

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2004.11.11	(73) Titular(es): THERAMAB LLC 8 STR. 1 NAUCHNY PROEZD MOSCOW 117246 RU
(30) Prioridade(s): 2003.11.11 DE 10352900	
(43) Data de publicação do pedido: 2005.11.30	(72) Inventor(es): THOMAS HANKE DE
(45) Data e BPI da concessão: 2012.08.15 194/2012	(74) Mandatário: ANTÓNIO INFANTE DA CÂMARA TRIGUEIROS DE ARAGÃO RUA DO PATROCÍNIO, Nº 94 1399-019 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **UTILIZAÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA ACTIVA QUE SE LIGA A CD28 PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE B-CLL**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO REFERE-SE À UTILIZAÇÃO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL SUPERAGONISTA (MAB) QUE É ESPECÍFICO PARA UM RECEPTOR NATURALMENTE COESTIMULADOR, QUE É EXPRESSO EM CÉLULAS T, OU DE UM COMPOSTO MIMÉTICO DESTES, PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE DOENÇAS QUE ACOMPANHAM A CAPACIDADE DIMINUTA DE COESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS T, EM PARTICULAR A B-CLL.

RESUMO

"UTILIZAÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA ACTIVA QUE SE LIGA A CD28 PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE B-CLL"

A invenção refere-se à utilização de um anticorpo monoclonal superagonista (mAb) que é específico para um receptor naturalmente coestimulador, que é expresso em células T, ou de um composto mimético deste, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de doenças que acompanham a capacidade diminuta de coestimulação de células T, em particular a B-CLL.

DESCRIÇÃO

"UTILIZAÇÃO DE UMA SUBSTÂNCIA ACTIVA QUE SE LIGA A CD28 PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA O TRATAMENTO DE B-CLL"

Domínio da invenção.

A invenção refere-se à utilização de uma substância activa para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento da leucemia linfocítica crónica do tipo de células B (B-CLL).

Antecedentes da invenção e estado da técnica.

Para a compreensão da invenção, são em primeiro lugar importantes os seguintes antecedentes tecnológicos. A activação de células T em repouso para a proliferação e diferenciação funcional requer em primeiro lugar a ocupação de duas estruturas de superfície, assim designados receptores: 1. o receptor de antigénio, que possui uma especificidade diferente de célula para célula e é necessário para o reconhecimento de antigénios, p. ex., produtos de cisão viral; bem como 2. a molécula de CD28, expressa de modo idêntico em todas as células T em repouso, com excepção de um subgrupo das células T CD8 de humanos, que se liga naturalmente a ligandos sobre a superfície de outras células do sistema imunitário. Está-se a falar da coestimulação da reacção imunitária específica para o antigénio através de CD28. Em cultura de células, estes passos podem ser simulados

por ocupação do receptor de antigénio, bem como da molécula de CD28, com anticorpos monoclonais adequados (mAb). No sistema clássico da coestimulação, nem a ocupação do receptor de antigénio, nem a da molécula de CD28 isoladamente conduz à proliferação de células T, no entanto a ocupação de ambos os receptores é eficaz. Esta observação foi efectuada em células T de humanos, ratinho e rato.

Em oposição a isso, também são conhecidos mAb específicos de CD28 que podem desencadear sozinhos a proliferação de células T sem coestimulação. Uma activação superagonista de linfócitos T em repouso deste tipo, isto é, independente da ocupação do receptor de antigénio, por mAb específicos de CD28 é conhecida da referência da literatura Tacke *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 1997, **27**: 239 - 247. De acordo com isso foram descritos dois tipos de anticorpos monoclonais específicos de CD28 com diferentes propriedades funcionais: mAb coestimuladores, que coestimulam a activação de células T em repouso apenas no caso de ocupação simultânea do receptor de antigénio; e mAb superagonistas, que podem activar para a proliferação linfócitos T de todas as classes sem ocupação do receptor de antigénio, *in vitro* e em animal de laboratório. A partir das referências da literatura DE 19722888, WO 03/048194 A e PCT/DE03/00890 são igualmente conhecidos mAb específicos de CD28, que activam eficientemente os linfócitos T tanto *in vitro* como também *in vivo*, sem estimulação por TCR, actuando portanto de modo "superagonista". Estes mAb, pelo menos aqueles que são orientados contra CD28 humano, são também designados por SuperMAB.

