA, por transferência do anticorpo para bicina-NaOff 50 mM isento de metal, pH 8,6, contendo NaCl 150 mM, fazendo uma troca repetitiva de tampão com filtros de spin CENTRICON 30™ (30.000D, MWCO; Amicon). Genericamente, adicionaram-se 50-200 µl de proteína (10 mg/nl) à unidade do filtro, seguido de 2 ml de tampão bicina. O filtro foi centrifugado a 4°C num rotor Sorval SS-34 (6.000 rpm, 45 minutos). O volume de retenção era de aproximadamente 50-100 µl; este processo foi repetido duas vezes utilizando o mesmo filtro. O material retido foi transferido para um tubo de polipropileno de 1,5 ml, com rosca, testado quanto a proteínas, diluído para 10,0 mg/ml e armazenado a 4°C até utilização; as proteínas foram igualmente transferidas para citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, contendo NaCl 150 mM e azida de sódio a 0,05%, utilizando o protocolo seguinte.

iii. Conjugação de 2B8 com MX-DTPA

A conjugação de 2B8 com MX-DTPA foi realizada em tubos de polipropileno à temperatura ambiente. As soluções mãe de MX-DTPA congeladas foram descongeladas imediatamente antes de utilização. Fizeram-se reagir 50-200 ml de proteína a 10 mg/ml com MX-DTPA a uma razão molar entre MX-DTPA e 2B8 de 4:1. As reacções foram iniciadas por adição da solução mãe de MX-DTPA e mistura cuidadosa; a conjugação foi deixada prosseguir durante a noite (14 a 20 horas) à temperatura ambiente. O MX-DTPA não reagido foi removido do conjugado por diálise ou ultrafiltração repetitiva, tal como descrito acima no Exemplo I.B.ii, em solução salina normal isenta de metais (0,9 % p/v)

contendo azida de sódio a 0,05%. A concentração de proteínas foi ajustada para 10 mg/ml e armazenada a 4°C num tubo de polipropileno até à marcação radioactiva.

iv. Determinação da incorporação de MX-DTPA

A incorporação de MX-DTPA foi determinada por contagem de cintilação e comparação do valor obtido com o conjugado purificado com a actividade específica do MX-DTPA marcado com carbono-14. Para alguns estudos, em que se utilizou o MX-DTPA radioactivo (Coulter Immunology), a incorporação de MX-DTPA foi determinada por incubação do conjugado com um excesso de uma solução transportadora radioactiva de ítrio-[90], de concentração e actividade específica conhecidas.

Preparou-se uma solução estoque de cloreto de ítrio de concentração conhecida em HCl 0,05 N isento de metais a que se adicionou ítrio-[90] isento de transportador (sal cloreto). Analisou-se uma alíquota desta solução por contagem de cintilação líquida, para determinar uma actividade específica precisa para este reagente. Adicionou-se a um tubo de polipropileno um volume do reagente cloreto de ítrio igual a 3 vezes o número de moles de quelato que se espera estar ligado ao anticorpo (tipicamente 2 mol/mol anticorpo) e ajustou-se o pH para 4,0-4,5 com acetato de sódio 2M. O anticorpo conjugado foi subsequentemente adicionado e a mistura foi incubada durante 15-30 minutos à temperatura ambiente. A reacção foi interrompida por adição de EDTA 20 mM a uma concentração final de 1 mM e o pH da solução foi ajustado para aproximadamente pH 6, com acetato de sódio 2M.

Após 5 min de incubação, o volume total foi purificado por cromatografia de alta eficiência de crivo molecular (descrito *infra*). As fracções eluídas contendo proteína foram combinadas, a concentração de proteína foi determinada e testou-se uma alíquota quanto à radioactividade. A incorporação de quelato foi calculada utilizando a actividade

específica da preparação de cloreto de ítrio-[90] e a concentração de proteína.

v. Imunoreactividade do 2B8-MX-DTPA

A imunoreactividade do 2B8 conjugado foi testada utilizando ELISA de células totais. As células SB em fase Mid-log foram recolhidas da cultura por centrifugação e lavadas duas vezes com 1X HBSS. As células foram diluídas para $1-2 \times 10^6$ célula/ml em HBSS e separadas em alíquotas em placas de microtítulo de poliestireno de 96 poços a 50.000-100.000 células/poço. As placas foram secas sob vácuo durante 2 h a 40-45°C para fixar as células ao plástico; as placas foram armazenadas secas a -20°C até serem utilizadas. Para teste, as placas foram aquecidas à temperatura ambiente imediatamente antes da utilização, em seguida foram bloqueadas com 1x PBS, pH 7,2-7,4 contendo BSA a 1% (2h). As amostras para teste foram diluídas em 1X PBS/BSA a 1%, aplicadas a placas e diluídas em série (1:2), no mesmo tampão. Após incubação das placas durante 1 h à temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com 1X PBS. Adicionou-se anticorpo secundário (conjugado HRP específico de IgG1 de cabra anti-ratinho, 50 µl) aos poços (diluição 1:1500 em 1X PBS/BSA a 1%) e incubou-se 1h à temperatura ambiente. As placas foram lavadas quatro vezes com 1X PBS, seguido da adição da solução de substrato ABTS (citrato de sódio 50 mM, pH 4,5 contendo ATBS 0,01% e H₂O₂ 0,001%). As placas foram lidas a 405 nm após 15-30 min de incubação. Incluíram-se células HSB negativas para antígeno nos testes, para monitorizar a ligação não específica. A imunoreactividade do conjugado foi calculada através do gráfico dos valores de absorvância vs. o respectivo factor de diluição e comparação destes valores com os valores obtidos utilizando anticorpo nativo (que representa 100% de imunoreactividade), testado na mesma placa; compararam-se alguns valores na porção linear do perfil de titulação e determinou-se o valor médio (dados não apresentados).

f. L. A.

vi. Preparação de 2B8-MX-DTPA ("I2B8") marcado com índio-[111]

Os conjugados foram marcados radioactivamente com índio-[111] isento de transportador. Transferiu-se uma alíquota do isótopo (0,1-2 mCi/mg de anticorpo) em HCl 0,05 M para um tubo de polipropileno e adicionou-se aproximadamente um décimo de volume de HCl 2M isento de metais. Após incubação durante 5 min, adicionou-se acetato de sódio 2M isento de metais, para ajustar a solução para pH 4,0-4,4. Adicionaram-se aproximadamente 0,5 mg de 2B8-Mx-DTPA de uma solução mãe de 10,0 mg/ml de DTPA em solução salina normal ou citrato de sódio 50 mM/NaCl 150 mM contendo azida de sódio a 0,05% e a solução foi de imediato misturada com cuidado. O pH da solução foi verificado com papel de pH para verificar um valor de 4,0-4,5 e a mistura foi incubada à temperatura ambiente durante 1 min. Subsequentemente, a reacção foi interrompida por adição de EDTA 20 mM a uma concentração final de 1 mM e a mistura reaccional foi ajustada para aproximadamente pH 6,0, utilizando acetato de sódio 2M.

Após 5-10 min de incubação, removeu-se o radioisótopo não complexado por cromatografia de crivo-molecular. A unidade de HPLC consistia do sistema de fornecimento de solvente Modelo 6000 da Waters ou Modelo TSK-6110 da Toso-Haas, ajustado, respectivamente, com uma válvula de injeção U6K da Waters ou Rheodyne 700. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna de permeação em gel (BioRad SEC-250; 7,5 x 300 mm ou coluna TosoHaas comparável) e uma coluna guarda SEC-250 (7,5 x 100 mm). O sistema foi equipado com um colector de fracções (Pharmacia Frac200) e um monitor UV ajustado com um filtro de 280 nm (Pharmacia modelo UV-1). As amostras foram aplicadas e eluídas isocraticamente utilizando 1X PBS, pH 7,4 a um caudal de 1,0 ml/min. Recolheram-se fracções de meio milímetro em tubos de vidro e contaram-se alíquotas destas num contador gama. As janelas inferior e superior foram ajustada para 100 e 500 KeV, respectivamente.

f L A

A radioincorporação foi calculada somando a radioactividade associada com o pico de proteína eluída e dividindo este número pela radioactividade total eluída da coluna, este valor foi então expreso como uma percentagem (dados não apresentados). Nalguns casos, a radioincorporação foi determinada utilizando cromatografia instantânea em camada fina ("ITLC"). O conjugado marcado radioactivamente foi diluído 1:10 ou 1:20 em 1X PBS contendo ou 1X PBS/DTPA 1mM, em seguida colocou-se 1 µl a 1,5 cm de uma das extremidades de uma tira de papel SG ITLC de 1 x 5 cm. O papel foi desenvolvido por cromatografia ascendente utilizando acetato de amónio a 10% em metanol:água (1:1, v/v). A tira foi seca, cortada a meio de través e a radioactividade associada a cada secção foi determinada por contagem gama. A radioactividade associada com a metade inferior da tira (radioactividade associada à proteína) foi expressa como uma percentagem da radioactividade total, determinada por soma dos valores das metades superior e inferior (dados não apresentados).

As actividades específicas foram determinadas medindo a radioactividade de uma alíquota adequada do conjugado marcado radioactivamente. Este valor foi corrigido para a eficácia do contador (tipicamente 75%) e relacionado com a concentração de proteína do conjugado, previamente determinada por absorvância a 280 nm e o valor resultante foi expreso como mCi/mg de proteína.

Para algumas experiências, o 2B8-MX-DTPA foi marcado radioactivamente com índio [111], seguindo um protocolo semelhante ao descrito acima, mas sem purificação por HPLC, este foi referido como protocolo "mix-and-shoot".

vii Preparação de 2B8-MX-DTPA marcado com ítrio-[90] ("Y2B8")

Seguiu-se o mesmo protocolo descrito para a preparação de I2B8, para a preparação do conjugado 2B8-MX-DTPA marcado com

f. l. A

ítrio-[90] ("Y2B8"), excepto que não se utilizaram 2 ng de HCl; todas as preparações de conjugados marcados com ítrio foram purificadas por cromatografia de crivo molecular, como descrito acima.

C. Estudos com animais não humanos

i. Biodistribuição de 2B8-MX-DTPA marcado radioactivamente

O I2B8 foi avaliado quanto à biodistribuição nos tecidos em ratinhos BALB/c de seis a oito semanas de idade. O conjugado marcado radioactivamente foi preparado utilizando 2B8-MX-DTPA de grau clínico seguindo o protocolo "mix-and-shoot" acima descrito. A actividade específica do conjugado era de 2,3 mCi/mg e o conjugado foi formulado em PBS, pH 7,4 contendo HSA 50 mg/ml. Os ratos foram injectados intravenosamente com 100 µl de I2B8 (aproximadamente 21 µCi) e sacrificaram-se grupos de três ratinhos por deslocamento cervical a 0, 24, 48 e 72 horas. Após o sacrifício, a cauda, coração, pulmões, fígado, rim, baço, músculo e fémur, foram removidos, lavados e pesados; removeu-se também uma amostra de sangue para análise. A radioactividade associada com cada espécimen foi determinada por contagem gama e a percentagem de dose injectada por grama de tecido foi subsequentemente determinada. Não foi feita nenhuma tentativa para descontar a contribuição da actividade representada pelo sangue associado a órgãos individuais.

Num protocolo separado, marcaram-se radioactivamente alíquotas de 2B8-MX-DTPA incubadas a 4 °C e 30 °C durante 10 semanas com índio-[111], a uma actividade específica de 2,1 mCi/mg, para ambas as preparações. Estes conjugados foram então utilizados em estudos de biodistribuição em ratinhos, como acima descrito.

Para determinações de dosimetria, o 2B8-Mx-DTPA foi marcado radioactivamente com índio-[111] a uma actividade específica de 2,3 mCi/mg e injectou-se aproximadamente 1,1 µCi

f. l. A

em cada um de 20 ratinhos BALB/c. Subsequentemente, sacrificaram-se grupos de 5 ratinhos às 1, 24, 48 e 72 horas e os seus órgãos foram removidos e preparados para análise. Além disso, removeram-se porções de pele, músculo e osso e estas foram processadas para análise; a urina e fezes foram também recolhidas e analisadas para os pontos de tempo de 24-72 horas.

Utilizando uma aproximação semelhante, o 2B8-MX-DTPA foi também marcado radioactivamente com ítrio-[90] e a sua distribuição biológica foi avaliada em ratinhos BALB/c, durante um período de tempo de 72 horas. Após purificação por cromatografia HPLC de crivo molecular, injectaram-se quatro grupos de cinco ratinhos cada intravenosamente com aproximadamente 1 μ Ci do conjugado formulado clinicamente (actividade específica: 12,2 mCi/mg); os grupos foram subsequentemente sacrificados a 1, 24, 48 e 72 horas e os seus órgãos e tecidos foram analisados como acima descrito. A radioactividade associada com cada espécimen de tecido foi determinada por medição da energia de "bremstrahlung" com um contador de cintilação gama. Os valores de actividade foram subsequentemente expressos como uma percentagem de dose injectada por grama de tecido ou percentagem de dose injectada por órgão. Apesar de os órgãos e outros tecidos terem sido lavados repetidamente para remover o sangue superficial, os órgãos não foram perfusados. Assim, nos valores de actividade dos órgãos não se descontou a contribuição da actividade representada pelo sangue associado internamente.

ii. Localização tumoral de I2B8

A localização de 2B8-MX-DTPA marcado radioactivamente foi determinada em ratinhos atímicos com tumores de célula B Ramos. Injectaram-se subcutaneamente ratinhos atímicos de seis a oito semanas de idade (flanco traseiro esquerdo) com 0,1 ml de RPMI-1640 contendo $1,2 \times 10^7$ células de tumor Ramos, que foram previamente adaptadas para crescimento em ratinhos atímicos. Os tumores surgiram dentro de duas semanas e tinham,

em peso, entre 0,07 a 1,1 gramas. Injectaram-se os ratinhos intravenosamente com 100 μ l de 2B8-MX-DTPA marcado com índio [111] (16,7 μ ci) e sacrificaram-se grupos de três ratinhos por deslocamento cervical a 0, 24, 48 e 72 horas. Após o sacrifício, a cauda, coração, pulmões, fígado, rim, baço, músculo, fêmur e tumor foram removidos, lavados, pesados; removeu-se também uma amostra de sangue para análise. A radioactividade associada com cada espécimen foi determinada por contagem gama e determinou-se a percentagem de dose injectada por grama de tecido.

iii. Estudos de Biodistribuição e localização tumoral com 2B8-MX-DTPA marcado radioactivamente

Seguindo a experiência de biodistribuição preliminar acima descrita (Exemplo I.B. viii.a), o 2B8 conjugado foi marcado radioactivamente com índio-[111], a uma actividade específica de 2,3 mCi/mg e injectaram-se aproximadamente 1,1 μ Ci em cada um de 20 ratinhos BALB/c, para determinar a biodistribuição do material marcado radioactivamente. Subsequentemente, sacrificaram-se grupos de cinco ratinhos cada às 1, 24, 48 e 72 horas e os seus órgãos e uma porção da pele, músculo e osso foi removida e processada para análise. Além disso, recolheram-se a urina e fezes e analisaram-se para os pontos de tempo de 24-72 horas. O nível de radioactividade no sangue caiu de 40,3% da dose injectada por grama a 1 hora, para 18,9% às 72 horas (dados não apresentados). Os valores para o coração, rim, músculo e baço permaneceram na gama de 0,7-9,8% ao longo da experiência. Os níveis de radioactividade encontrados nos pulmões diminuíram de 14,2% a 1 hora, para 7,6% a 72 horas; de modo semelhante, os valores respectivos de dose injectada por grama no fígado, eram 10,3% e 9,9%. Estes dados foram utilizados para determinar as estimativas de radiação absorvida I2B8 a seguir descritas.

A biodistribuição do conjugado marcado com ítrio-[90], com uma actividade específica de 12,2 mCi/mg de anticorpo foi

f L A

avaliada em ratinhos BALB/c. Obtiveram-se radioincorporações >90% e o anticorpo marcado radioactivamente foi purificado por HPLC. A deposição de radioactividade nos tecidos foi avaliada nos órgãos principais e na pele, músculo, osso e urina e fezes após 72 horas e expressa como percentagem da dose injectada/g de tecido. Os resultados (não apresentados) evidenciam que enquanto que os níveis de radioactividade associada com o sangue caíram de aproximadamente 39,2% de dose injectada por grama à 1 hora, para aproximadamente 15,4% após 72 horas, os níveis de radioactividade associados com a cauda, coração, rim, músculo e baço permaneceram praticamente constantes a 10,2% ou menos, ao longo da experiência. De relevância, a radioactividade associada com o osso variou de 4,4% da dose injectada por grama de osso a 1 hora, para 3,2 % às 72 horas. Em conjunto, estes resultados sugerem que estava associado pouco ítrio livre com o conjugado e que foi libertado pouco radiometal livre no decorrer do estudo. Estes dados foram utilizados na determinação de estimativas de doses de radiação absorvida para Y2B7, a seguir descrita.