A leucemia linfática crónica da série de células B (leucemia linfocítica crónica do tipo de células B, B-CLL)

representa a leucemia mais frequente dos adultos, com uma incidência de 3/100000 habitantes (Landis *et al.*, 1999). A doença é caracterizada por uma acumulação progressiva de linfócitos B monoclonais malignos no sangue, nódulos linfáticos, fígado e medula óssea. Com a progressão da doença chega-se a um aumento do número de linfócitos no sangue, a uma ampliação de nódulos linfáticos, fígado e baço, bem como a uma anemia e trombocitopénia (Caligaris-Cappio, 2000; Rozman and Montserrat, 1995). À data, não é possível uma terapia curativa da B-CLL.

Entre as principais complicações na B-CLL contam-se infecções pelas quais são tornados responsáveis, entre outros, os defeitos nas células T ou valores diminutos de células T observados em vários doentes (Cantwell *et al.*, 1997; Scrivener *et al.*, 2003).

Além disso, também no caso das próprias células tumorais pode encontrar-se uma função restringida. Assim, a propriedade das células B B-CLL para agirem como células apresentadoras de antigénios (APZ), e com isso serem reconhecidas por células T específicas de tumores e eliminadas, está massivamente restringida. Isto baseia-se, entre outros, no facto de células B B-CLL não expressarem ou expressarem apenas de forma insuficiente os ligandos naturais de CD28, CD80 (= B7.1) e CD86 (= B7.2) na sua superfície celular. Com isso as células T potencialmente específicas de tumores obtêm apenas um único sinal, através da interacção entre o receptor de células T e MHC + antigénio tumoral e não o segundo sinal coestimulador necessário para a completa activação de uma célula T. Em resumo, isto indica que o sistema imunitário de doentes de B-CLL não consegue obviamente eliminar as células T por si próprio.

Uma preparação para uma forma de terapia tem como objectivo melhorar a função de APZ das células B B-CLL e com isso reforçar a resposta imunitária antitumoral do doente. Para o efeito, diferentes grupos de trabalho procuraram activar de forma orientada células B B-CLL e com isso induzir a expressão de ligandos coestimuladores. Neste caso, por meio de transferência de genes, alcançou-se a expressão do ligando CD40 estimulador de células B (CD40L) nas células B B-CLL e com isso possibilitar a interacção entre CD40L e a proteína CD40 presente em todas as células B (inclusivamente nas células B B-CLL). O sinal transmitido através de CD40 no interior das células conduziu à expressão desejada dos ligandos coestimuladores CD80 e CD86 (Kato et al., 1998; Wendtner et al., 2002). As células leucémicas assim modificadas puderam agora, de facto, funcionar de forma mais eficaz do que APZ e foram agora também eliminadas - em primeiro lugar *in vitro* - por células T autólogas (Kato et al., 1998). Também a transferência de genes *in vivo* de CD40L foi mais eficaz: nos doentes, esta conduziu quer a um aumento do número de células T, como também a uma redução das células leucémicas (Wierda et al., 2000). Esta preparação terapêutica não afecta no entanto os defeitos de células T previamente referidos da doença B-CLL.

Em seguida é indicada a bibliografia da literatura científica anteriormente referida.

Caligaris-Cappio, F., Rev Clin Exp Hematol 4, 5 - 21 (2000).

Cantwell, M. et al., Nat Med 3, 984 - 989 (1997).

Kato, K. et al., J Clin Invest 101, 1133 - 1141 (1998).

Landis, S. H. et al., CA Cancer J Clin 49, 8 - 31 (1999).

Rozman, C. et al., N Engl J Med 333, 1052 - 1057 (1995).

Scrivener, S. et al., Leuk Lymphoma 44, 383 - 389 (2003).

Wendtner, C. M. et al., Blood 100, 1655 - 1661 (2002).

Wierda, W. G. et al., Blood 96, 2917 - 2924 (2000).

Problema técnico da invenção.

A invenção tem por base o problema técnico de disponibilizar uma composição farmacêutica, por meio da qual a B-CLL seja tratável, em que o sistema imunitário enfraquecido pela doença seja simultaneamente reforçado em geral, em particular a imunidade celular mediada por células T.

Fundamentos da invenção e formas de realização preferidas.

Para a resolução deste problema técnico, a invenção ensina o objecto da reivindicação 1.

A invenção baseia-se no conhecimento de que, com a utilização dos mAb de acordo com a invenção, pode ser produzido por assim dizer, um efeito duplo. Por um lado, células T normais que estão reprimidas devido à doença são activadas ou expandidas. Com isso podem por vezes ser impedidas ou infecções perigosas para a vida, ou enfraquecidas no decurso da doença. Simultaneamente, o sistema imunitário do próprio organismo é estimulado para eliminar as células B B-CLL que normalmente não são atacadas ou são apenas fracamente atacadas por células T específicas de tumores, o que sucede por as células B B-CLL serem activadas para a apresentação de um ligando coestimulador que normalmente não é expresso por elas, facto pelo qual as células T específicas do tumor do próprio organismo que dependem de um sinal deste tipo poderem agora atacar de forma eficaz as células B B-CLL.