Para os estudos de localização de tumores, preparou-se o 2B8-MX-DTPA e marcou-se radioactivamente com $^{111}\text{Índio}$ a uma actividade específica de 2,7 mCi/mg. Injectaram-se subsequentemente cem microlitros de conjugado marcado (aproximadamente 24 μCi) em cada um de 12 ratinhos atímicos com tumores de célula B Ramos. Os tumores tinham um peso de 0,1 a 1,0 gramas. Aos pontos de tempo 0, 24, 48 e 72 horas após injeção, removeram-se 50 μl de sangue por punctura retro-orbital, sacrificaram-se os ratinhos por deslocamento cervical e removeu-se a cauda, coração, pulmões, fígado, rins, baço, músculo, fémur e tumor. Após processamento e lavagem dos tecidos, determinou-se a radioactividade associada a cada espécimen de tecido, utilizando um contador gama e expressaram-se os valores como percentagem da dose injectada por grama.

Os resultados (não apresentados) evidenciaram que as concentrações de tumor do $^{111}\text{In-2B8-MX-DTPA}$ aumentaram de forma

constante ao longo da experiência. Treze por cento da dose injectada acumulou-se no tumor após 72 horas. Os níveis sanguíneos, pelo contrário, caíram durante a experiência de mais de 30% no tempo zero, para 13% às 72 horas. Todos os outros tecidos (excepto o músculo) continham entre 1,3 e 6,0% da dose injectada por grama de tecido no final da experiência; o tecido muscular continha aproximadamente 13% da dose injectada por grama.

D. Estudos humanos

i. Estudos imunohistológicos de 2B8 e 2B8-MX-DTPA com tecidos humanos

A reactividade do tecido do anticorpo monoclonal de murídeo 2B8 foi avaliada utilizando um painel de 32 tecidos humanos diferentes, fixados com acetona. O anticorpo 2B8 reage com o antigénio anti-CD20, que tinha um padrão de distribuição de tecido muito restrito, sendo apenas observado num conjunto de células em tecidos linfóides, incluindo os de origem hematopoiética.

No nódulo linfático, observou-se imunoreactividade numa população de linfócitos B corticais maduros, bem como células proliferantes nos centros germinais. Também se observou uma reactividade positiva no sangue periférico, áreas de células-B das amígdalas, polpa branca do baço, encontrando-se 40-70% dos linfócitos medulares no timo. Também se observou uma reactividade positiva nos folículos da lamina propria (pachos de Peyer) do intestino grosso. Por fim, os agregados ou células linfóides dispersas no estroma de vários órgãos, incluindo a vesícula, mama, cervix, esófago, pulmão, parótida, próstata, intestino delgado e estômago, também eram positivos com anticorpo 2B8 (dados não apresentados).

Verificou-se que todas as células epiteliais simples, bem como os epitélios estratificados e epitélios de diferentes órgãos, não eram reactivos. De modo semelhante, não se

f L A

observou nenhuma reactividade com células neuroectodérmicas, incluindo as do cérebro, espinal medula e nervos periféricos. Também se verificou que os elementos do mesênquima, como as células de músculo esquelético e músculo liso, fibroblastos, células endoteliais e células inflamatórias polimorfonucleares eram negativas (dados não apresentados).

A reactividade tecidular do conjugado 2B8-MX-DTPA foi avaliada utilizando um painel de dezasseis tecidos humanos que foram fixados com acetona. Como anteriormente demonstrado com o anticorpo nativo (dados não apresentados), o conjugado 2B8-MX-DTPA reconheceu o antigénio CD20, que exibiu um padrão de distribuição altamente restrito, encontrando-se apenas um subconjunto de células de origem linfóide. No nódulo linfático observou-se uma imunoreactividade na população de células B. Observou-se uma reactividade forte na polpa branca do baço e nos linfócitos medulares do timo. Também se observou imunoreactividade em linfócitos dispersos na vesícula, coração, intestino grosso, fígado, pulmão e útero e esta foi atribuída à presença de células inflamatórias presentes nestes tecidos. Tal como com o anticorpo nativo, não se observou nenhuma reactividade com células neuroectodérmicas, ou com elementos do mesênquima (dados não apresentados).

ii. Análise clínica de I2B8 (Imagiologia) e Y2B8 (Terapia)

a. Ensaio clínico de fase I/II Estudo de terapia com dose única

Está a ser realizada uma análise clínica de fase I/II de I2B8 (imagiologia) seguida de tratamento com uma única dose terapêutica de Y2B8. Para o estudo de dose única, está a seguir-se o seguinte esquema:

1. Recolha de hemocitoblastos periféricos (PSC) ou medula óssea (BM) com purga;
2. Imagiologia com I2B8;

f L A

3. Terapia com Y2B8 (três níveis de dose); e

4. Transplante de PSC ou BM autólogo (se necessário baseado numa contagem absoluta de neutrófilos abaixo de $500/\text{mm}^3$ durante três dias consecutivos, ou plaquetas abaixo de $20.000/\text{mm}^3$ sem evidência de recuperação de medula óssea por avaliação da medula óssea).

Os níveis de dose de Y2B8 são como se segue:

<u>Nível de dose</u>	<u>Dose (mCi)</u>
1.	20
2.	30
3.	40

Deverão tratar-se 3 pacientes para cada nível de dose para determinação de uma dose máxima tolerada ("MTD").

Os estudos de imagiologia (dosimetria) são realizados como se segue: cada paciente é envolvido em dois estudos de biodistribuição *in vivo* utilizando I2B8. No primeiro estudo, administram-se 2 mg de I2B8 (5 mCi) como uma infusão intravenosa (i.v.) durante uma hora, uma semana mais tarde administra-se 2B8 (i.e. anticorpo não conjugado) i.v. a uma taxa não superior a 250 mg/h seguido de imediato por 2 mg de I2B8 (5 mCi), administradas i.v. durante uma hora. Em ambos os estudos, imediatamente a seguir à infusão de I2B8, cada paciente é visualizado e a visualização é repetida a $t = 14-18$ h (se indicado), $t = 24$ h; $t = 72$ h; e $t = 96$ h (se indicado). Os tempos de retenção médios do corpo total para a marcação com índio-[111] são determinados; estas determinações também são feitas para órgãos reconhecíveis ou lesões de tumores ("regiões de interesse"). As regiões de interesse são comparadas com as concentrações de marcador no corpo total ; com base nesta comparação, pode-se determinar uma estimativa da localização e concentração de Y2B8, utilizando protocolos

convencionais. Se a dose cumulativa de Y2B8 estimada é superior a oito(8) vezes a dose corporal total estimada ou se a dose cumulativa estimada para o fígado exceder 1500 cGy, não deverá ser realizado nenhum tratamento com Y2B8.

Se os estudos de imagiologia são aceitáveis, administra-se ou 0,0 ou 1,0 mg/kg de peso corporal do paciente, de 2B8 por infusão i.v. a uma taxa que não deverá exceder 250 mg/h. Isto é seguido por administração de Y2B8 (10, 20 ou 40 mCi) a uma taxa de infusão i.v. de 20 mCi/h.

b. Ensaio clínico de fase I/II: Estudo de terapia com dose múltipla

Está actualmente a ser realizada uma análise clínica de fase I/II de Y2B8. Para o estudo de dose-múltipla, está a seguir-se o seguinte esquema:

1. Recolha de PSC ou BM;
2. Imagiologia com I2B8;
3. Terapia com Y2B8 (três níveis de dose) para quatro doses ou uma dose cumulativa total de 80 mCi; e
4. transplante de PSC ou BM autólogo (baseado na decisão do clínico)

Os níveis de dose de Y2B8 são como se segue:

<u>Nível de dose</u>	<u>Dose (mCi)</u>
1.	10
2.	15
3.	20

Deverão tratar-se três pacientes a cada nível de dose para determinação de um MTD.

Os estudos de imagiologia (dosimetria) são realizados como se segue: Determinar-se-á uma dose de imagiologia preferida

f. L. A.

para o anticorpo não marcado (i.e. 2B8) com os dois primeiros pacientes. Os dois primeiros pacientes irão receber 100 mg de 2B8 não marcado em 250 cc de solução salina normal, durante 4 h, seguido de 0,5 mCi de I2B8 - serão recolhidas amostras de sangue para dados de biodistribuição aos tempos $t = 0$, $t = 10$ min; $t = 120$ min; $t = 24$ h; $t = 48$ h. Os pacientes serão analisados com imagens de câmera gama de múltiplas regiões, aos tempos $t = 2$ h; $t = 24$ h; $t = 48$ h. Após pesquisa a $t = 48$ h, os pacientes irão receber 250 mg de 2B8 como descrito, seguido de 4,5 mCi de I2B8 - seguir-se-ão o sangue e a pesquisa, como descrito. Se 100 mg de 2B8 produzem uma imagiologia superior, então os dois pacientes seguintes irão receber 50 mg de 2B8 como descrito, seguido de 0,5 mCi de I2B8, seguido 48 h mais tarde de 100 mg de 2B8 e em seguida de 4,5 mCi de I2B8. Se 250 mg de 2B8 produzem uma imagiologia superior então os dois pacientes seguintes irão receber 250 mg de 2B8 como descrito, seguido de 0,5 mCi de I2B8, seguido 48 h mais tarde de 500 mg de 2B8 e em seguida de 4,5 mCi de I2B8. Os pacientes subsequentes serão tratados com a menor quantidade de 2B8 que proporciona uma imagiologia óptima. A imagiologia óptima será definida por: (1) melhor imagiologia efectiva com o desaparecimento mais lento de anticorpo; (2) melhor distribuição minimizando a compartimentalização num único órgão; e (3) melhor resolução subjectiva da lesão (comparação tumor/ruído de fundo).

Para os primeiros quatro pacientes, a primeira dose terapêutica de Y2B8 começará 14 dias após a última dose de I2B8; para os pacientes subsequentes, a primeira dose terapêutica de Y2B8 começará entre dois a sete dias após o I2B8.

Antes do tratamento com Y2B8, para os pacientes que não os primeiros quatro, o 2B8 será administrado como descrito, seguido de infusão i.v. de Y2B8 durante 5-10 min. Recolher-se-ão amostras de sangue para biodistribuição aos tempos de $t = 0$, $t = 10$ min; $t = 120$ min; $t = 24$ h; $t = 48$ h. Os pacientes

f L A

receberão doses repetitivas de Y2B8 (a mesma dose administrada que na primeira dose) aproximadamente cada seis a oito semanas, num máximo de quatro doses, ou dose cumulativa total de 80 mCi. É preferido que os pacientes não recebam uma dose subsequente de Y2B8 até que os glóbulos brancos do paciente sejam maiores/iguais a 3.000 e o AGC seja maior/igual a 100.000.

No final deste estudo de três níveis de dose, será definida uma MTD. Serão incluídos mais pacientes no estudo e estes irão receber a MTD.

II. PRODUÇÃO DE ANTICORPO ANTI-CD20 QUIMÉRICO ("C2B8")

A. Construção do vector de expressão de ADN de imunoglobulina anti-CD20 quimérico

Isolou-se ARN a partir da célula de hibridoma de ratinho 2B8 (como descrito em Chomczynski, P. et al., "Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162:156-159 (1987) e preparou-se ADNc a partir deste. Isolou-se o ADN da região variável de cadeia leve da imunoglobulina de ratinho a partir do ADNc por reacção em cadeia com polimerase, utilizando um conjunto de iniciadores de síntese de ADN com homologia para as sequências sinal de cadeia leve de ratinho, na extremidade 5' e região J de cadeia leve de ratinho, na extremidade 3'. As sequências de iniciadores de síntese eram como se segue:

1. V_L de sentido directo (SEQ ID NO. 3)

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

(a porção sublinhada é um local de Bgl II; a porção acima alinhada é o codão de iniciação)

2. V_L de sentido inverso (SEQ ID NO. 4)

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

(a porção sublinhada é um local de Bsi WI)

Veja-se, Figuras 1 e 2 para os locais correspondentes de Bgl II e Bsi WI em TCAE 8, e Figura 3 para os locais correspondentes em anti-CD20 em TCAE 8.

Este fragmento de ADN resultante foi clonado directamente no vector TCAE 8, em frente do domínio constante de cadeia leve kapa humana e sequenciado. A sequência de ADN determinada para a região variável da cadeia leve de murideo é apresentada na figura 4 (SEQ ID NO. 5); veja-se também Figura 3, nucleótidos 978 a 1362. A Figura 4 proporciona ainda a sequência de aminoácidos desta região variável de murideo e as regiões CDR e regiões de sequência. A região variável de cadeia leve de ratinho de 2B8 pertence à família kapa VI de ratinho. Veja-se, Kabat, *supra*.

A região variável de cadeia pesada de ratinho foi isolada e clonada de modo semelhante, em frente dos domínios constantes de IgG1 humana. Os iniciadores de síntese eram como se segue:

1. V_H de sentido directo (SEQ ID NO. 6)

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

(a porção sublinhada é um local de Mlu I)

2. V_H de sentido inverso SEQ ID NO. 7)

5' GG(G/C) TGT TGT GCTAGC TG(A/C) (A/G)GA GAC
(G/A)GT GA 3'

(a porção sublinhada é um local Nhe I)

Veja-se figuras 1 e 2 para os locais Mlu I e Nhe I correspondentes em TCAE 8 e Figura 3 para os locais correspondentes em anti-CD20 em TCAE 8.

A sequência para esta cadeia pesada de ratinho é apresentada na Figura 5 (SEQ ID NO. 8); veja-se também figura 3, nucleótido 2401 a 2820. A Figura 5 proporciona também a sequência de aminoácidos para esta região variável de murideo e as regiões CDR e regiões de sequência. A região variável de cadeia pesada de ratinho de 2B8 pertence à família VH 2B de ratinho. Veja-se Kabat, *supra*.

B. Criação de transfectomas CHO e SP2/o que produzem anti-CD20 quimérico

Cresceram-se células de ovário de Hamster chinês ("CHO") DG44 em meio hipoxantina SSFM II menos e timidina (Gibco, Grand Island, NY, Form No. 91 0456PK); cresceram-se células de mieloma de ratinho SP2/0 em meio de Eagle modificado da Dulbecco ("DMEM") (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca., Cat. No. 9024) com soro fetal de bovino a 5% e adicionou-se glutamina 20 ml/L. Fez-se a electroporação de 4 milhões de células, quer com 25 µg de CHO, quer com 50 µg de ADN de plasmídeo SP2/0 que tinham sido cortadas com Not I, utilizando um sistema de electroporação BTX 600 (BTX, San Diego, CA) em cuvetes descartáveis de 0,4 ml. As condições eram, ou 210 volts para CHO, ou 180 volts para SP2/0, 400 microfaradays, 13 ohms. Cada electroporação foi plaqueada em seis placas de 96 poços (cerca de 7.000 células/poço). As placas foram alimentadas com meio contendo G418 (GENETICIN, Gibco, Cat. No. 860-1811) a 400 µg/ml de composto activo para CHO (os meios incluíam ainda hipoxantina 50 µM e timidina 8 µM), ou 800 µg/ml para SP2/0, dois dias após a electroporação e em seguida 2 ou 3 dias até surgirem colónias. O sobrenadante das colónias foi testado quanto à presença de imunoglobulina quimérica, através de um

ELISA específico para anticorpos humanos. As colónias que produzem a maior quantidade de imunoglobulina foram expandidas e plaqueadas em placas de 96 poços contendo meio mais metotrexato (25 nM para SP2/0 e 5 nM para CHO) e alimentadas cada dois ou três dias. Testaram-se os sobrenadantes como acima e as colónias que produzem a maior quantidade de imunoglobulina foram examinadas. O anticorpo anti-CD20 quimérico foi purificado a partir do sobrenadante, utilizando cromatografia de afinidade de proteína A.

O anti-CD20 quimérico purificado foi analisado por electroforese em geles de poliacrilamida e estimou-se que era mais de cerca de 95% puro. A afinidade e especificidade do anticorpo quimérico foi determinada com base no 2B8. O anticorpo anti-CD20 quimérico, testado em testes de ligação directa e competitiva, quando comparado com o anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, 2B8, evidenciou uma afinidade e especificidade comparáveis em várias linhas de células B positivas para CD20 (dados não apresentados). A constante de afinidade aparente ("Kap") do anticorpo quimérico foi determinada por ligação directa de anti-CD20 quimérico marcado radioactivamente com I^{125} e comparada com 2B8 marcado radioactivamente, por meio de um gráfico de Scatchard; o Kap estimado para anti-CD20 quimérico produzido por CHO era de $5,2 \times 10^{-9}$ M e para anticorpo produzido por SP2/0, de $7,4 \times 10^{-9}$ M. O Kap estimado para 2B8 era de $3,5 \times 10^{-9}$ M. Utilizou-se a competição directa por radioimunoensaio para confirmar tanto a especificidade como a retenção da imunoreactividade do anticorpo quimérico, por comparação da sua capacidade para competir eficazmente com 2B8. Foram necessárias quantidades substancialmente equivalentes de anticorpos anti-CD20 quimérico e 2B8 para produzir 50% de inibição da ligação a antígenos CD20 em células B (dados não apresentados), i.e. houve uma perda mínima de actividade inibidora dos anticorpos anti-CD20, presumivelmente devido a quimerização.

Os resultados do Exemplo II.B indicam, *inter alia*, que os anticorpos anti-CD20 quiméricos foram produzidos a partir de transfectomas CHO e SP2/0, utilizando vectores TCAE 8 e estes anticorpos quiméricos tinham substancialmente a mesma especificidade e capacidade de ligação que o anticorpo monoclonal anti-CD20 de murídeo, 2B8.

C. Determinação da actividade imunológica de anticorpos anti-CD20 quiméricos

i. Análise de Clq humano

Os anticorpos anti-CD20 produzidos quer pela linha celular CHO, quer SP2/0 foram avaliados quanto à ligação de Clq humano num teste de citometria de fluxo, utilizando Clq marcado com fluoresceína (O Clq foi obtido da Quidel, Mira Mesa, CA, Prod. No. A400 e marcador FITC da Sigma, St. Louis MO, Prod. No. F-7250; FITC. A marcação de Clq foi realizada de acordo com o protocolo descrito em *Selected Methods In Cellular Immunology*, Michell & Shiigi, Ed. (W.H. Freeman & Co. San Francisco, Ca, 1980, p. 292). Os resultados analíticos foram derivados utilizando um citómetro de fluxo Becton Dickinson FACScan™ (a fluoresceína foi medida numa gama de 515-545 nm). Incubaram-se quantidades equivalentes de anticorpo anti-CD20 quimérico, IgG1 humana, proteína de mieloma K (Binding site, San Diego, Ca, Prod. No. BP078) e 2B8 com um número equivalente de células SB positivas para CD-20, seguido de um passo de lavagem com tampão FACS (0,2% de BSA em PBS, pH 7,4, 0,02% de azida de sódio) para remover o anticorpo não ligado, seguido de incubação com Clq marcado com FITC. Após uma incubação de 30-60 min, as células foram novamente lavadas. As três condições, incluindo o Clq marcado como FITC como um controlo, foram analisadas no FACScan™ seguindo as instruções do fabricante. Os resultados são apresentados na Figura 6.

Tal como os resultados da figura 6 evidenciam, observou-se um aumento significativo na fluorescência apenas para a

f L A

condição do anticorpo anti-CD20 quimérico; i.e. apenas as células SB com anticorpo anti-CD20 quimérico aderente eram positivas para Clq, enquanto que outras condições produziram o mesmo padrão que o contolo.

ii. Lise celular dependente do complemento

Analísaram-se os anticorpos anti-CD20 quiméricos quanto à sua capacidade de lisar linhas celulares de linfoma na presença de soro humano (fonte de complemento). As células SB positivas para CD20 foram marcadas com ^{51}Cr por mistura de 100 μCi de ^{51}Cr com 1×10^6 células SB durante 1 h a 37°C ; as células SB marcadas foram em seguida incubadas na presença de quantidades equivalentes de complemento humano e quantidades equivalentes (0-50 $\mu\text{g/ml}$), quer de anticorpos anti-CD20 quiméricos, quer 2B8, durante 4 h a 37°C (veja-se, 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). Os resultados são apresentados na Figura 7.

Os resultados da figura 7 indicam, *inter alia*, que os anticorpos quiméricos anti-CD20 produziram uma lise significativa (49%) sob estas condições.

iii. Teste efector da citotoxicidade celular dependente de anticorpos

Para este estudo utilizaram-se células positivas para CD20 (SB) e células negativas para CD20 (linha celular de leucemia de células T, HSB; veja-se Adams, Richard, "Formal Discussion" *Can Res.* 27:2479-2482 (1967); no. de depósito da ATCC ATCC CCL 120,1); ambas foram marcadas com ^{51}Cr . A análise foi realizada de acordo com o protocolo descrito em 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); observou-se uma lise substancial, mediada por células dependente do anticorpo anti-CD20 quimérico das células SB alvo positivas para CD20 (marcadas com ^{51}Cr) no final de uma incubação de 4 h, a 37°C e este efeito foi observado tanto para o anticorpo produzido por CHO, como por SP2/0 (as células efectoras eram linfócitos periféricos humanos; a razão entre células efectoras:alvo era de 100:1). A lise eficaz das células alvo foi obtida a 3,9 µg/ml. Pelo contrário, nas mesmas condições, o anticorpo monoclonal de murídeo 2B8 tinha um efeito estatisticamente insignificante e as células HSB negativas para CD20 não foram lisadas. Os resultados são apresentados na Figura 8.

Os resultados do Exemplo II indicam, *inter alia*, que os anticorpo anti-CD20 quiméricos do Exemplo I eram imunologicamente activos.

III. DEPLECÇÃO DE CÉLULAS B *IN VIVO* UTILIZANDO ANTI-CD20 QUIMÉRICO

A. Estudo com primatas não humanos

Foram realizados três estudos separados com primatas não humanos. Para conveniência, estes são referidos aqui como "anti-CD20 quimérico: CHO & SP2/0"; "anti-CD20 quimérico:CHO" e anti-CD20 quimérico de dosagem elevada". As condições são como se segue:

Anti-CD20 quimérico: CHO & SP2/0

Dividiram-se seis macacos cinomólogos com pesos entre 4,5 a 7 quilogramas (White Sands Research Center, Alamogordo, NM) em três grupos de dois macacos cada. Ambos os animais de cada grupo receberam a mesma dose de anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo. Um animal de cada grupo recebeu anticorpo purificado produzido pelo transfectoma CHO, o outro recebeu anticorpo produzido pelo transfectoma SP2/0. Os três

grupos receberam dosagens de anticorpo correspondentes a 0,1 mg/kg, 0,4 mg/kg e 1,6 mg/kg cada dia, durante (4) dias consecutivos. O anticorpo anti-CD20 quimérico, imunologicamente activo, que foi misturado com solução salina estéril, foi administrado por infusão intravenosa; retiraram-se amostras de sangue antes de cada infusão. Retiraram-se mais amostras de sangue começando às 24 horas após a última injeção ($T = 0$) e em seguida ao dia 1, 3, 7, 14 e 28; também se recolheram amostras de sangue após intervalos bi-semanais, até completar o estudo ao dia 90.

Centrifugaram-se aproximadamente 5 ml de sangue total de cada animal a 2000 rpm durante 5 min. Removeu-se o plasma para teste dos níveis de anticorpo anti-CD20 quimérico solúvel. O pelete (contendo leucócitos e glóbulos vermelhos de sangue periférico) foi resuspendido em soro fetal de vitela para análise de anticorpo marcado por fluorescência (veja-se, "Fluorescent Antibody Labelling of Lymphoid Cell Population", *infra*)

Anti-CD20 quimérico: CHO

Dividiram-se seis macacos cinomólogos com pesos entre 4 a 6 quilogramas (White Sands) em três grupos de dois macacos cada. Todos os animais foram injectados com anticorpo anti-CD20 quiméricos, imunologicamente activos, produzidos a partir de transfectoma CHO (em solução salina estéril). Os três grupos foram separados como se segue: o subgrupo 1 recebeu diariamente injeções intravenosas de 0,01 mg/kg de anticorpo durante um período de (4) dias; o subgrupo 2 recebeu injeções intravenosas diárias de 0,4 mg/kg de anticorpo durante um período de quatro (4) dias; o subgrupo 3 recebeu uma única injeção intravenosa de 6,4 mg/kg de anticorpo. Para todos os três sub-grupos, obteve-se uma amostra de sangue antes do início do tratamento; adicionalmente, retiraram-se também amostras de sangue a $T = 0, 1, 3, 7, 14$ e 28 dias após a última injeção, tal como acima descrito, e estas amostras

f L A

foram processadas para análise de anticorpos marcados por fluorescência (veja-se "Fluorescent Antibody Labeling" *infra*). Para além da quantificação das células B de sangue periférico, retiraram-se biópsias de nódulos linfáticos aos dias 7, 14 e 28 a pós a última injeção e corou-se uma única preparação de células para quantificação de populações de linfócitos por citometria de fluxo.

Anti-CD20 quimérico de dosagem elevada

Dois macacos cinomólogos (White Sands) receberam uma infusão de 16,8 mg/kg de anticorpos anti-CD20 quiméricos imunologicamente activos, de transfectomas de CHO (em solução salina estéril), semanalmente durante um período de quatro semanas consecutivas. No final do tratamento, ambos os animais foram anestesiados para remoção de medula óssea; também se retiraram biópsias de nódulos linfáticos. Ambos os conjuntos de tecidos foram corados quanto à presença de linfócitos B, utilizando Leu 16, por citometria de fluxo, seguindo o protocolo descrito por 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.

Marcação com anticorpo fluorescente da população de células linfóides

Após remoção do plasma, os leucócitos foram lavados duas vezes com solução salina balanceada de Hanks ("HBSS") e resuspendidos num volume equivalente ao de plasma, de soro fetal de bovino (inactivado pelo calor a 56 °C durante 30 min). Distribuiu-se um volume de 0,1 ml da preparação celular em cada um de seis (6) tubos de centrifuga cónicos de 15 ml. Adicionaram-se anticorpos monoclonais marcados por fluorescência com especificidade para marcadores de superfície de linfócitos humano CD2 (AMAC, Westbrook, ME), CD20 (Becton Dickinson) e IgM humana (Binding Site, San Diego, CA) a 3 dos tubos, para identificação de populações de linfócitos T e B.

Todos os reagentes tinham anteriormente testado positivo para os correspondentes antigénios de linfócitos de macaco. O anticorpo anti-CD20 quimérico ligado ao CD20 da superfície de células B de macaco foi medido no quarto tubo utilizando IgG de cabra policlonal anti-humana, acoplada a ficoeritrina (AMAC). Este reagente foi pré-adsorvido numa coluna de Ig de macaco-Sepharose para impedir a reactividade cruzada com a Ig de macaco, permitindo assim a detecção e quantificação específicas do anticorpo anti-CD20 quimérico ligado às células. Um quinto tubo incluía tanto reagentes anti-IgM como anti-IgG humana para a população de células B duplamente corada. Incluiu-se uma sexta amostra sem reagentes para determinação da autofluorescência. As células foram incubadas com anticorpos fluorescentes durante 30 minutos, lavadas e fixadas com 0,5 ml de tampão de fixação (0,15 M NaCl, 1% de paraformaldeído, pH 7,4) e analisadas num instrumento Becton Dickinson FACScan™. As populações de linfócitos foram inicialmente identificadas por dispersão de luz frontal versus em ângulo recto num gráfico de pontos "bitmap" com leucócitos não marcados. Isolou-se em seguida a população total de linfócitos, barrando todos os outros acontecimentos. As medições subsequentes de fluorescência reflectiram apenas os acontecimentos específicos de linfócitos não barrados.

Depleção de Linfócitos B de sangue periférico

Não foi possível determinar nenhuma diferença observável entre a eficácia dos anticorpos produzidos por CHO e SP2/0 na depleção de células B *in vivo*, embora se tenha observado um ligeiro aumento na recuperação de células B, com início após o dia 7, para macacos injectados com anticorpos anti-CD20 quiméricos, derivados a partir de transfectomas de CHO a níveis de dosagem de 1,6 mg/kg e 6,4 mg/kg e para o macaco injectado com SP2/0 que produziu anticorpos a um nível de dose de 0,4 mg/kg. As Figura 9A, B e C proporcionam os resultados derivados a partir do estudo de anti-CD20 quimérico:CHO & SP2/0, estando a Figura 9A direccionada para o nível de dose

de 0,4 mg/kg; a Figura 9B direccionada para o nível de dose de 1,6 mg/kg; e a Figura 9C direccionada para o nível de dose de 6,4 mg/kg.

Como é evidente pela Figura 9, houve um decréscimo drástico (> 95%) nos níveis de células B periféricas após o tratamento terapêutico, em todas as gamas de dose testadas e estes níveis mantiveram-se até sete (7) dias após a infusão; após este período, a recuperação de células B começou e o tempo de iniciação da recuperação foi independente dos níveis de dosagem.

No estudo anti-CD20 quimérico:CHO utilizou-se uma concentração de dosagem de anticorpo 10 vezes menor (0,01 mg/kg) durante um período de quatro injeções diárias (0,04 mg/kg total). A Figura 10 mostra os resultados deste estudo. Esta dosagem depletou a população de células B de sangue periférico para aproximadamente 50% dos níveis normais estimados quer com o IgM anti-superfície quer com o anticorpo Leu 16. Os resultados indicam também que não se atingiu a saturação do antigénio CD20 na população de linfócitos B com o anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo, nesta concentração de dose, ao longo deste período de tempo, para primatas não-humanos; os linfócitos B revestidos com o anticorpo foram detectados nas amostras de sangue durante os três dias iniciais a seguir ao tratamento terapêutico. No entanto, pelo dia 7, as células revestidas com anticorpo não eram detectáveis.

A tabela 1 resume os resultados de doses únicas e múltiplas de anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo nas populações de sangue periférico; a condição de dose única era 6,4 mg/kg; a condição de dose múltipla era de 0,4 mg/kg durante quatro (4) dias consecutivos (estes resultados foram derivados a partir dos macacos acima descritos).

f L A

TABELA I
POPULAÇÃO DE SANGUE PERIFÉRICO DO ESTUDO DE PRIMATAS C2B8

<u>Macaco</u>	<u>Dose</u>	<u>Dia</u>	<u>CD2</u>	<u>IgG anti-Hu</u>
A	0,4 mg/kg (4 doses)	Pré-sangramento	81,5	-
		0	86,5	0,2
		7	85,5	0,0
		21	93,3	-
		28	85,5	-
B	0,4 mg/kg (4 doses)	Pré-sangramento	81,7	-
		0	94,6	0,1
		7	92,2	0,1
		21	84,9	-
		28	84,1	-
C	6,4 mg/kg (1 doses)	Pré-sangramento	77,7	0,0
		7	85,7	0,1
		21	86,7	-
		28	76,7	-
D	6,4 mg/kg (1 doses)	Pré-sangramento	85,7	0,1
		7	94,7	0,1
		21	85,2	-
		28	85,9	-

<u>Macaco</u>	<u>IgG anti-Hu+</u> <u>IgM anti-Hu*</u>	<u>Leu-16</u>	<u>Depleção de células B %</u>
A	-	9,4	0
	0,3	0,0	97
	0,1	1,2	99
	-	2,1	78
	-	4,1	66
B	-	14,8	0
	0,2	0,1	99
	0,1	0,1	99
	-	6,9	53
	-	8,7	41
C	0,2	17,0	0
	0,1	0,0	99
	-	14,7	15
	-	8,1	62
D	0,1	14,4	0
	0,2	0,0	99
	-	9,2	46
	-	6,7	53

f L A

* população de coloração dupla, que indica a extensão das células B revestidas com anti-CD20 quimérico.

Os dados resumidos na Tabela I indicam que a depleção de células B no sangue periférico sob condições de excesso de anticorpo ocorreram rápida e eficazmente, independentemente de níveis de dosagem única ou múltipla. Além disso, a depleção foi observada durante pelo menos sete (7) dias após a última injeção, observando-se uma recuperação parcial de células B ao dia 21.

A tabela II resume o efeito de anticorpos anti-CD20 quiméricos, imunologicamente activos em populações de células de nódulos linfáticos, utilizando o regime de tratamento da tabela I (4 doses diárias de 0,4 mg/kg; 1 dose de 6,4 mg/kg); também se apresentam os valores comparativos para nódulos linfáticos normais (macaco controlo, axilar e inguinal) e medula óssea normal (dois macacos).

f. L. A.

TABELA II
POPULAÇÃO CELULARES DE NÓDULOS LINFÁTICOS

<u>Macaco</u>	<u>Dose</u>	<u>Dia</u>	<u>CD2</u>	<u>IgM anti-Hu</u>
A	0,4 mg/kg (4 doses)	7	66,9	-
		14	76,9	19,6
		28	61,6	19,7
B	0,4 mg/kg (4 doses)	7	59,4	-
		14	83,2	9,9
		28	84,1	15,7
C	6,4 mg/kg (1 doses)	7	75,5	-
		14	74,1	17,9
		28	66,9	23,1
D	6,4 mg/kg (1 doses)	7	83,8	-
		14	74,1	17,9
		28	84,1	12,8

TABELA II (continuação)

<u>Macaco</u>	<u>IgG anti-Hu+</u> <u>IgM anti-Hu</u>	<u>Leu-16</u>	<u>% de depleção de</u> <u>células B</u>
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

f L A

TABELA II (continuação)

	<u>CD2</u>	<u>IgG anti-Hu+</u>	<u>IgM anti-Hu</u>	<u>IgM anti-Hu</u>	<u>Leu-16</u>	<u>% de depleção</u> <u>de linfócitos B</u>
Nódulos linfáticos normais						
Controlo 1						
Axilar	55,4	25,0	-		41,4	NA
Inguinal	52,1	31,2	-		39,5	NA
Medula óssea normal						
Controlo 2	65,3	19,0	-		11,4	NA
Controlo 3	29,8	28,0	-		16,6	NA

Os resultados da tabela II evidenciam uma depleção eficaz de linfócitos B para ambos os regimes de tratamento. A tabela II indica ainda que para os primatas não humanos, não foi alcançada a saturação completa das células B no tecido linfático com anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo; além disso, observaram-se células revestidas com anticorpos sete (7) dias após tratamento, seguido de uma depleção marcada de células B de nódulos linfáticos, observada no dia 14.