Um mAb de acordo com a invenção pode ser preparado, por exemplo, por um mamífero não humano ao ser imunizado com CD28 ou com uma sequência parcial deste, por exemplo o anel C' - D, em que são retiradas células do mamífero não humano e são preparadas célula de hibridoma a partir das células, e em que as células de hibridoma assim obtidas são seleccionadas com a condição de estarem contidos mAb no seu sobrenadante de cultura que se liguem de forma superagonista a CD28. Mas também são utilizáveis outros métodos usuais correspondentes de obtenção de mAb, como, por exemplo, apresentação de fagos ou Ig humano de ratinhos transgênicos. Podem preparar-se mAb adequados por se seleccionarem linfócitos B que se liguem de forma superagonista a CD28 ou ao seu anel C' - D, e por serem clonados os seus genes expressos de imunoglobulina. O correspondente é válido para ICOS, CTLA-4 e PD1.

Um mAb empregue de acordo com a invenção liga-se a CD28 ou a uma sequência parcial deste. A sequência parcial de CD28 pode conter, por exemplo, uma sequência de aminoácidos SEQ ID N° 1, ou 2 - 7, ou 17, que se liga, pelo menos parcialmente, na região do anel C' - D de CD28. Numa das sequências com Val na extremidade 5' pode estar associado um ou vários aminoácidos da sequência 8, na ordem aí definida. O anel encontra-se na região com a sequência GNYSQQQLQVYSKTGF. No entanto, a ligação também pode efectuar-se noutras sequências parciais da região do anel C' - D, para o que é adicionalmente feita referência à definição da região do anel C' - D.

O mAb é obténivel, por exemplo, a partir de células de hibridoma, como depositadas sob os números DSM ACC2531 (mAb: 9D7 ou 9D7G3H11) ou DSM ACC2530 (mAb: 5.1A ou 5.11A1C2H3). O mAb

contém, de um modo preferido, uma ou várias das sequências SEQ ID N° 9, 11, 13 e/ou 15, ou uma ou várias sequências SEQ ID N° 10, 12, 14 e/ou 16, ou uma ou várias sequências 18 e/ou 19, ou sequências homólogas a estas.

Um mAb TGN1412 adicional com propriedades melhoradas, adequado no âmbito da invenção, contém como região variável da cadeia pesada (VHC) a sequência de aminoácidos da figura 9a, e como região variável da cadeia pesada a sequência de aminoácidos da figura 9b. Os péptidos líder indicados nas figuras 9a e 9b são irrelevantes para a função do mAb e servem apenas para facilitar a passagem dos anticorpos através da membrana celular. As variantes indicadas nas figuras do terminal C não conduzem a qualquer alteração da função dos anticorpos.

A invenção é adequada para um processo para o tratamento de B-CLL em particular, em que ou é administrada a um doente uma composição farmacêutica contendo um anticorpo monoclonal superagonista empregue de acordo com a invenção, galenicamente preparada para uma forma de administração definida e aplicável, por exemplo, injeção i.v., ou é retirado um líquido corporal (= suspensão de células) a um doente, em particular sangue, contendo linfócitos T e/ou células precursoras destes, o líquido corporal, eventualmente após um passo do processamento, é misturado com um anticorpo monoclonal superagonista empregue de acordo com a invenção ou um composto mimético deste, e o líquido corporal assim tratado é novamente administrado ao doente, por exemplo injectado por via i.v.

Pode recomendar-se que, quando for retirado sangue a uma pessoa doente de B-CLL antes da realização do tratamento, serem cultivadas *in vitro* as PBMC aí contidas, a cultura ser incubada

com mAb empregues de acordo com a invenção e ser determinada a activação de células T e/ou a eliminação ou redução de células B B-CLL. Relativamente a possíveis métodos de determinação, remete-se para os exemplos de realização, a título de exemplo, naturalmente sendo também adequados outros métodos de determinação usuais da técnica e os meios utilizados para o efeito. Isto é realizável com um kit de teste para testar a eficácia terapêutica de um tratamento prospectivo de B-CLL com uma composição farmacêutica de acordo com a invenção com os seguintes componentes: i) meios para o cultivo de PBMC *in vitro*, ii) uma preparação contendo mAb de acordo com a invenção em dose fisiologicamente eficaz, iii) meios para a determinação dos números de células T ou da activação e/ou meios para a determinação dos números de células B B-CLL.