Com base nestes dados, realizou-se o estudo de anti-CD20 quimérico de dosagem elevada acima referido, tendo principalmente em vista a determinação da farmacologia/toxicologia. I.e. este estudo foi realizado para avaliar qualquer toxicidade associada com a administração do anticorpo quimérico, bem como com a eficácia da depleção de células B a partir de nódulos linfáticos de sangue periférico e medula óssea. Além disso, uma vez que os dados da Tabela II indicam que para esse estudo, a maioria das células B de nódulos linfáticos eram depletadas entre 7 e 14 dias após o tratamento, um regime de doses semanais poderá evidenciar resultados mais eficazes. A Tabela III resume os resultados do estudo com anti-CD20 quimérico de dosagem elevada.

TABELA III
POPULAÇÕES DE CÉLULAS DE NÓDULOS LINFÁTICOS E MEDULA ÓSSEA
Populações de linfócitos (%)

<u>Macaco</u>	<u>CD2</u>	<u>CD20^a</u>	<u>mIgM+antiC2B8^b</u>	<u>C2B8^c</u>	<u>Dia^d</u>
<u>Nódulo linfático</u>					
<u>inguinal</u>					
E	90,0	5,3	4,8	6,5	22
F	91,0	6,3	5,6	6,3	22
G	89,9	5,0	3,7	5,8	36
H	85,4	12,3	1,7	1,8	36
<u>Medula óssea</u>					
E	46,7	4,3	2,6	2,8	22
F	41,8	3,0	2,1	2,2	22
G	35,3	0,8	1,4	1,4	36
H	25,6	4,4	4,3	4,4	36

^a Indica população corada com Leu 16

^b Indica população duplamente corada, positiva para células IgM de superfície e células revestidas com anticorpo quimérico.

^c Indica coloração da população total para anticorpo quimérico, incluindo coloração dupla de células positivas para IgM de superfície e coloração simples (negativo para IgM de superfície)

^d Dias após injeção de dose final de 16,8 mg/kg

Ambos os animais avaliados aos 22 dias após cessação do tratamento continham menos que 5% de células B, quando comparados com 40% em nódulos linfáticos controle (veja-se, Tabela II, *supra*). De modo semelhante, na medula óssea de animais tratados com anticorpo anti-CD20 quimérico, os níveis de células positivas para CD20 era inferior a 3%, quando comparado com 11-15% nos animais normais (veja-se Tabela II, *supra*). Nos animais avaliados aos 36 dias após a cessação do tratamento, um dos animais (H) tinha aproximadamente 12% de células B no nódulo linfático e 4,4 % de células B na medula óssea enquanto que o outro (G) tinha aproximadamente 5% de

células B no nódulo linfático e 0,8% na medula óssea - os dados indicam uma depleção significativa de células B.

Os resultados do exemplo IIIA indicam, *inter alia*, que doses baixas de anti-CD20 quimérico imunologicamente activo conduzem à depleção a longo termo de células B de sangue periférico, em primatas. Os dados indicam também que se obteve uma depleção significativa das populações de células B em nódulos linfáticos periféricos e medula óssea, quando se administraram doses elevadas repetitivas de anticorpo. O seguimento continuado nos animais teste indicou que mesmo com uma depleção grave deste tipo, dos linfócitos B periféricos durante a primeira semana de tratamento, não se observaram nenhuns efeitos adversos para a saúde. Além disso, à medida que se observava a recuperação da população de células B, podia-se tirar a conclusão de que os hemocitoblastos pluripotentes destes primatas não eram afectados de forma adversa pelo tratamento.

B. Análise clínica de C2B8

i. Ensaio clínico de fase I/II de C2B8: Estudo da terapia de dose única

Trataram-se quinze pacientes com reincidência de linfoma de células B documentada histologicamente, com C2B8, num ensaio clínico de fase I/II. Cada paciente recebeu uma única dose de C2B8 num estudo de doses escalonadas; havia três pacientes por dose: 10 mg/m²; 50 mg/m²; 100 mg/m²; 250 mg/m² e 500 mg/m². O tratamento era por infusão i.v. através de um filtro "in-line" de 0,22 micron, sendo o C2B8 diluído num volume final de 250cc, ou a uma concentração máxima de 1mg/ml de solução salina normal. A taxa inicial era de 50 cc/h para a primeira hora; se não se observasse nenhuma toxicidade, a taxa de dose podia ser escalonada até um máximo de 200 cc/h.

A toxicidade (tal como indicada pelo clínico) variava entre "nenhuma", "febre", "moderada" (dois pacientes) e

"grave" (um paciente); todos os pacientes completaram o tratamento terapêutico. Analisaram-se os linfócitos de sangue periférico para determinar *inter alia*, o impacto do C2B8 nas células-T e células-B. De forma consistente para todos os pacientes, os linfócitos B de sangue periférico foram eliminados após infusão com C2B8 e esta depleção foi mantida por mais duas semanas.

Um dos pacientes (que recebeu 100 mg/m^2 de C2B8) evidenciou uma resposta parcial ao tratamento de C2B8 (redução de mais de 50% na soma dos produtos dos diâmetros perpendiculares de todas as lesões indicadoras mensuráveis, que perduram por mais de quatro semanas, tempo durante o qual não podem aparecer novas lesões e em que as lesões existentes não podem aumentar); pelo menos um outro paciente (que recebeu 500 mg/m^2) evidenciou uma resposta menor ao tratamento com C2B8 (redução de menos que 50%, mas de pelo menos 25% na soma dos produtos dos dois diâmetros perpendiculares maiores de todas as lesões indicadoras mensuráveis). Para uma melhor apresentação, os resultados dos PBLs são apresentados na Figura 14; os dados para o paciente que evidencia um PR é apresentado na Figura 14A; para o paciente que evidencia um MR, os dados são apresentados na Figura 14B. Na figura 14, aplica-se o seguinte: $\blacksquare$ = linfócitos; $\square$ = células CD3+ (células T); $\blacktriangle$ = células CD20+; $\bullet$ = células CD19+; $\circ$ = kapa; Δ = lambda; $\blacklozenge$ = C2B8. Tal como evidenciado, os marcadores de células B, CD20 e CD19, Kapa e Lambda, foram eliminados por um período de mais de duas semanas; apesar de ter havido uma redução inicial, ligeira, nas contagens de células T, estas voltaram para um nível próximo da linha de base, num espaço de tempo relativamente rápido.

ii. Ensaio clínico de fase I/II de C2B8: Estudo de terapia de dose múltipla

Os pacientes com linfoma de células B histologicamente confirmado, com doença progressiva mensurável são elegíveis

para este estudo, o qual é separado em duas fases: Na fase I, que consiste de um escalonamento da dose para caracterizar as toxicidades limitantes de dose e determinar o nível de dose biologicamente activa tolerada, grupos de três pacientes irão receber semanalmente infusões i.v. de C2B8 durante um total de quatro(4) infusões separadas. A dose cumulativa em cada um destes três níveis será como se segue: 500 mg/m² (125 mg/m²/infusão); 1000 mg/m² (250 mg/m²/infusão); 1500 mg/m² (375 mg/m²/infusão). Define-se uma dose biologicamente activa, tolerada, e esta será determinada como a menor dose que possui tanto uma toxicidade tolerável, como uma actividade adequada); na fase II, outros pacientes irão receber a dose biologicamente activa tolerada, com ênfase na determinação da actividade das quatro doses de C2B8.

IV TERAPIA DE COMBINAÇÃO: C2B8 e Y2B8

Analizou-se uma aproximação de terapia de combinação utilizando C2B8 e Y2B8 num modelo de ratinho com enxerto (ratinhos nú/nú, fêmea, de aproximadamente 10 semanas de idade) utilizando um tumor linfoblástico de células B (células de tumor Ramos). Para fins comparativos, trataram-se também outros ratinhos com C2B8 e Y2B8.

As células de tumor Ramos (ATCC, CRL, 1596) foram mantidas em cultura utilizando RPMI-1640 suplementado com soro fetal de vitela a 10% e glutamina a 37 °C e 5% de CO₂. Os tumores foram iniciados em nove ratinhos "nú" fêmea, de aproximadamente 7-10 semanas de idade por injeção subcutânea de $1,7 \times 10^6$ células Ramos num volume de 0,10 ml (HBSS) utilizando uma seringa de 1 cc ajustada com uma agulha de 25g. Todos os animais foram manipulados numa câmara de flux laminar e todas as gaiolas, camas, alimentos e água foram autoclavados. As células de tumor foram passadas, fazendo a excisão dos tumores e passando estes através de um filtro de crivo 40; as células foram lavadas duas vezes com 1X HBSS (50 ml) por centrifugação (1300 RPM), resuspendidas em 1X HBSS a 10×10^6 células/ml e

congeladas a -70°C , até utilização.

Para as condições experimentais, as células de vários lotes congelados foram descongeladas, sedimentadas por centrifugação (1300 RPM) e lavadas duas vezes com 1X HBSS. As células foram em seguida resuspensas a aproximadamente $2,0 \times 10^6$ células/ml. Injectaram-se aproximadamente 9 a 12 ratinhos com 0,10 ml de uma suspensão de células (s.c.) utilizando uma seringa de lcc ajustada com uma agulha de 25 g; as injeções foram efectuadas no lado esquerdo do animal, aproximadamente na região média. Os tumores desenvolveram-se em aproximadamente duas semanas. Os tumores foram removidos e processados como descrito acima. Os ratinhos em estudo foram injectados como descrito acima com $1,67 \times 10^6$ células em 0,10 ml de HBSS.

Com base em experiências preliminares de dosagem, determinou-se que seriam utilizados 200 mg de C2B8 e 100 μCi de Y2B8 neste estudo. Injectaram-se noventa ratinhos nú/nú fêmea (de aproximadamente 10 semanas de idade) com células de tumor. Aproximadamente 10 dias mais tarde, distribuíram-se 24 ratinhos em quatro grupos de estudo (seis ratinhos/grupo) tentando manter uma distribuição de tamanho de tumor comparável em cada grupo (o tamanho médio do tumor expresso como o produto do comprimento $\times$ largura do tumor, era de aproximadamente 80 mm^2). Os grupos seguintes foram tratados como indicado através de injeções na veia da cauda, utilizando uma seringa Hamilton de 100 μl ajustada com uma agulha de 25 g:

- A solução salina normal
- B Y2B8 (100 μCi)
- C C2B8 (200 μg); e
- D Y2B8 (100 μCi) + C2B8 (200 μg)

Os grupos testados com C2B8 receberam uma segunda injeção de C2B8 (200 μg /ratinho) sete dias após a injeção inicial. As

f L A

medidas de tumor foram realizadas em cada dois ou três dias utilizando um calibrador.

A preparação dos materiais de tratamento foi realizada de acordo com os seguintes protocolos:

A. Preparação de Y2B8

Transferiu-se cloreto de ítrio[90] (6 mCi) para um tubo de polipropileno e ajustou-se para pH 4,1-4,4, utilizando acetato de sódio 2M isento de metais. Adicionou-se 2B8-MX-DTPA (0,3 mg em solução salina normal; veja-se acima para a preparação de 2B8-MX-DTPA) e misturou-se cuidadosamente por agitação num vortex. Após 15 min de incubação, a reacção foi interrompida por adição de 0,05 x volume de EDTA 20 mM e 0,05 x volume de acetato de sódio 2M. A concentração de radioactividade foi determinada por diluição de 5,0 µl da mistura reaccional em 2,5 ml 1 x PBS contendo HSA 75 mg/ml e STPA 1 mM ("tampão de formulação"); a contagem foi realizada por adição de 10,0 µl a 20 ml de cocktail de cintilação Ecolume™. O remanescente da mistura reactiva foi adicionado a 3,0 ml de tampão de formulação, filtrado em condições estéreis e armazenado a 2-8 °C até utilização. A actividade específica (14 mCi/mg na altura da injeção) foi calculada utilizando a concentração de radioactividade e a concentração de proteína foi calculada com base na quantidade de anticorpo adicionado à mistura reaccional. A radioactividade associada à proteína foi determinada utilizando cromatografia em camada fina instantânea. A radioincorporação foi de 95%. O Y2B8 foi diluído no tampão de formulação imediatamente antes da utilização e filtrado em condições estéreis (a concentração de radioactividade final era de 1,0 mCi/ml)

B. Preparação de C2B8

O C2B8 foi preparado como descrito acima. O C2B8 foi fornecido como um reagente estéril em solução salina normal a

f L A

5,0 mg/ml. Antes da injeção, o C2B8 foi diluído em solução salina normal para 2,0 mg/ml e filtrado em condições estéreis.

C. Resultados

Após tratamento, o tamanho do tumor foi expresso como um produto do comprimento e largura e tiraram-se medidas nos dias indicados na Figura 11 (Y2B8 vs. solução salina); Figura 12 (C2B8 vs. solução salina); e Figura 13 (Y2B8 + C2B8 vs. solução salina). Também se determinou o erro padrão.

Como indicado na Figura 13, a combinação de Y2B8 e C2B8 exibiu efeitos tumorídeos comparáveis aos efeitos evidenciados quer por Y2B8, quer por C2B8.

V. ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS ALTERNATIVAS

São evidentes estratégias terapêuticas reconhecidas no âmbito dos exemplos anteriores. Uma estratégia deste tipo utiliza uma dose terapêutica de C2B8 seguida, dentro de cerca de uma semana de uma combinação quer de 2B8 e 2B8 marcado radioativamente (e.g. Y2B8); ou 2B8, C2B8 e e.g. Y2B8; ou C2B8 e e.g. Y2B8. Uma estratégia adicional é a utilização de C2B8 marcado radioativamente - uma estratégia deste tipo permite a utilização dos benefícios da porção imunologicamente activa de C2B8 mais os benefícios associados com um marcador radioactivo. Os marcadores radioactivos preferidos incluem ítrio-90, atendendo à maior semi-vida de circulação de C2B8 versus o anticorpo de murídeo 2B8. Devido à capacidade do C2B8 depletar células B e aos benefícios derivados da utilização de um marcador radioactivo, uma estratégia alternativa preferida é tratar o paciente com C2B8 (quer com uma dose simples, quer com doses múltiplas), de modo que a maior parte, se não todas, as células B periféricas foram depeltadas. Isto seria então seguido da utilização de 2B8 marcado radioativamente; devido à depleção de células B periféricas, o 2B8 marcado

radioactivamente tem maior hipóteses de se direccionar para células de tumor. O 2B8 marcado com iodo[131] é preferencialmente utilizado, atendendo aos tipos de resultados referidos na literatura com este marcador (veja-se Kaminski). Uma preferência alternativa envolve a utilização de um 2B8 (ou C2B8) marcado radioactivamente, primeiro num esforço para aumentar a permeabilidade de um tumor, seguido de tratamentos simples ou múltiplos com C2B8; a intenção desta estratégia é aumentar as hipóteses do C2B8 estar tanto fora, como dentro da massa de tumor. Uma outra estratégia envolve a utilização de agentes quimioterapêuticos em combinação com C2B8. Estas estratégias incluem os tratamentos designados por "staggered", i.e. tratamentos com um agente quimioterapêutico, seguido de tratamento com C2B8, seguido de uma repetição deste protocolo. Alternativamente, é possível um tratamento inicial com doses únicas ou múltiplas de C2B8, seguido de tratamento quimioterapêutico. Os agentes quimioterapêuticos preferidos incluem, mas não se limitam a: ciclofosfamida, doxorubicina e prednisona, Veja-se Armitage, J.O. et al. *Cancer* 50: 1695 (1982), aqui incorporado para referência.

As estratégias terapêuticas alternativas anteriores não pretendem ser limitantes, sendo apresentadas como representativas.

VI INFORMAÇÃO DE DEPÓSITO

O anti-CD20 em TCAE 8 (transformado em *E. coli* para fins de depósito) foi depositado na American Type Culture Collection (ATCC), 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852, de acordo com o tratado de Budapeste para o reconhecimento internacional do depósito de microorganismos para fins de processos de patentes ("Tratado de Budapeste"). O microorganismo foi testado pela ATCC em 9 de Novembro de 1992 e determinado como viável nessa data. A ATCC designou este microorganismo pelo seguinte número de depósito da ATCC: ATCC 69119 (anti-CD-20 em TCAE 8). O hibridoma 2B8 foi depositado

f L A

na ATCC em 22 de Junho, 1993, de acordo com as normas do tratado de Budapeste. A viabilidade da cultura foi determinada em 25 de Junho, 1993 e a ATCC atribuiu a este hibridoma o seguinte número de depósito da ATCC: HB 11388.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE: Darrell Anderson, Nabil Hanna, John Leonard, Roland Newman e Mitchell Reff e William H. Rastetter

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: APLICAÇÃO TERAPÊUTICA DE ANTICORPOS, QUIMÉRICOS E MARCADOS RADIOATIVAMENTE, CONTRA ANTIGÊNIOS DE DIFERENCIAÇÃO RESTRITA DE LINFÓCITOS B HUMANOS, PARA O TRATAMENTO DO LINFOMA DE CÉLULAS B

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS : 8

(iv) MORADA PARA CORRESPONDÊNCIA

- (A) DESTINATÁRIO: IDEC Pharmaceutical Corporation
- (B) RUA: 11011 Torreyana road
- (C) CIDADE: San Diego
- (D) ESTADO: Califórnia
- (E) PAÍS: USA
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 92121

(v) FORMA DE LEITURA DO COMPUTADOR:

- (A) TIPO DE MEIO: disquete 3,5", 1,44 Mb
- (B) COMPUTADOR: Macintosh
- (C) SISTEMA OPERATIVO: MS.DOS
- (D) SOFTWARE: Microsoft Word 5.0

(vi) DADOS DO PEDIDO ACTUAL:

- (A) NÚMERO DO PEDIDO:
- (B) DATA DE DEPÓSITO

f L A

(C) CLASSIFICAÇÃO

(viii) INFORMAÇÃO PARA MANDATÁRIO/AGENTE

(A): NOME: Burgoon, Richard P. Jr.