A dose diária administrada para a indicação de B-CLL pode encontrar-se na gama de 0,1 até 50, de um modo preferido 1 até 10 mg/kg de peso corporal.

A invenção refere-se finalmente a um processo de acordo com a reivindicação 5.

Definições.

Como anticorpos monoclonais (mAb) são designados anticorpos que são produzidos por linhas celulares híbridas (assim designados hibridomas), que são produzidas tipicamente por fusão de uma célula B de origem animal ou humana produtora de anticorpos com uma célula tumoral de mieloma adequada.

A sequência de aminoácidos de CD28 humano é conhecida pelo número de acesso N° NM_006139.

O anel C' - D de CD28 compreende os aminoácidos 43 até 70, em particular 52 até 66, da sequência CD28 anterior (para a numeração ver também Ostrov, D.A., *et al.*; *Science* (2000), **290**: 816 - 819). Sob o termo do anel C' - D deve, em seguida, entender-se também quaisquer sequências parciais daí resultantes. O termo da região do anel C' - D compreende, adicionalmente ou no lugar do anel C' - D, regiões do CD28 espacialmente adjacentes. Estas são de acordo com a numeração anteriormente indicada, em particular os aminoácidos 78 (Tyr) até 87 (Thr).

Um anel ou um local de ligação aí disposto é livremente acessível quando não existe qualquer impedimento estérico para um parceiro de ligação definido, para o local de ligação no anel, através das sequências ou moléculas associadas no anel.

Com activação e/ou expansão de células T designa-se a multiplicação da actividade metabólica, aumento do volume celular, síntese de moléculas imunologicamente importantes, como o ligando CD40, e a entrada na divisão celular (proliferação) relativamente a um estímulo externo. Como resultado, após a activação ou expansão, estão presentes mais células T do que anteriormente.

A homologia designa uma identidade de sequências ao nível da proteína de pelo menos a 70%, de um modo preferido, pelo menos, a 80%, de um modo o mais preferido, pelo menos, a 90%, em que uma proteína ou péptido homólogo se liga a um parceiro de ligação definido com afinidade, pelo menos, igual. Desvios na

sequência podem ser deleções, substituições, inserções e elongações.

O termo mAb compreende, a par de estruturas da construção Fab/Fc usual, também estruturas que são exclusivamente compostas pelo fragmento Fab. Também é possível utilizar simplesmente a região variável, em que o fragmento das cadeias pesadas está ligado de um modo adequado ao fragmento da cadeia leve, por exemplo, também por meio de moléculas sintéticas em ponte. O termo dos anticorpos compreende também anticorpos quiméricos (na totalidade), bem como anticorpos humanizados por tecnologia genética.

A estimulação superagonista da proliferação de células T específicas de CD28 significa que não é necessária qualquer coestimulação, isto é, qualquer ocorrência de ligação adicional a par de uma ligação de um mAb ou um composto mimético a CD28 para a estimulação ou inibição da proliferação.

Em seguida a invenção é mais detalhadamente explicada com base em exemplos que representam simplesmente formas de realização.

Exemplo 1: SuperMAB induz a expansão *in vitro* de células T B-CLL

Numa primeira experiência foram isoladas células mononucleares periféricas a partir do sangue (PBMC) de um doente de B-CLL e foram cultivadas respectivamente 2×10^5 células em microplacas de 96 poços a 37 °C, quer apenas em meio, ou na presença de SuperMAB (0,5 µg/mL em solução). Após 4 dias foi

determinado o número total de células numa câmara de contagem Neubauer. Além disso, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais marcados com fluorescência com especificidade para CD19 (marcador de células B) e CD5 (expresso em células B B-CLL e células T) e analisadas em FACS. A figura 1 mostra uma assim designada análise por transferência em gota. Cada gota representa uma célula analisada e está localizada conforme a expressão de CD19 (eixo dos xx) e CD5 (eixo dos yy). R1 marca a população das células T (CD19-CD5+), R2 a população das células B B-CLL (CD19+CD5+). A figura 1 mostra que o SuperMAB está em condições de induzir uma expressão massiva das células B B-CLL. Enquanto nas preparações "ex vivo" e "meio" as células T apenas representam 3% ou 8% da totalidade da população, esta porção aumentou para 47% nas células tratadas com SuperMAB. A análise do número total de células mostrou que neste caso trata-se não apenas de um aumento relativo, mas também de um aumento absoluto de células T. A partir de 6×10^3 células T/poço (ex vivo) ou $1,1 \times 10^4$ células T/poço (meio), a adição de SuperMAB na cultura conduziu a um aumento de $7,4 \times 10^4$ células T/poço. Nas culturas SuperMAB não pôde ser apenas evitada uma proliferação de células tumorais, mas também pôde mesmo ser alcançada uma redução destas células em cerca de 50%.

Em experiências adicionais foi agora pesquisado se a expansão das células T induzida por SuperMAB também está associada com alterações qualitativas e se pode em último caso também reforçar a resposta imunitária em doentes de B-CLL.

Exemplo 2: SuperMAB induz a expressão do ligando CD40 estimulador de células B sobre a superfície de células T B-CLL

Já pôde ser mostrado em experiências anteriores que SuperMAB está em condições de induzir a expressão do ligando CD40 estimulador de células B. Interessou agora se isto também é possível no caso de células T de doentes de B-CLL e se com isso possam ser activadas células B B-CLL através de uma interacção CD40L-CD40 (ver acima). Como descrito acima, foram cultivadas PBMC de um doente de B-CLL na presença ou na ausência de SuperMAB e, após um dia, foram coradas com um anticorpo marcado com fluorescência com especificidade para CD40L. A figura 2 mostra um assim designado histograma em que a expressão de CD40L em células T (eixo dos xx: uma vez que no caso das PMBC se trata de uma cultura mista, as células T foram previamente limitadas através de um assim designado "portão electrónico") é representada face ao número de células (eixo dos yy). Em comparação a células que foram apenas cultivadas em meio, as células T da cultura tratada com SuperMAB mostram uma expressão claramente mais forte de CD40L. Com isso estão fundamentalmente criados os pressupostos de as células T que agora expressam CD40L interagirem com o CD40 em células B B-CLL e com isso puderem induzir a expressão de ligandos coestimuladores nestas células.

Exemplo 3: SuperMAB induz a expressão do ligando B7.2 coestimulador em células B B-CLL

Foram cultivadas PBMC de um doente de B-CLL como descrito acima e coradas com anticorpos monoclonais marcados com

fluorescência com especificidade para B7.1 e B7.2. Os histogramas na figura 3 mostram a expressão de ambas estas proteínas em células B B-CLL: enquanto SuperMAB B7.1 apenas induz moderadamente estas células (histograma a), ele pôde aumentar drasticamente a expressão de B7.2 (histograma b). Para poder comprovar-se que a indução de B7.2 é a consequência da expressão de CD40L mostrada na figura 2 em células T tratadas com SuperMAB, numa preparação adicional foi adicionado às culturas um anticorpo bloqueador (10 µg/mL), com especificidade para CD40L. Como consequência da sua capacidade de bloquear a interacção entre CD40L e CD40, deverá com isso ser também impedida a indução de B7.2 em células B B-CLL. A expressão drasticamente reduzida de B7.2 nas células assim tratadas (histograma d) mostra de facto que a indução de B7.2 em células B B-CLL é impedida através do bloqueio de CD40L. Com isso, este resultado conduz à evidência indirecta de que células T que expressam CD40L, activadas por SuperMAB, interagem com CD40 sobre a superfície de células B B-CLL e com isso podem induzir a expressão de proteínas coestimuladoras.

Exemplo 4: SuperMAB melhora a função apresentadora de antigénios de células B B-CLL (cultura mista de linfócitos alogeneicos)

A pergunta crucial, se a expressão de ligandos coestimuladores nas células B B-CLL também ocorre com uma função apresentadora de antigénios melhorada apenas pode ser esclarecida através de testes funcionais: no caso da cultura de linfócitos mista, as células T de uma pessoa (= células responder) são cultivadas em conjunto com as assim designadas células estimuladoras. No caso das células estimuladoras tratam-

se de células tratadas com mitomicina C de uma segunda pessoa não relacionada (dador alogeneico), que difira da primeira pessoa no padrão de expressão dos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). As células T reconhecem as proteínas MHC estranhas em conjunto com ligandos coestimuladores sobre a superfície das células estimuladoras e são induzidas para a proliferação (devido ao tratamento de mitomicina C, as células estimuladoras já não se podem dividir). Após quatro dias é medida a proliferação de células T através da incorporação de 3H-timidina (ver figura 6). Para responder à pergunta, foram isoladas PBMC de doentes de B-CLL e foram cultivadas em meio ou com SuperMAB (ver acima). Após quatro dias, as células B B-CLL foram isoladas a partir destas culturas por meio de separação magnética, incubadas com mitomicina C (60 µg/mL) durante 1 h a 37 °C, e serviram como células estimuladoras na subsequente cultura de linfócitos seguinte: para o efeito foram cultivadas durante cinco dias 1×10^4 células estimuladoras com 4×10^4 células T de um dador alogeneico (= células responder) e foi medida a proliferação das células T através da incorporação de 3H-timidina durante as últimas 16 h (ver figura 6). A figura 4 mostra que células B B-CLL não previamente tratadas com SuperMAB (preparações meio/ex-vivo) apenas podem provocar uma proliferação muito fraca das células indicadores, que por adição de SuperMAB (preparação SuperMAB) pôde ser claramente aumentada, isto é, no mínimo num factor de 2. Pela adição de anticorpos monoclonais bloqueadores com especificidade para B7.1 e B7.2 (respectivamente 5 µg/mL; preparação SuperMAB + anti CD80/86) a proliferação pôde ser quase diminuída para o nível das células previamente tratadas em meio. Resumindo, estes resultados sugerem que SuperMAB melhora a função apresentadora de antigénios das células B B-CLL por indução das proteínas coestimuladoras B7.1 e B7.2.