(B): NÚMERO DE REGISTO: 34,787

(C) NÚMERO DE REFERÊNCIA/REGISTO

(ix) INFORMAÇÃO PARA TELECOMUNICAÇÕES

(A) TELEFONE (619) 550-8500

(B) TELEFAX: (619) 550-8750

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 1

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 8540 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genômico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

(iv) SENTIDO INVERSO: não

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.1:

f L A

GACGTGCGGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
 AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120
 GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
 GGGGAGCCTG GGGGTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCT 360
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCTAT GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG 480
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCCAGTAC 660
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
 ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGA 780
 TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
 GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGCCCG TAGGCGTGTA 900
 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCCG CTGGAGACGC 960
 CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020
 CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080
 TCTGTCTTCA TCTTCCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1140
 TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC 1200
 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260
 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCATA GCAGACTAGG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320
 TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCGCTACAAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380
 TGTGAAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATCC 1440
 GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCTTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500
 GTTTGGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACCTCCAC TGTCTTTTC 1560
 TAATAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTTG CTGAGTAGGT GTCATTTCTAT TCTGGGGGGT 1620
 GCGGTGGGCC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 1740
 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCGCCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800

f L A

TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 1360
 GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCOA AGTCTCCACC 1920
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAAATGTC 1980
 GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGGG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2100
 ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCTCT GTCGGTGTGG CTACCGGTGT CGCTAGCACC 2160
 AAGGGGCCAT GGTCTCTCCG GTTGGCACTG TCGTCAAGA GCACCTCTGG GGGCAAGCGG 2220
 GCGCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACCGGTGT GTGGAACTCA 2280
 GGGCCCCGTA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCTC AGGACTCTAC 2340
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400
 AACGTGAATC ACAAGCCCCG CAACACCAAG GTGGACAAGT AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460
 GACAAAACCTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCACTC 2520
 TTCCTCTTCC CCCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA 2580
 TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640
 GGCSTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700
 CGTGTGGTCA GCGTCTCTAC CGTCTCTCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG 2760
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820
 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG 2880
 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GUCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG 2940
 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 3000
 GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
 CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAAAGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
 TCSTGACAAC ATGCGGCGCT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT 3240
 GCCAGCCATC TTTTGTGTCG CCTCCCCCGG TGCCTTCCTT GACCCCTGGAA GGTGCCACTC 3300
 CCACTGTCTT TTCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCCCA TTGTCTGAGT AGGTGTCTAT 3360
 CTAATCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGAATGGGA GACAAATCCA 3420
 GGCATGCTGG GCAATGGGGT GGCTCTATGG AACCAGCTGG GCCTCGACAG CGCTGGATCT 3480
 CCGCATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 3540
 AATTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600

f L A

AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3560
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCAGAA 3720
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAACTT CCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
 GCAGGAGCCA GGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTGCGGC 3900
 CAAACTTGAC GGCATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TCCCATCATG 3960
 GTTCGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020
 GACCTACCTT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
 TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGTA GGAAACCTG GTTCTCATT 4140
 CCTGAGAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAA 4200
 GAACCAACCAC GAGGAGCTCA TTTCTTCCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260
 GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGT TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
 TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
 GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
 GAATACCCAG GCGTCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500
 GTCTACGAGA AGAAAGACTA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAG 4560
 CTATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCC 4620
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGGCC CTCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG 4680
 TGCCACTCCC ACTGTCTTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC 4860
 TAGCTTTGCT TCTCAATTTT TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCAG AGCCTGATTC 5100
 GGTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAAAT TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GGTGAAACAA CATGGATTGC ACGCAGGTTT 5280
 TCCGGCCGCT TGGCTCCAGA GCGTATTCCG CTATGACTGG GCACAAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCGGTGTTCC GCGTGTACG GCAGGGGGGC CCGGTTCTTT TTGTCAAAGAC 5400
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAAGTGCA GGACGAGGCA GCGGGGCTAT CGTGGCTGCC 5460

f L A

CACGACGGGG GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACCTTGTG ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GCGGAGGTGG CCGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCTTGCGGA 5530
 GAAAGTATCC ATCATGGGCTG ATGCAATGGG CCGGCTGCAT ACGCTTGATC CCGCTACCTG 5540
 CCCATTGGAC CACCAAGCGA AACATGGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAAGCCGG 5700
 TCTTGTGGAT CAGGATGATC TGGACCAAGA GCATCAGGGG CTCGGGGCAG CCGAACTGTT 5760
 CCGCAGGCTC AAGGCGCGCA TGGCGGACGG CGAGGATGTC CTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGCCG AATATCATCG TGGAAATGG CCGCTTTCTT GGATTCATCG ACTGTGGCGG 5880
 GCTGGGTGTG CCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TGGGTGAAGA 5940
 GCTTGGCGCG GAATGGGCTG ACCGCTTGGT CGTGGTTTAC GGTATCGCCG CTCGCGATTC 6000
 GCAGCGCATC GCTTGTATC GCTTGTGTA CGAGTGTGTC TGAGCGGGAC TGGGGGTGTC 6060
 GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCGCAACCTG CCATCAGGAG ATTGCGATTC CACCGCGCGC 6120
 TTCTATGAAA GCTTGGGCTT CCGAATCGTT TTGGGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180
 CCGCGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTGGCG CACCGCAACT TGTTTATGCG AGCTTATAAT 6240
 GGTTCACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTACCAATAA AAGCATTTT TTCACTGCAT 6300
 TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTAGCTTATC ATGTCTGGAT CCGGGCGCGG 6360
 ATCCCGTCGA GAGCTTGGCG TAATCATGCT CATAGCTGTT TCGTGTGTGA AATTGTTATC 6420
 CGCTCACAAAT TCCACACAAC ATACGAGCGG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCGT 6480
 AATGAGTGAG CTAAGTCACA TTAATTGCGT TGGGCTCACT GCGCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540
 ACCTGTCTTG CGAGCTGCAT TAATGAATCG GCGAAGCGCG GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA 6600
 TTGGGGGCTC TTGGGCTTCC TGGGTCAGTG ACTCGGTGCG CTCGGTCTTT CCGGTGCGCG 6660
 GACCGCTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAAACA GGGGATAACC 6720
 CAGGAAAGCA CATGTACGCA AAAGCGGACG AAAAGCGGAC GAACCGTAAA AAGCGCGCGT 6780
 TGGTGGCGTT TTTCATAGG CTCGCGCGCG CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840
 GTCAGAGGTC GCGAAACCGG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGGTTTCCC CCTGGAAGCT 6900
 CCGTGTGCGG CTCTCTGTT CCGACCGTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCTTTCTCC 6960
 CTTGGGGAAC CCGCGCGCTT TGTCAATGCT CACCGTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020
 TCGTGGGCTC CAAGCTGGGG TGTGTGCAGG AACCGCGCGT TGAGCGCGAC CGGTGCGCGT 7080
 TATCGCGTAA CTATCTCTTT GAGTCCAAAC CGGTAAAGCA CGACTTATCG CCACTGCGAG 7140
 CAGCGACTGG TACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGGTACA GAGTTCTTGA 7200
 ATGCTGCGG TAACTACCGG TACACTAGAA CGACAGTATT TGGTATCTGC GGTGTGTGA 7260
 ACCGACTTAC CTTGCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CCGCAAAACA ACCACCGCTG 7320

f L A

```

GTACGGCTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATACGGG CAGAAAAAA GGATCTCAAG 7330
AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACCGGGTCTG ACCGTCAGTG GAACGAAAAC TCAGCTTAAG 7440
GGATTTTGGT CATCAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500
GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 7560
TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCT TTCATCCATA GTTGCGGTGAC 7620
TCCCGCTGGT GTAGATAACT ACCATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
TCATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCGG 7740
GAAGCGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCA CTTTATCCCG CTCATCCAG TCTATTAATT 7800
GTTGCCCCGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCTG CAGTTAATAG TTGCGGCAAC GTTGTTGCCA 7860
TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CTTTTGGTAT GGTTCATTC AGCTCGGTT 7920
CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGCG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
TCCGCTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCGAT GTTATCACTC ATGTTTATGG 8040
CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAAATAG GTATGCGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160
CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTG AAAAGTGCTC ATCATGGAA 8220
AAGCTTCTTC CCGCGGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT 8280
AAGCCACTCG TCCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGTTGGT 8340
GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGAAATGTT 8400
GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATGCTCTCA 8460
TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
TTCCCGGAAA AGTGCCACCT 8540

```

(3) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 2

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 9209 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

f L A

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): não

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.2:

GACGTCGCGG	CCGCTCTAGG	CCTCCAAAA	AGCCTCCTCA	CTACTTCTGG	AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC	GGCCTCGGGC	TCTGCATAAA	TAAAAAAAT	TAGTCAGCCA	TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG	CGGAAGTGGG	CGGAGTTAGG	GGCGGGATGG	GCGGAGTTAG	GGCGGGGACT	180
ATGGTTGCTG	ACTAATTGAG	ATGCATGCTT	TGCATACTTC	TGCCTGCTGG	GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC	ACCTGGTTGC	TGACTAATTG	AGATGCATGC	TTTGCATACT	TCTGCCCTGCT	300
GGGGAGCCTG	GGGACTTTCC	ACACCCTAAC	TGACACACAT	TCCACAGAAT	TAATTCCCT	360
AGTTATTAAT	AGTAATCAAT	TACGGGGTCA	TTAGTTCATA	GCCCATATAT	GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC	TTACGGTAAA	TGGCCCGCCT	GGCTGACCGC	CCAACGACCC	CGCGCCATTC	480
AGCTCAATTA	TGACGTATGT	TCCCATAGTA	ACGCCAATAG	GGACTTTCCA	TTGACGTCAA	540
TGGGTGGACT	ATTTACGGTA	AACTGCCCAC	TTGGCAGTAC	ATCAAGTGTA	TCATATGCCA	600
AGTACGCCCC	CTATTGACGT	CAATGACGGT	AAATGGCCCG	CCTGGCATTG	TGCCCAGTAC	660
ATGACCTTAT	GGGACTTTCC	TACTTGGCAG	TACATCTACG	TATTAGTCAT	CGCTATTACC	720
ATGGTGATGC	GGTTTGGCA	GTACATCAAT	GGGCGTGGAT	AGCGGTTTGA	CTCAGGGGGA	780
TTTCCAAGTC	TCCACCCCAT	TGACGTCAAT	GGGAGTTTGT	TTTGGCACCA	AAATCAACGG	840
GACTTTCCAA	AATGTCGTAA	CAACTCCGCC	CCATTGACGC	AAATGGGCGG	TAGGCGTGTA	900
CGGTGGGAGG	TCTATATAAG	CAGAGCTGGG	TACGTGAACC	GTCAGATCGC	CTGGAGACGC	960
CATCACAGAT	CTCTCACTAT	GGATTTTCAG	GTGCAGATTA	TCAGCTTCCT	GCTAATCAGT	1020
GCTTCAGTCA	TAATGTCCAG	AGGACAAATT	GTTCTCTCCC	AGTCTCCAGC	AATCCTGTCT	1080
GCATCTCCAG	GGGAGAAGGT	CACAATGACT	TGCAGGGCCA	GCTCAAGTGT	AAGTTACATC	1140
CACTGGTTCC	AGCAGAAGCC	AGGATCCTCC	CCCAAACCCCT	GGATTTATGC	CACATCCAAC	1200
CTGGCTTCTG	GAGTCCCTGT	TCGCTTCAGT	GGCAGTGGGT	CTGGGACTTC	TTACTCTCTC	1260
ACAATCAGCA	GAGTGGAGGC	TGAAGATGCT	GCCACTTATT	ACTGCCAGCA	GTGGACTAGT	1320
AACCCACCCA	CGTTCGGAGG	GGGGACCAAG	CTGGAAATCA	AACGTACGGT	GGCTGCACCA	1380
TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAACTGC	CTCTGTTGTG	1440

f L A

TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT GGATAACGCC 1500
 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTG ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1550
 AGCCTCAGCA GCACCCCTGAC GCTGAGCATA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1600
 TGGGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCGGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1650
 TTTTGAATTC AGATCCCTTA ACGGTTAACA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATCC 1700
 GGGCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCCT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800
 GTTTGCCCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCCTTTCC 1850
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1900
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1950
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2000
 ACCTCAATCA CGGTAAATGG CCGCCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2150
 GGCAGTACAT CAATGGGGCT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 2200
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC 2250
 GTAACAATC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2300
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCGCTCGML 2400
 ATGGGTTEGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACCGGTGT CCTGTCCCAG 2450
 GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2500
 TSCAAGGCTT CTGCCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2550
 GGTCCGGGGC TGGAAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2600
 CAGAAATTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700
 CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2750
 TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GCGCCAGCGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 2800
 GCTAGCACCA AGGGCCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2850
 GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTGG 2900
 TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCCTCA 3000
 GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3050
 TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3100
 AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3150
 CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3200
 GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3250
 TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3300

FLA

AGGACCTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAG	3420
GAGTACAACT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCTCAGCC CCATCGAGAA AACCATCTCC	3480
AAAGCCAAAG GCGAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGGCCCCATC CCGGGATGAG	3540
CTGACCAAGA ACCAGGTCAG COTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC	3600
GCCCTGGAGT GCGAGAGCAA TGGCCAGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCTTCCCGTG	3660
CTGGACTCCG ACCGCTCCTT CTTCTCTTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA CAGCAGGTGG	3720
CAGCAGGGGA ACCTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCCTACACG	3780
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT	3840
AGACTGGATT CCGTACAACA TGGCCCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC	3900
CTTCTAGTTG CCGCCCATCT GTTGTTTGGC CCGCCCCGGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAG	3960
GTGCCACTCC CACTGTCTTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA	4020
GGTGTCAATC TATCTCTGGG GGTCCCGCTG GGCACGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG	4080
ACAAATAGAG GCATGCTGGG GATGCCGCTG GGTCTATGGA ACCAGCTGGG COTCGACAGC	4140
GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA	4200
AGGAAATTA ATTTAAACAC CAATTCAGTA GTTGATGAG CAATGCGTT GCCAAAAAG	4260
ATGCTTTAGA GACAGGTTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTCAG AGGAGTAGC	4320
CAGAGCTTAG ACTCTAAGC CAATTAATGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTG	4380
ATCAGCGAAG CCGATTCGG TAGAGCCACA CCGTGGTAAG GGGCAATCTG CTCACACAGG	4440
ATACAGAGCG CAGGACCCAG GGCACAGCAT ATAAGCTGAG GTAGGATCAG TTCTCCTCA	4500
CAATTCCTTC TGACATAGTT GTCTTGGGAG CTTGGATAGC TTGGACAGCT CAGGCTTGG	4560
ATTTCCCGCC AACTTGAGC GCAATCCTAG CGTGAAGCCT GGTACCATTT TATCCCCGCT	4620
GCCATCATCG TTGACCAAT GAACTGCATC GTCGCCCTCT CCGAAAATAT GCGGATTCGC	4680
AAGAAGCGAG ACCTACCCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAGGAATG	4740
ACCACAACCT CTTCACTGGA AGCTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAACCTCG	4800
TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA	4860
GAACTCAAAAG AACCACCAGG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGGG TGATGCCCTTA	4920
AGACTTATTT AACAAACCGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC	4980
AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG	5040
ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCGAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAAA	5100
CTTCTCCGAG AATACCCAGG CGTCTCTCTT GAGGTCCAGG ACCAAAAAGG CATCAAGTAT	5160
AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC	5220
CTGCTAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TCGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCCTC	5280

f L A

GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCGCGTGC CTTCCTTGAC 5340
 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTC CTAATAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTO 5400
 TCTGAGTAGG TGTCAATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460
 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGUA TGGGUTGGGC TCTATGGAAC CAUCTGGGGC 5520
 TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCGAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 5580
 AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 5640
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 5700
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 5820
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTCTCTCTC ACATTTGCTT 5880
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940
 CCGAGGTTCT CCGGCGGCTT GGGTGGAGAG GCTATTGGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000
 AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTGAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT 6060
 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120
 GTGGCTGGCC ACCACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGICA CTGAAGCGGG 6180
 AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGC GGGGCAGGAT CTCTGTCTAT CTCACCTTGC 6240
 TCCTGCCGAG AAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300
 GGCTACCTGC CCATTGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360
 GGAAGCCGGT CTTGTGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420
 CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCGCGACGGC GAGGATCTCG TGGTGACCCA 6480
 TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAATGCGC CGCTTTTCTG GATTCATCCA 6540
 CTGTGGCCCG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCGTGATAT 6600
 TGCTGAAGAG CTTCGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660
 TCCCGATTCC CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT 6720
 CTGGGGTTCC AAATGACCGA CCAAGCGAGC CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTCC 6780
 ACCGCGCGCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCCGGACGC CGGCTGGATG 6840
 ATCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACCT GTTTATTGCA 6900
 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960
 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020
 GCGGCGCGCA TCCCGTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCCG AAGCATAAAG TGTAAGCCCT 7140