Exemplo 5: SuperMAB melhora a função apresentadora de antigénios das células B B-CLL (cultura de linfócitos mista autóloga)

O objectivo da imunoterapia em doentes de B-CLL é o de activar de forma autóloga (isto é, pelo próprio corpo) células T específicas do tumor pela melhoria da função apresentadora de antigénios das células B B-CLL, e com isso colocá-las em condições de eliminar células tumorais (isto é, células B B-CLL). Com o auxílio da assim designada cultura de linfócitos mista autóloga, foi investigada a questão de se SuperMAB possui propriedades relativamente a este assunto. Para esse efeito foram novamente isoladas PBMC de um doente de B-CLL e foram cultivadas em meio ou na presença de SuperMAB. A análise por FACS mostrou também nesta experiência uma indução de B7.1 e sobretudo de B7.2 nas células B B-CLL tratadas com SuperMAB. Após três dias foram isoladas as células B B-CLL destas culturas por meio de separação magnética, tratadas com mitomicina C e depois foram empregues como células apresentadoras de antigénios na subsequente cultura de linfócitos mista autóloga: para responder à seguinte questão foram cultivadas 1×10^4 células estimuladoras com 1×10^5 células T autólogas (= células responder) na presença da citocina interleucina 2 (ver figura 7).

As células B B-CLL da preparação SuperMAB estão em condições de activar células T de forma autóloga e impulsionar à proliferação? Como sistema de teste serviu aqui a incorporação de 3H-timidina. Resultado: em comparação com as preparações meio/ex vivo, a proliferação das células T autólogas pôde ser

aumentada num factor de 4 através do tratamento prévio com SuperMAB (figura 5a).

As células T assim activadas podem produzir a citocina interferão-gama? O interferão gama é produzido, entre outros, pelas assim designadas células T efectoras. Às células T efectoras pertencem também os linfócitos T citotóxicos, que estão em condições de eliminar células tumorais. A concentração de interferão-gama no sobrenadante de cultura de células foi determinada por meio de ELISA. Resultado: enquanto nas preparações meio/ex vivo não foi produzido praticamente nenhum interferão-gama, as células T responder da preparação SuperMAB puderam ser claramente incitadas para a síntese desta citocina (figura 5b).

As células T activadas estão em condições de eliminar células tumorais autólogas? Para a clarificação desta questão, 3×10^4 células T responder foram isoladas, no dia 8, da cultura de linfócitos mista (= células T efectoras em questão) e foram cultivadas durante 3 horas com $1,5 \times 10^4$ células B B-CLL isoladas de fresco (= células alvo). Depois disso efectuou-se a incubação com a proteína anexina V e um anticorpo monoclonal com especificidade para CD19. Através da anexina V, à qual está acoplado um corante de fluorescência, podem ser analisadas células apoptóticas (são células que estão mortas devido a uma morte celular programada) por citometria de fluxo. Uma indução efectuada pelo tratamento com SuperMAB de células T efectoras potentes, específicas do tumor, e uma morte reforçada de células tumorais daí resultante, deverá por conseguinte reflectir-se num aumento da percentagem de células positivas para anexina V na análise de FACS. Resultado: também neste teste a preparação SuperMAB mostrou o melhor resultado: nas preparações meio/ex

vivo deixaram-se corar com anexina V cerca de 12% das células alvo (= CD19 + células tumorais), na preparação SuperMAB, pelo contrário, mais de 25% (figura 5c).

Evidentemente, pela utilização de SuperMAB é possível activar células T autólogas específicas do tumor e induzir uma eliminação eficiente das células tumorais. Presumivelmente isto será devido a uma indução de proteínas coestimuladoras sobre a superfície das células B B-CLL apresentadoras de antigénios. O mecanismo possível está representado esquematicamente na figura 8.