f L A

GGGGTSCCTA ATGAGTGAGC TAACTCAGAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCGGTTTTTC 7200
 ASTCGGJAAA CCTGTCTGTG CAGCTGCATT ATGAATCGG CCAACGGCGG GGGAGAGGCG 7260
 GTTCCGCTAT TCGCGGCTGT TCGGTTTTCT CCGTCACTGA CTCGGCTGGG TCGGTCGTTT 7320
 CCGTGGGGGG AGCGGTATCA GCTCACTCAA ACCCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380
 GGGATAAGCC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCGAGCA AAAGGCGAGG AACGTAATAA 7440
 ACGCGCGGTT GCTGGCGTTT TCCCATAGGC TCGCGCGCGG TCAGCGAGAT CACAAAAATC 7500
 GACCGTCAAG TCAGAGGTGG CGAAGCCGA CAGCACTATA AAGATACGAG GCGTTTTCCC 7560
 CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCGTGTTC CGACCGTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
 CCGTTCTCCC TTGGGGAAAG GTGGCGGTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7680
 CCGTGTAGCT CCGTCCGCTC AAGCTGGGCT GTGTGACGA ACCCGCGGTT CAGCGCGAGC 7740
 GCTCGCGGTT ATCGGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAAACC GGTAAAGACG GACTTATCGG 7800
 CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA CCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
 AGTTCTTGA GGTGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAGAG GACAGTATTT GGTATCTGCG 7920
 CTCTGTGAA GCCAGTTACC TTGGGAAAAA GAGTTCGTAG CTCTTGATCC GCGAAGCAA 7980
 CCACCGCTGC TAGCGGTGGT TTTTCTGTTT GCAAGCAGCA GATACCGCGC AGAAAAAAG 8040
 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTCTTA CCGGCTCTGA CCGTCACTGG AACGAAAT 8100
 GAGTTTAAGT GATTCTGTG ATGAGATTAT CAAAAAGAT CTTCACCTAG ATCTTTTAA 8160
 ATAAAAATG AAGTTTTTAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAACTTGG TCTGACAGTT 8220
 ACCAATGCTT AATCAGTGAG CCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 8280
 TTGCTGACT CCGCGTCTG TAGATAACTA CGATACCGGA GCGCTTACCA TCTGCGGCA 8340
 GTCTGCAAT GATACCGGA GACCGACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAAGC 8400
 AGCGAGCGCG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC TTTATCGGCG TCCATCCAGT 8460
 CTATTAATG TTGCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTGCGC AGTTAATAGT TTGCGCAAGC 8520
 TTGTTGCCAT TCGTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGGTATG GCTTCATTC 8580
 GCTCGGTTT CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCG 8640
 TTAGCTCGTT CCGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GCGCGCAGTG TTATCACTCA 8700
 TCGTTATGCG AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTGATGCC ATCGGTAAGA TCGTTTTCTG 8760
 TGACTGCTCA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATCGGGCGA CCGAGTTGCT 8820
 GTTGGCGGCG GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGTCTA 8880
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GCGCGAAAAA TCTCAAGGAT CTTACCGGCTG TTGAGATCCA 8940
 GTTGGATGTA ACCCACTCGT GCACCGCACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACGAGCG 9000

f l A

TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCCAA ATGCCGCCAA AAAGGGAATA AGGSCGACAC 9060
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTC TTCANTATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AATAAACA ATACGGGCTC 9180
CGCGCACATT TCCCCGAAA GTGCCACCT 9209

(4) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 3

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 54 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): não

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.4:

5' ATC ACA GAT CTC TCA CCA TGG ATT TTC AGG TSC AGA TTA TCA GCT
TC 3'

(5) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 4

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 30 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

f L A

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): sim

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.4:

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

(6) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 5

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 384 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): não

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.5:

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA 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 TSC AGG GCC AGC TCA AGT GTA	153
AGT TAC 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
AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA	306
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TCC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACC TTC	357
GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA	384

f L A

(7) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 6

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 27 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): não

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.6:

5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3'

(8) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 7

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

- (A) COMPRIMENTO: 29 bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) TIPO DE CADEIA: simples
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): sim

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.7:

5' GGS TGT TGT GCT AGC TGM RGA GAC RGT GA 3'

(9) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID NO: 8

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA

(A) COMPRIMENTO: 420 bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: sim

(iv) SENTIDO INVERSO ("ANTI-SENSE"): não

(ix) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID NO.8:

sequência pag 76

ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT 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	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	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 TTC AAT GTC TCG GGC GCA GCG ACC ACG GTC	408
ACC GTC TCT GCA	420

Lisboa, 28 de Agosto de 2000
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de

1) um anticorpo anti-CD20 quimérico imunologicamente activo num humano, em que o referido anticorpo anti-CD20 quimérico deriva de um transfectoma que compreende anti-CD20 em TCAE 8, tal como depositado na "American Type Culture Collection" com o número de depósito ATCC 69119; e

2) um anticorpo anti-CD20 marcado radioactivamente no referido humano, para a produção de uma preparação combinada para utilização separada ou sequencial no tratamento do linfoma de células B num paciente.

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o referido anticorpo anti-CD20, marcado radioactivamente compreende um anticorpo monoclonal segregado a partir de um hibridoma identificado pela "American Type Culture Collection" com o número de depósito HB 11388.

3. Utilização de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, em que o anticorpo anti-CD20 quimérico e o referido anticorpo anti-CD20 marcado radioactivamente são administrados a períodos de cerca de uma semana um do outro.

4. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 3, em que o anticorpo anti-CD20 quimérico e o referido anticorpo anti-CD20 marcado radioactivamente são administrados, a uma dose por semana, durante um período entre 2 e 10 semanas.

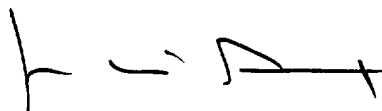
5. Utilização de acordo com a reivindicação 4, em que se administra uma dose terapêutica do anticorpo anti-CD20

quimérico, seguido dentro de cerca de uma semana de uma dose de anticorpo anti-CD20 marcado radioativamente, opcionalmente combinado com um anticorpo anti-CD20 quimérico.

6. Utilização de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 4, em que se administra uma dose terapêutica do anticorpo anti-CD20 marcado radioativamente, seguido de tratamentos simples ou múltiplos com o referido anticorpo anti-CD20 quimérico.
7. Utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, em que, antes da administração do anticorpo anti-CD20 marcado radioativamente, se faz a recolha de hemocitoblastos periféricos ou medula óssea a partir do paciente a que foi administrado anticorpo anti-CD20 marcado radioativamente.
8. Utilização de acordo com a reivindicação 7, em que os referidos hemocitoblastos periféricos ou medula óssea são re-infusados no referido paciente, caso se observe uma toxicidade substancial da medula óssea, por administração do referido anticorpo anti-CD20 marcado radioativamente.
9. Transfectoma que compreende uma célula hospedeira incluindo um ADN plasmídeo que está depositado na American Type Culture Collection com o número de depósito ATCC 69119, em que o plasmídeo compreende ADN que codifica para anti-CD20 TCAE 8.
10. Transfectoma de acordo com a reivindicação 9, em que a célula hospedeira é uma célula hospedeira de mamífero.
11. Transfectoma de acordo com a reivindicação 10, em que a referida linha de células hospedeiras de mamífero é uma linha celular CHO ou SP2/0.

12. Transfectoma de acordo com a reivindicação 11, em que a referida linha de células hospedeiras de mamífero é DG44.
13. Método para a produção de um anticorpo anti-CD20 quimérico que compreende:
- a) transfectar uma linha de células hospedeiras com ADN plasmídeo que está depositado na American Type Culture Collection com o número de depósito da ATCC 69119, em que o plasmídeo compreende ADN que codifica para anti-CD20 TCAE 8, para formar um transfectoma;
 - b) fazer a cultura do transfectoma do passo (a) sob condições para produzir o anticorpo antiCD20 quimérico; e
 - c) fazer a recolha do anticorpo anti-CD20 quimérico.
14. Método de acordo com a reivindicação 13, em que a referida linha de células hospedeiras é de origem mamífera.
15. Método de acordo com a reivindicação 14, em que a referida linha de células hospedeiras é a linha celular CHO ou SP2/0.
16. Método de acordo com a reivindicação 15, em que a referida linha de células hospedeiras é DG44.

Lisboa, 28 de Setembro de 2000
O AGENTE OFICIAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL



FLA

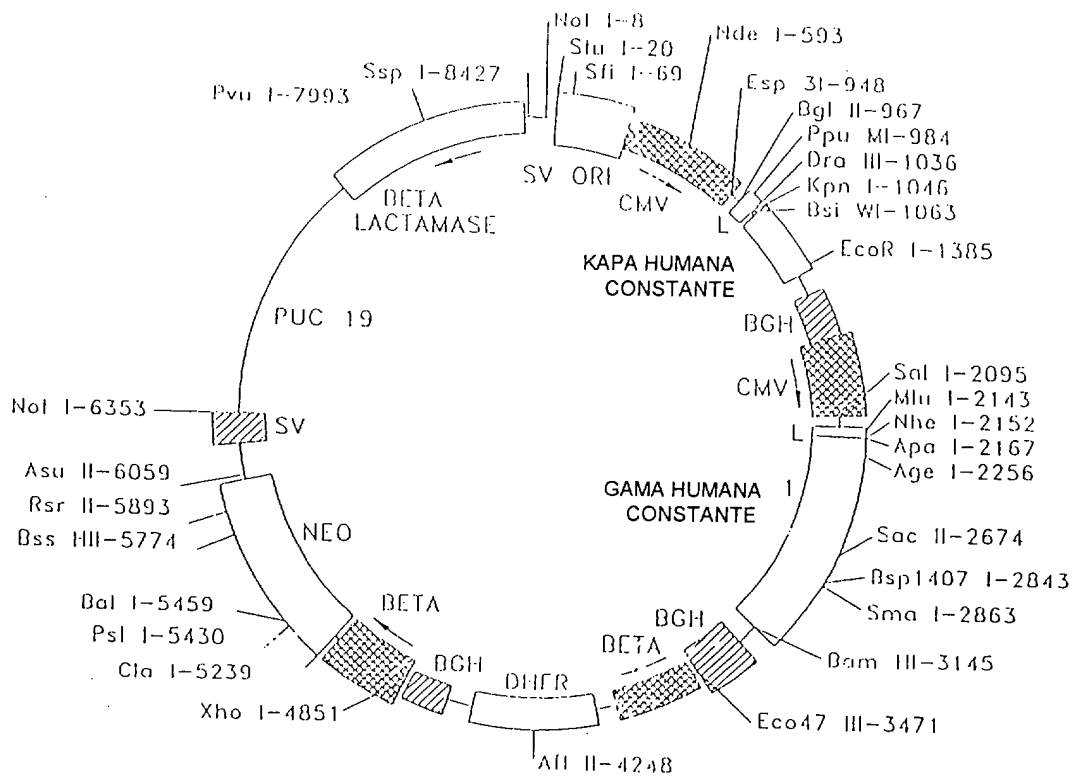


FIG. 1

f L A

ORIGEM DE SV40=332pb

LIGANTE #1 15bp |

GACCTGCGCG CCGCTCTAGG COTCCAAAA AGCCTGCTCA CTACTTCCTGG AATAGCTCAG 60

AGGCGGAGGG CCGCTCGGGC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCLA TGCATGGGG 120

GGAGAAAGGG CCGAACTGGG CCGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGGGGACT 180

ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

GACTTTCCAC ACCTGGTTGG TGAATAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCTCTCT 300

GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACACAAT TAATTCCCCT 360

LIGANTE #2=13pb

347'8 360'1

AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCCGCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480

PROMOTOR POTENCIADOR DE CMV=567pb

ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACCCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTSTA TCATATGCCA 600

AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGGCGG CCTGGCATTG TGGCCAGTAC 660

ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720

ATGGTGATCC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840

GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900

LIGANTE #3=76pb

727'8

CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960

Bgl II

978'9

CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020

+1 101 102

1038'9

107 108

1062'3 Bsi WI

CTCCCAGGTG CACGATGTCA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080

TCTGTCTTCA TCTTCCCCCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG CTCTGTTGTG 1140

TGCCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGG GGATAACGCC 1200

CONSTANTE KAPA HUMANA 324pb 107 AMINOÁCIDO & CODÃO STOP

CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260

AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320

TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCGGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380

STOP

CADEIA

LEVE Eco RI

LIGANTE #4=85 pb

TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1440

1386'7

GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTCCCA GCCATCTGTT 1500

1471'2

FIG.2A

f L A

GTTTGCCCCC CCCCCGTGCC TTCCCTTGACC CTGGAAGGTC CCACTCCCA C TGTCCCTTTCC 1560
 BGH poly A=231pb
 TAATAAAATG AGCAAAATTGC ATCCGATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TGTGGGGGGT 1620
 CCGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TCGTGGGGAT 1680
 CCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTC 1740
 1702 13 1717 8
 ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCGGCGTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800
 TTCCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATCGGGTTTT 1860
 PROMOTOR POTENCIADOR DE CMV=334pb
 GGCAGTACAT CAATGGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACC GGGATTTCGA AGTCTCCACC 1920
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACCGGACTTT CAAAAATGTC 1980
 GTAACAATC CGCCCCATTG AGCAAAATGG GCGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2100
 2051 12 2058 9 LIGANTE #6=7pb Sal I
 ATCGGTTTGA GCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCCGTGTTG CTACCGGTGT CGCTAGCACC 2160
 "LEADER"=51pb Mlu I 2151 12 Nhe I
 START HEAVY CHAIN -5 -4 -3 114 115
 AAGGGCCCCAT CCGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCC 2220
 GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCGCAACCGG TGACGGTGTC GTGGAATCA 2280
 GCGGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCIC AGGACTCACC 2340
 TCCCTCAGCA CCGTGGTGAC CGTCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400
 993pb=330 AMINOÁCIDO & CODÃO STOP
 AACGTGAATC ACAAGCCCAAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460
 GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTGAGTC 2520
 TTCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCGGACCCC TGAGGTCACA 2580
 TCGGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640
 GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700
 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGACTACAAG 2760
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820
 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCGGGGATGA GCTGACCAGG 2880
 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CCGCGTGGAG 2940
 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 3000

FIG.2 B

FLA

GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGGTC ACCGTGGACA AGAGCAGCTG GCAGCAGGGG 3060
 AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GGTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAAGAGC 3120
 STOP CADEIA PESADA | Bam HI LIGANTE #7=81pb
 CTCTCCCTGT CTCGGGGTAA ATCAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
 3144 15
 TCGTGACAAC ATCGGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CTTTCTAGTT 3240
 3225 16
 GGCAGCCATC TGTGTTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3300
 REGIÃO DE POLIADENILATAÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO BOVINA=231pb
 CCACTGTCTT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCAAT 3360
 CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA CGATTGGGAA GACAATAGCA 3420
 LIGANTE #8=34pb
 GGCATGCTEG CGATGCGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480
 3456 17
 CCGGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 3540
 3490 1
 AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
 PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATINHO=366pb
 AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GACGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACGAA 3720
 GGCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GGTACACACG CATAGAGAGG 3780
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
 LIGANTE #9=19pb DHFR 5'NÃO TADUZIDO=82pb
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCCGGC 3900
 3856 17 3875 16 INICIO DHFR
 CAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG 3960
 3957 18
 GTTCGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020
 GACCTACCCT GGCCTCCCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
 TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140
 DHFR DE RATINHO=564 pb=187 AMINOÁCIDO & CODÃO DE STOP
 CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAA 4200
 GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260
 GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGA TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
 TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
 GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
 GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

FIG.2C

f l a

STOP DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGACATA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4550
 4521' 2 LIGANTE #10=10pb
 DHFR 3' NÃO TRADUZIDO=82pb
 CATGCATTT TTATAAGACC A CGGACTTT TCTTGGCTTT AGATCAGCTT CGACTGTCTT 4610
 4603' 4 4613' 4
 TCTAGTTTC CAGCCATCTG TTSTTTGCCC CTCCCCCGTG CTTTCTTGA CCTTGAAGG 4660
 REGIÃO DE POLIADENILATAÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO BOVINA=231pb
 TCCCACTCCC ACTGTCTTT CTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTGAGCTAC 4850
 4844' 5 LIGANTE #11=17pb
 TACCTTTGCT TCTCAATTC TTATTTGCAT AATCAGAAAA AAAGGAAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAAATCCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4950
 PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATINHO=366pb
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATTC 5100
 CCTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GCCAGGAGCC 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 LIGANTE #12=21pb INICIO NEO
 TTCTGTTCGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GGTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTT 5260
 5227' 8 5248' 9
 TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCCG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGGCG CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400
 NEOMICINA FOSFOTRANSFERASE
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAAGTGA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460
 795pb=264 AMICÓCIDOS & CODÃO DE STOP
 CAGGACGGGC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GCGGAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCTGTCA TCTACCTTG CTCTCCCGA 5580
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CCGCTACCTG 5640
 CCCATTCCAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TCGAAGCCGG 5700
 TCTTGTCCAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760
 CCGCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGCCG AATATCATCG TCGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880
 GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940
 GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCGGATTC 6000

FIG. 2D

f L A

STOP NEOI
 GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC TCAGCGGGAC TCTGGGTTTC 6060
 604314
 GAAATGACCG ACCAAGCGAC GGGCAACCTG CCATCAGUAG ATTTCGATTC CACCGCGCGC 6120
 NEO 3' NÃO TRADUZIDO=173pb
 TTCTATGAAA GGTTCGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180
 CCGCGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTATTATTC AGCTTATAAT 6240
 621617
 GGTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TCACTGCAT 6300
 SV40 POLY A INICIAL=133pb LIGANTE #13=19pb
 TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGCTGGAT CCGCGCGCGC 6360
 6349150
 ATCCCGTCCA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420
 636819
 CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCC 6480
 AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TCGGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540
 ACCTGTGGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCGTA 6600
 PVC 19
 TTGGGCGGTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTCGG CTCGGTCGTT CGGCTCGGCG 6660
 GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720
 CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCGCGCT 6780
 6792=ORIGEM BACTERIANA DA REPLICAÇÃO
 TGCTGGCGTT TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840
 GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGTTTTCCC CCTGGAAGCT 6900
 CCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCTGCG CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960
 CTTCCGGGAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020
 TCGTTCCGTC CAAGCTGGGC TGTGTGCAGC AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCCGCT 7080
 TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CCGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGCGAG 7140
 CAGCCACTCG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CCGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200
 AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260
 AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG 7320
 GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380
 AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAC TCACGTTAAG 7440
 GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

FIG. 2E

f L A

STOP BETA LACTAMASE
 GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT 7550
 .TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTG TTCATCCATA GTTGCCCTGAC 7620
 TCCCCGTGCT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
 TGATACGGCG AGACCCACCG TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740
 BETA LACTAMASE=861pb
 GAAGGGGGGA GCGCAGAACT GGTCTTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800
 286 AMINOÁCIDOS & CODÃO DE STOP
 GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCCG CAGTTAATAG TTTGCCCAAC GTTGTTGCCA 7860
 TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920
 CCCAACCATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
 TCGGTCTCTC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCACT GTTATCACTC ATGCTTATGG 8040
 CAGCACTGCA TAATTCCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTCGTG 8100
 AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATCGGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160
 CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220
 AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTGGATGT 8280
 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTTCTGGGT 8340
 GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CCGAAATGTT 8400
 INICIO BETA LACTAMASE
 GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460
 8410
 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
 TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

FIG. 2F

f L A

LIGANTE #1=15pb
 GACGTGGGGG CCGCTCTAGG COTCCAAAAA AGCCTCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
 15 6
 AGGCGGAGGC GGCCTCGGCC TGTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCACCCA TGCATGGGG 120
 ORIGEM DE SV40=332pb
 GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CCGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GCGCGGGACT 180
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TGTGCTGCT 300
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCTCT 360
 347 8 LIGANTE #2=13pb
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGG 420
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
 PROMOTOR-POTENCIADOR DE CMV=567pb
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGGCAGTAC 660
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
 ATGGTGATGC GGTTTTGSCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGA 780
 TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
 GACTTTCCAA AATGTGCTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
 LIGANTE #3=7pb
 CCGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
 927 8 934 6
 Bgl 2 INICIO CADEIA LEVE "LEADER" NATURAL=66pb
 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 CCCAAACCCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200
 REGIÃO VARIÁVEL DE CADEIA LEVE 318pb 106 AMINOÁCIDO
 CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTA CTCTCTCT 1260
 ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
 AACCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380
 1362 3 BsiWI
 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACATG CTCTGTTGTG 1440
 TGCTGCTGA ATAACCTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAACGCC 1500

FIG. 3A

f L A

CONSTANTE KAPA HUMANA=324pb=107 AMINOÁCIDOS & CODÃO DE STOP

CTCCAATCGG GTAACGCCCA GGAGAGTGTG ACAGAGGAGG ACAGCAACCA CAGGACCTAC 1550
 AGCCTCAGCA GCACCCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTAGG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620
 TCGGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCGCTCAGAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1650

STOP
 CADEIA LEVE Eco RI LIGANTE #4=81pb
 TGTGGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1740
 1646 17

GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800
 1771 12

GTTTGCCCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCTTTCC 1860
 TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920

REGIÃO DE POLIADENILATAÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO BOVINA=231pb
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGCCA TGCTGGGGAT 1980

LIGANTE #5=15pb
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCATTG 2040
 2002 3 2017 8

ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCGCCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2160

PROMOTOR-POTENCIADOR DE CMV=334pb
 GCGAGTACAT CAATGGGGCT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCOA AGTCTCCACC 2220
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280
 GTAACAACCT CGCCCCATTG ACCCAAATCG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTAT 2340

LI LIGANTE #6=7pb Sal I
 TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCCAG 2400
 INICIO 2351 2 2358 9

CADEIA PESADA "LEADER" SINTÉTICO E NATURAL Mlu I 2457 8
 ATCGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCCT GTGCTGTGG CTACCGGTGT CCGTGTCCAG 2460
 2401 -5 -4 -3 -2 -1 +1

GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520
 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCACT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580

CADEIA PESADA VARIÁVEL=363pb=121 AMINOÁCIDO
 GGTCCGGGGCC TGGAAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2640
 CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700
 CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760
 TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACCGTCAC CGTCTCTGCA 2820

Nhe I
 CCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880
 GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTCG 2940

CONSTANTE GAMA 1 HUMANA=993pb
 TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTA 3000

FIG. 3B

f L A

330 AMINOÁCIDO & CODÃO DE STOP

GGACTCTACT CCTCAGGAG CGTGGTGACC GTGCCCCCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060
TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCGAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120
AAATCTTGTG AAAAACTCA CACATGCCCA CGTGGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180
CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCAAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240
GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300
TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CCGGGGAGGA GCAGTACAAC 3360
AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCTCACC GTCTGACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC GTCCAGCCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480
AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TCCCCCATC CCGGGATGAG 3540
CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600
GCGGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGCCAGCCG GAGAACAAC AAGAGCCAC GCCTCCCGTG 3660
CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720
CAGCAGGGCA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAGC 3780
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA ^{13am HI} TTAACGGTTA CCACTACCT 3840
AGACTGGATT CGTGACAACA TCGGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC ^{3813¹⁴} TCGACTGTGC 3900
CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTITGCC CCGCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960
GTGCCACTCC CACTGTCCCT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020
CGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080
ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GGTCTATGGA ACCAGCTGGG ^{LIGANTE #8=34pb} GCTCGACAGC 4140
GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCATTCTTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200
AGGAAAATTA ATTTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATCCGTT GCCAAAAAGG 4260
ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTGAG AGGGAGTACC 4320
CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380
ATCACCGAAG CCGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGCTAAG GCCCAATCTG CTCACACAGG 4440
ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

FIG. 3 c

f L A

LIGANTE #9=19pb DHFR 5' NÃO TRADUZIDO=82pb

CATTTCTTTC TCACATAGTT GTGTTGGGAG CTTGGATAGC TTGGACAGCT CAAGGCTGCC 4560
4525'6 4544'5

ATTTTCCGCC AAACCTTGACC GCAATCCTAG CGTGAAGGCT GGTAGCATT TATCCCGCT 4620

INICIO DHFR

GCCATCCTGG TTGACCATTT GAACTGCATC GTCGCCGCTG CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680
4626'7

AAGAACGGAG ACCTACCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAAGAATG 4740

ACCACAACCT CTTCACTGGA AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAACACCTGG 4800

DHFR=564pb=187 AMICNOÁCIDO & CODÃO DE STOP

TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860

GAACTCAAAG AACCACCAGG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGGG TGATGCCCTTA 4920

AGACTTATTG AACAAACCGGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCCGAGGC 4980

AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040

ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAAA 5100

CTTCTCCAG AATACCCAGG CGTCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT 5160

STOP DHFR DHFR 3' NÃO TRADUZIDO =82pb

AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220
5140'1

CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCCTC 5280
5272'3

LIGANTE #10

GATCTGTCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCTTTGAC 5340
=10bp

POLIADENILATAÇÃO DA HORMONA DE CRESCIMENTO BOVINA=231pb

CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCTTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG 5400

TCTGAGTAGG TGTCAATTCTA TTCTGGGGGG TGGGTTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460

LIGANTE #11

TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGGGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC 5520
5513'4

=17bp

TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 5580
5530'1

PROMOTOR PRINCIPAL DE BETA GLOBINA DE RATINHO=366pb

AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5700

GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760

GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 5820

GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 5880

LIGANTE #12=21pb INICIO NEO

CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTTTC GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940
5896'7 5917'8

CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTGGCC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

FIG. 3 D

f L A

AATCGGCTGC TCTGATGCGG CCGTGTTCGG CCGTGTACGG CAGGGGGCGG CCGTTCTTTT 6060
 NEOMICINA FOSFOTRANSFERASE=795pb=264 AMINOÁCIDO & CODÃO DE STOP
 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAACGGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120
 CTGGCTGGCG ACCGACGGGCG TTCTTTGGCG AGCTGTCTTC GACGTTGTCA CTGAAGCGCG 6180
 AAGGGACTGG CTGCTATTGG CGGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTGAT CTCACCTTGC 6240
 TCTGCGCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGAATGCGG CCGCTGCATA CGCTTGATCC 6300
 GCTACCTGC CCATTGGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360
 GGAAGCGCGT CTGTGCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420
 CGAACTGTTG GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCGCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480
 TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA 6540
 CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA CGGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600
 TCTGAAGAG CTGGGGGCGG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660
 TCCCGATTGG CAGCCCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCG GAGCGGCACT 6720
 STOP NEOI
 6712 3
 CTGGGGTTGG AAATGACCGA CCAAGCGAGC CCAACCTGC CATCAGGAGA TTTCGATTCT 6780
 NEO 3' NÃO TRADUZIDO=173pb
 ACCGCGCCCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CCGCTGGATG 6840
 ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTGGCCC ACCCGAACTT GTTTATTGCA 6900
 6885 6
 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960
 REGIÃO DE POLIADENILATAÇÃO INICIAL DE SV40=133pb
 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020
 7018 9
 LIGANTE #13=19pb
 GCGGCGCGGA TCCCGTTCGAG AGCTTGGCGT AATCATEGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 7037 8
 PUC 19
 ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCCT 7140
 GCGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCGGCTTTCC 7200
 AGTCGGGAAA CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 7260
 GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGTTTC 7320
 GCGTGGGCGG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380
 GGCATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440
 7461=ORIGEM BACTERIANA DE REPLICAÇÃO
 AGGCGCGGTT CCGTGGCGTTT TCCATAGGC TCGCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

FIG. 3 E

f L A

CACCGCTCAAG TCACAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AACATACCAAG CGGTTTCCCG 7560
 CTGGAAGCTC CCTCGTGGCG TCTCTGTTC CGACCGCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
 CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGGTGTAGG TATCTCAGTT 7680
 CCGGTGTAGGT CGTTCCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCGAC 7740
 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAG TATCGTCTTG AGTCCAACCC CGTAAGACAC GACTTATCGC 7800
 CACTGGCAGC AGCCACTGCT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
 AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTCCG 7920
 CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GCGAAACAAA 7980
 CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG 8040
 GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CCGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAACT 8100
 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA 8160
 ATAAAAATG AAGTTTTTAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT ^{STOP} 8220
BETA LACTAMASE
 ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCGT TCATCCATAG 8280
 TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAALTA CCATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340
 GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 8400
 BETA LACTAMASE=861pb AMINOÁCIDO & CODÃO DE STOP
 AGCCAGCCCG AAGGCGCGAG CGCAGAAGTG GTCTGCAAC TTTATCCGCG TCCATCCAGT 8460
 CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTCCGCCAAC 8520
 TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGGTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580
 GGTCCGGTTC CCAACGATCA AGCCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640
 TTAGCTCCTT CGGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA 8700
 TGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
 TGA CTGGTGA GTACTGAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820
 CTTCGCCGGC GTCAATACCG GATAATACCG CCCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCC GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
 GGTGGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000
 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGCGGACAC 9060
 GGAAATGTTG AATACTCATA ^{INICIO BETA LACTAMASE} CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAACCAT TATCAGCGTT 9120
 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATACGGCTTC 9180
 CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

FIG. 3F

f L A

"LEADER"

										-20											-15											-10																																										
FRAME 1										Met	Asp	Phe	Gln	Val	Gln	Ile	Ile	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser	Val																																																
										ATG	GAT	TTT	CAG	GTG	CAG	ATT	ATC	AGC	TTC	CTG	CTA	ATC	AGT	GCT	TCA	GTC																																																
										987											996											1005											1014											1023																				
										-5											-1	+1	FR1																				10																															
Ile										Met	Ser	Arg	Gly	Gln	Ile	Val	Leu	Ser	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Leu	Ser	Ala	Ser																																															
ATA										ATG	TCC	AGA	GGA	CAA	ATT	GTT	CTC	TCC	CAG	TCT	CCA	GCA	ATC	CTG	TCT	GCA	TCT																																															
										1038											1047											1056											1065											1074											1093									
																				20											23	24	CDR1										27	29	30											34																		
Pro										Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Ile	His																																															
CCA										GGG	GAG	AAG	GTC	ACA	ATG	ACT	TGC	AGG	GCC	AGC	TCA	AGT	GTA	AGT	TAC	ATC	CAC																																															
										1095											1104											1113											1122											1131											1140									
										35	FR2																				40											45											49	50	CDR2																			
Trp										Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn																																															
TGG										TTC	CAC	CAC	AAG	CCA	GGA	TCC	TCC	CCC	AAA	CCC	TGG	ATT	TAT	GGC	ACA	TCC	AAC																																															
										1152											1161											1170											1179											1188											1197									
										55	56	57											60	FR3																				65											70																			
Leu										Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser																																															
CTG										GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GCC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACT	TCT	TAC	TCT																																															
										1209											1218											1227											1236											1245											1254									
																				75											80											85											88	89	90																			
Leu										Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp																																															
CTC										ACC	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAT	TAC	TGC	CAG	CAG	TGG																																															
										1266											1275											1284											1293											1302											1311									
																														95											97	98	FR4																				105											107
Thr										Ser	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys																																																		
ACT										AGT	AAC	CCA	CCC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA																																																		
										1323											1332											1341											1350											1359																				

FLAP

"LEADER"