Exemplo 6: Preparação de um anticorpo monoclonal TGN1412 de acordo com a invenção

Em seguida é descrita a preparação de um anticorpo monoclonal TGN1412 de acordo com a invenção, que é composto pelas sequências de aminoácidos indicadas nas figuras 9a e 9b das cadeias leve e pesada.

As moléculas de ADN indicadas nas figuras 9c e 9d foram sintetizadas de maneira usual da técnica. Os ADNc obtidos, que codificam respectivamente para as cadeias leve e pesada do anticorpo monoclonal como indicado, foram inseridos nos plasmídeos pLNOH e pLNOK. Para o procedimento em detalhe, os plasmídeos e locais de corte, faz-se referência à referência da literatura Norderhaug *et al.*, *Journal of Immunological Methods*, **204**: 77 - 87 (1997).

Foram transformadas células de *E. coli* com os respectivos plasmídeos. As células de *E. coli* transformadas foram

multiplicadas e os respectivos plasmídeos foram obtidos a partir destas, em grande escala.

Com os respectivos plasmídeos obtidos, contendo a informação de ADN para as cadeias leve e pesada completas, foram cotransfectadas células COS7, transientemente, e foram cotransfectadas células CHO bem como NS0, de forma estável. A cotransfecção efectuou-se de maneira usual com lipofectamina (Invitrogen) ou Effectene (QIAGEN), de acordo com as respectivas instruções do fabricante.

As células transfectadas obtidas foram cultivadas em meio de cultura estandardizado em incubadoras de CO₂ (5% de CO₂) a 37 °C em frascos T e frascos rolantes. Células transfectadas de forma estável, que expressam o anticorpo intacto, foram seleccionadas por meio de selecção de G418 e higromicina B. Os transformantes estáveis foram depois subclonados e subsequentemente cultivados.

Os sobrenadantes da cultura de células com anticorpos segregados foram analisados por meio de ensaios de actividade, ensaios de ligação (análise FACS), SDS-PAGE e transferência Western.

Para a purificação, os sobrenadantes da cultura de células foram feitos passar através de uma coluna de proteína A ou proteína G, para ligar especificamente os anticorpos desejados. Os anticorpos ligados foram eluídos com tampão ácido (glicina 0,1 M, pH 3,0 - 3,4) e em seguida neutralizados com Tris 1M (pH 8,0). Os anticorpos assim purificados foram dialisados contra tampão PBS e, de acordo com a necessidade, foram eventualmente concentrados por meio de filtração de membrana. Os anticorpos

obtidos foram depois utilizados para ensaios de proliferação, ensaios de actividade, ensaios de ligação (análise FACS relativamente à ligação a células CD28 positivas), ELISA, SDS-PAGE e transferência Western.

Listagem de sequências

<110> TeGenero AG

<160> 19

<170> PatentIn versão 3.1

<210> 1

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 1

Val	Tyr	Ser	Lys	Thr	Gly
1				5	

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 2

Tyr	Ser	Lys	Thr
1			

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 3

Tyr Ser Lys Thr Gly
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 4

Val Tyr Ser Lys Thr
1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 5

Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 6

Val Tyr Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 7

Ser Lys Thr Gly Phe
1 5

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 8

Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln
1 5

<210> 9

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 9

```
gatatccaga cgacacagac tacatcctcc cgttctgcct ctctgggaga cagagtcacc 60
atcagttgca gggcagggtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca 120
gatggaactg ttaagctcct gatctactac acatcaagat tacactcagg agtcccatca 180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattagcaa cctggagcaa 240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtcatacgc ttccgtggac gttcggtgga 300
ggcaccaagc tggaatcaa a 321
```

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 10

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

<210> 11

<211> 363

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 11

```
gatgtgcagc ttcaggagtc gggacctggc ctggtgaaac cttctcagtc tctgtccctc      60
acctgcactg tcactggcta ctcaatcacc agtgattatg cctggaactg gatccggcag      120
tttccaggaa acaaactgga gtggatgggc tacataagat acagtggtag tactagctac      180
aatccatctc tcaaaagtcg aatctctatc actcgagaca catccaagaa ccagttcttc      240
ctgcagttga attctgtgac tactgaggac acagccacat attactgtgc aagagattgg      300
ccgcgaccga gctactggta cttcgatgtc tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc      360
tca                                             363
```

<210> 12
<211> 121
<212> PRT
<213> Artificial

<400> 12

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

<210> 13
<211> 360
<212> ADN
<213> Artificial

<400> 13

caggccaac tgcagcagtc cggacctgag ctggtgaagc cggggacttc agtgaggatt 60
 tctgcgagg cttctggcta caccttcaca agctactata tacactgggt gaaacagagg 120
 cctggacagg gacttgagtg gattggatgt atttatcctg gaaatgtcaa tactaactat 180
 aatgagaagt tcaaggacaa ggccacactg attgtagaca catcctcaa cactgcctac 240
 atgcagctca gcagaatgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtac aagatcacac 300
 tacggcctcg actggaactt cgatgtctgg ggcgcagga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 14