-19	-15	-10	-5
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
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 35 136
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 CCG 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

f l A

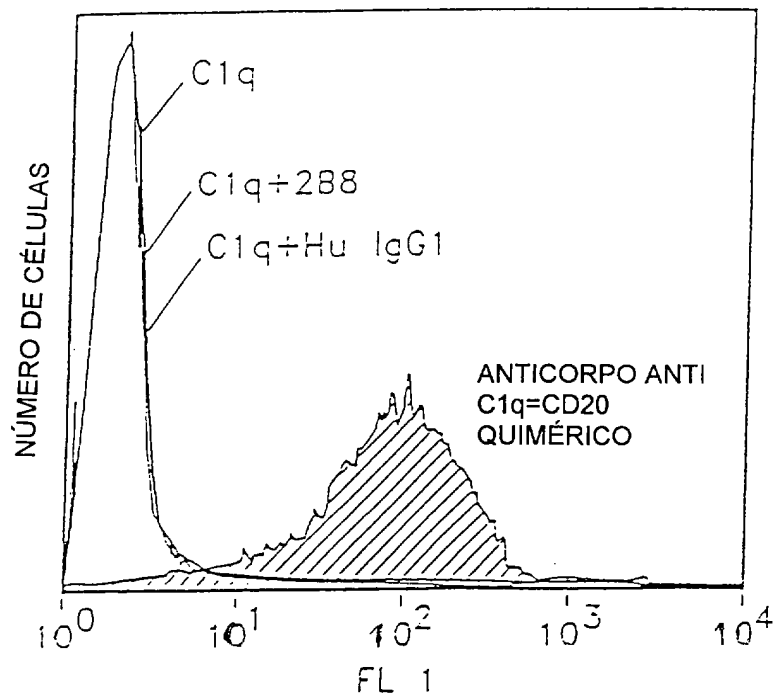


FIG. 6

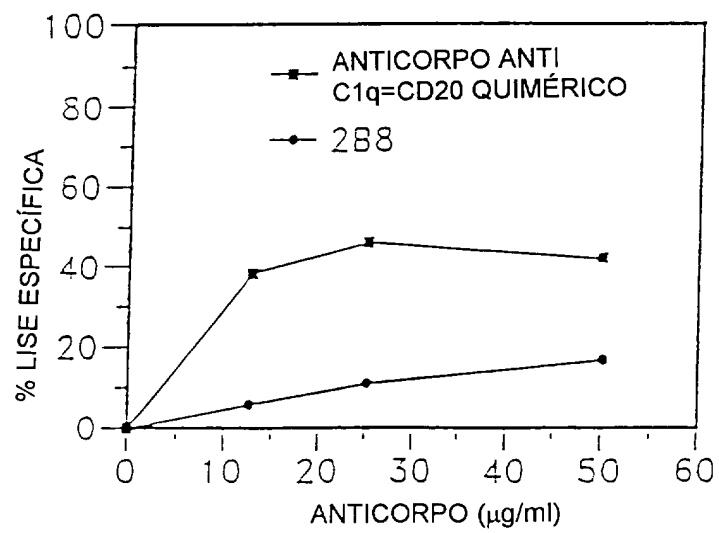


FIG. 7

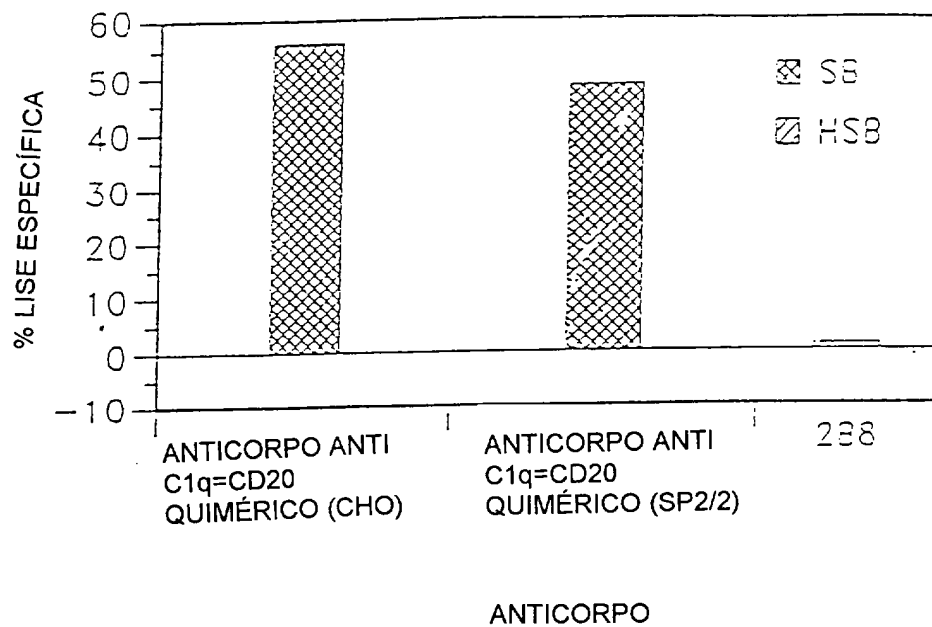


FIG. 8

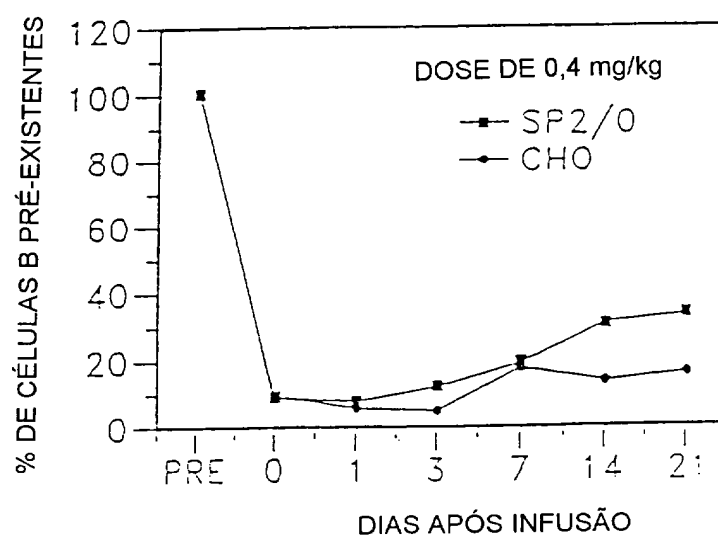


FIG. 9 A

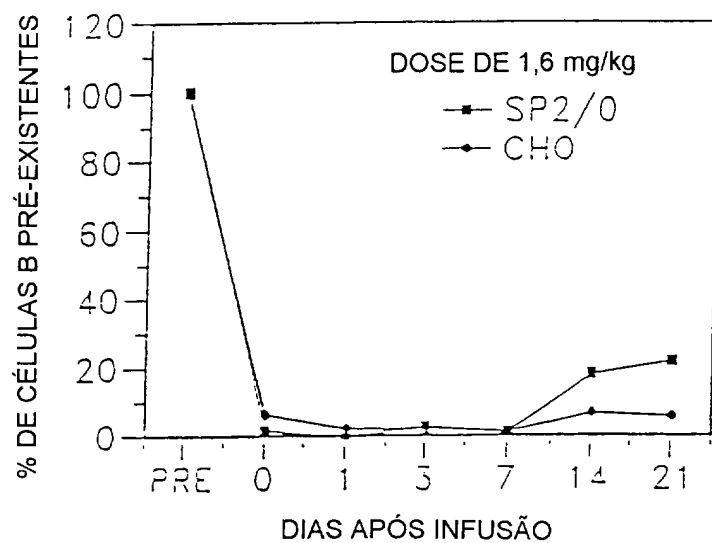


FIG. 9 B

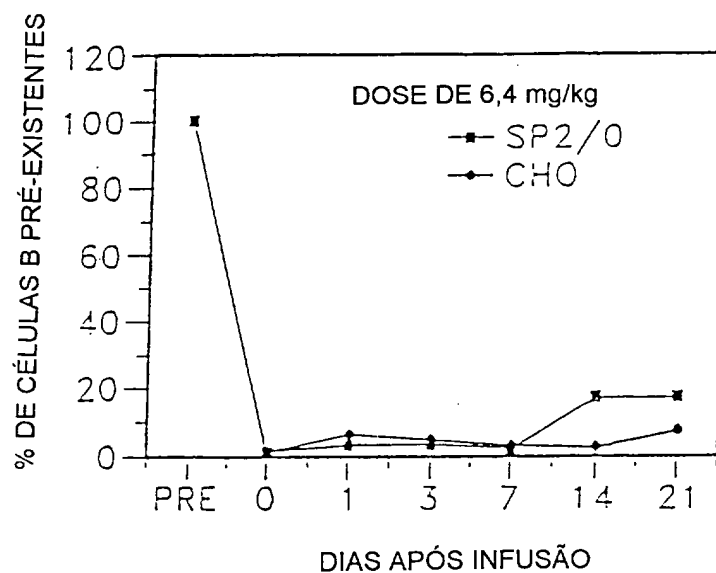


FIG. 9 C

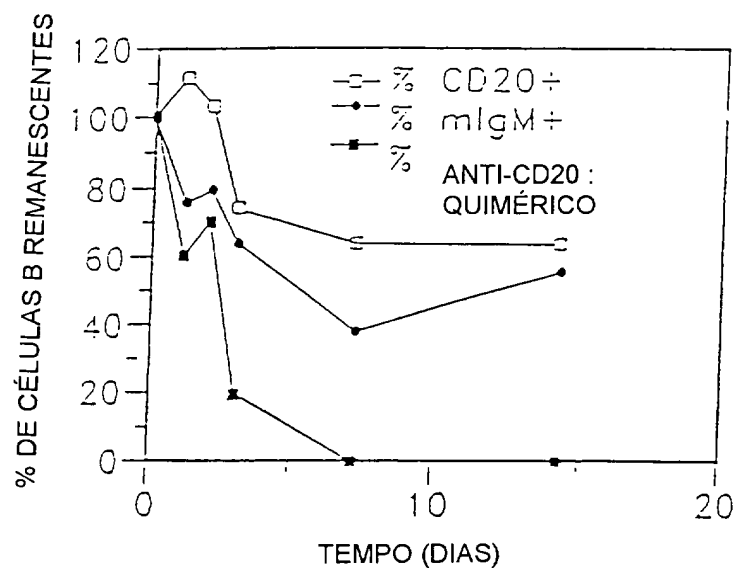


FIG. 10

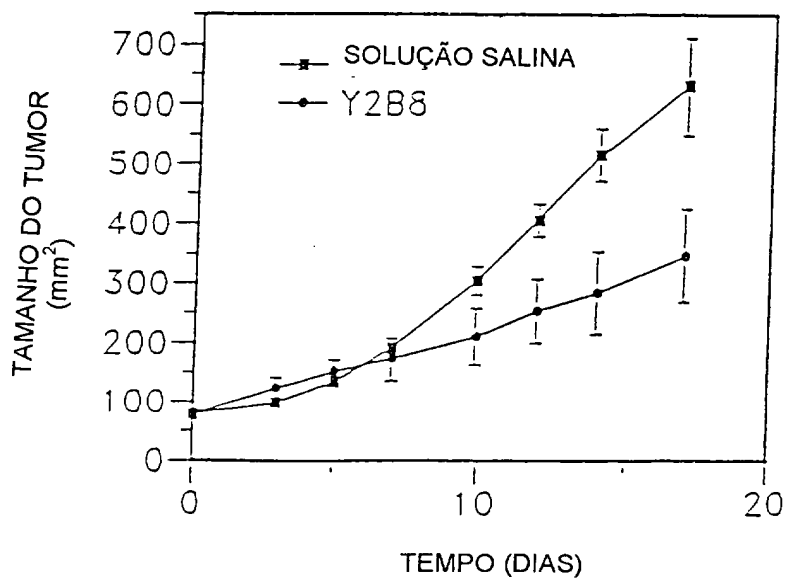


FIG. 11

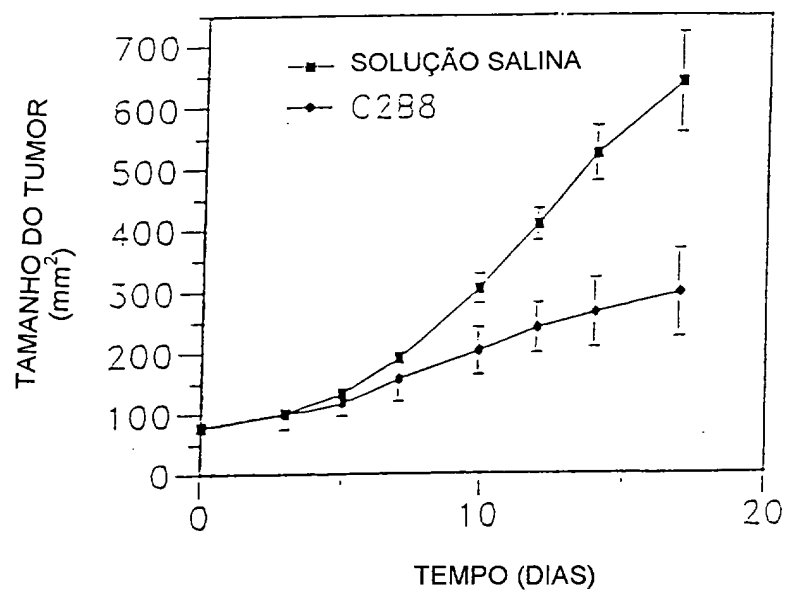


FIG.12

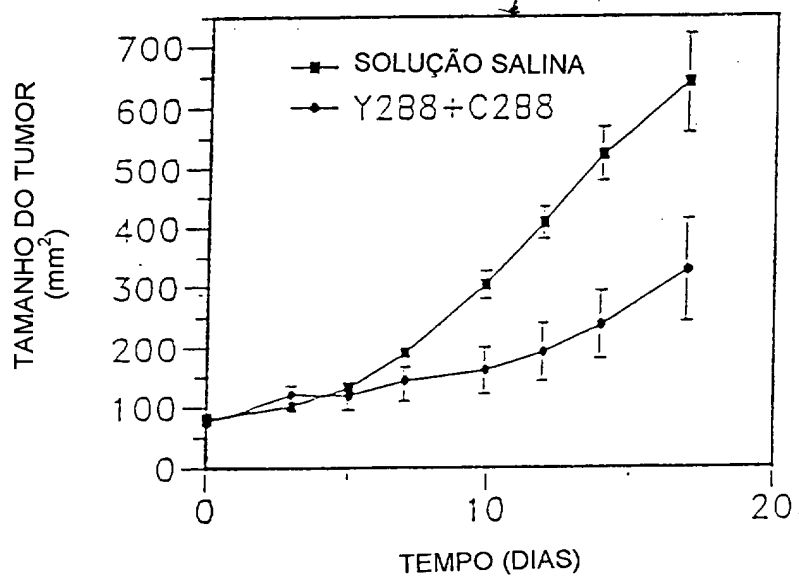


FIG. 13

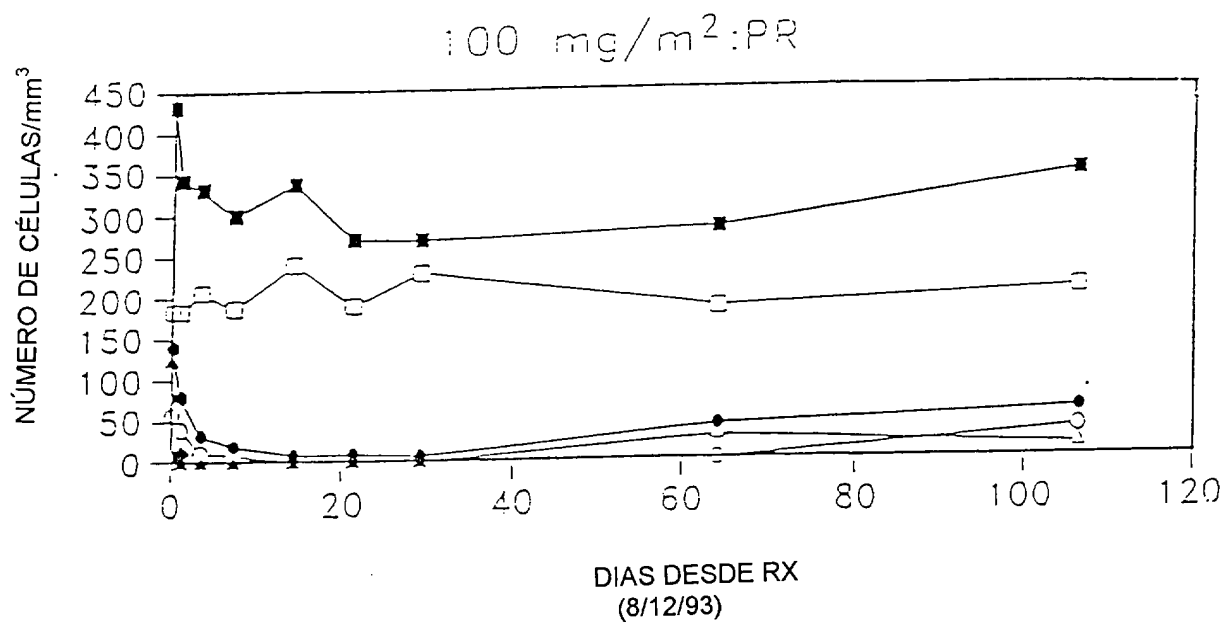


FIG. 14 A

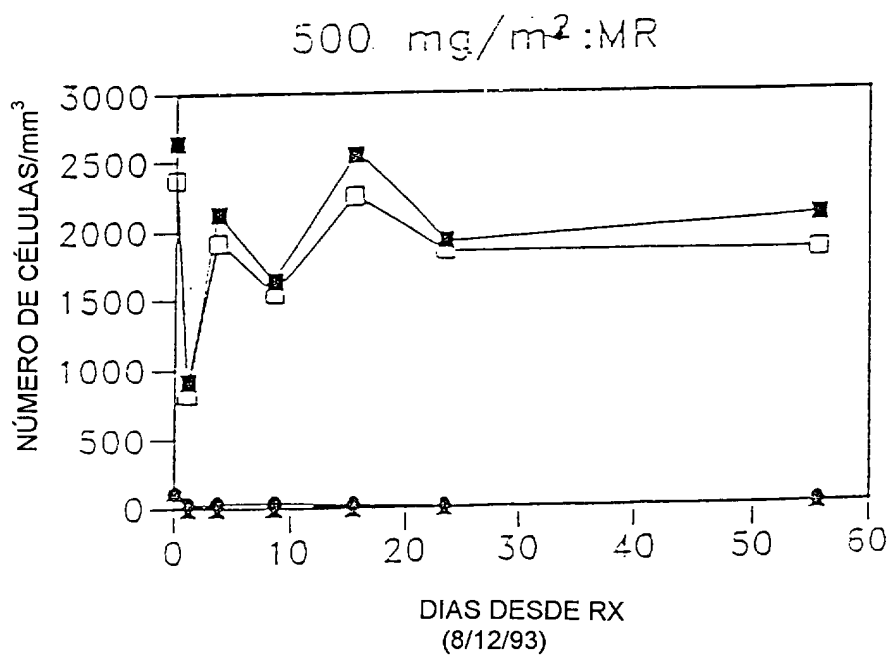


FIG. 14 B