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 14

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

<210> 15

<211> 321

<212> ADN

<213> Artificial

<400> 15

```
gacatccaga tgaaccagtc tccatccagt ctgtctgcat cccttgagaga cacaattacc      60
atcacttgcc atgccagtca aaacatttat gtttggttaa actggtacca gcagaaacca      120
ggaaatattc ctaaactctt gatctataag gcttccaacc tgcacacagg cgtcccatca      180
aggtttagtg gcagtggatc tggaacaggc ttcacattaa ccatcagcag cctgcagcct      240
gaagacattg ccacttacta ctgtcaacag ggtcaaactt atccgtacac gttcggaggg      300
gggaccaagc tggaaataaa a                                             321
```

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 16

```
Asp Ile Gln Met Asn Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1           5           10           15

Asp Thr Ile Thr Ile Thr Cys His Ala Ser Gln Asn Ile Tyr Val Trp
          20           25           30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ile Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45

Tyr Lys Ala Ser Asn Leu His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Gly Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Thr Tyr Pro Tyr
          85           90           95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
          100          105
```

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 17

Gly	Asn	Tyr	Ser	Gln	Gln	Leu	Gln	Val	Tyr	Ser	Lys	Thr	Gly	Phe
1			5						10					15

<210> 18

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 18

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

<210> 19

<211> 120

<212> PRT

<213> Artificial

<400> 19

REIVINDICAÇÕES

1. Utilização de um anticorpo monoclonal superagonista (mAb), que é específico para CD28 expresso em células T, para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de uma leucemia linfocítica crônica das células de tipo B (B-CLL).

2. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que o mAb é preparável, na medida em que um mamífero não humano é imunizado com CD28 ou com uma sequência parcial deste, em que são retiradas células do mamífero não humano e são preparadas células de hibridoma a partir das células, e em que as células de hibridoma, assim obtidas, são selecionadas com a condição de no seu sobrenadante de cultura estarem contidos mAb que se liguem de forma superagonista a CD28.

3. Utilização de acordo com uma das reivindicações 1 ou 2, em que o mAb é obtível a partir de células de hibridoma, como depositado sob os números DSM ACC2531 (mAb: 9D7 ou 9D7G3H11) ou DSM ACC2530 (mAb: 5.11A ou 5.11A1C2H3), ou em que o anticorpo na cadeia pesada contém uma sequência de aminoácidos para a região variável de acordo com a figura 9a (VHC) e na cadeia leve contém uma sequência de aminoácidos para a região variável de acordo com a figura 9b (VLC), em que a cadeia pesada e leve contém adicionalmente, opcionalmente, as respectivas sequências de aminoácidos indicadas nas figuras 9a e 9b para a região constante da cadeia pesada (CHC) e a região constante da cadeia leve (CLC) (nas variantes alternativas aí

indicadas), em que a cadeia pesada e a cadeia leve contêm adicionalmente, opcionalmente, as respectivas sequências de aminoácidos indicadas nas figuras 9a e 9b para o péptido líder, em que a cadeia pesada e a cadeia leve são compostas respectivamente, de um modo preferido, pelas sequências de tamanho completo representadas nas figuras 9a e 9b (nas variantes alternativas da extremidade C, como indicado nas figuras 9a e 9b).

4. Utilização de acordo com a reivindicação 1, em que a composição farmacêutica é preparada galenicamente para a injeção i.v.

5. Processo para a redução de células B B-CLL e expansão de células T num líquido contendo células T normais, células B, bem como células B B-CLL, que se encontre fora de um corpo, em que, por interacção das células T normalmente presentes no líquido com um mAb superagonista específico para um receptor naturalmente coestimulador em células T em repouso, nomeadamente CD28, são activadas ou expandidas as células T normais, em que, por interacção das células T B-CLL presentes no líquido com o mAb superagonista específico de CD28, são activadas e eventualmente expandidas para a expressão de um ligando CD40, em que as células T B-CLL que comportam ligandos CD40 activados ou expandidos induzem a expressão de CD86 e/ou CD80 em células B B-CLL que comportam CD40, em que células T autólogas específicas do tumor são activadas ou expandidas por coestimulação através das células B B-CLL que comportam CD86 e/ou CD80, e em que as células T

activadas específicas do tumor eliminam as células B B-CLL.

Lisboa, 1 de Outubro de 2012

Figura 1

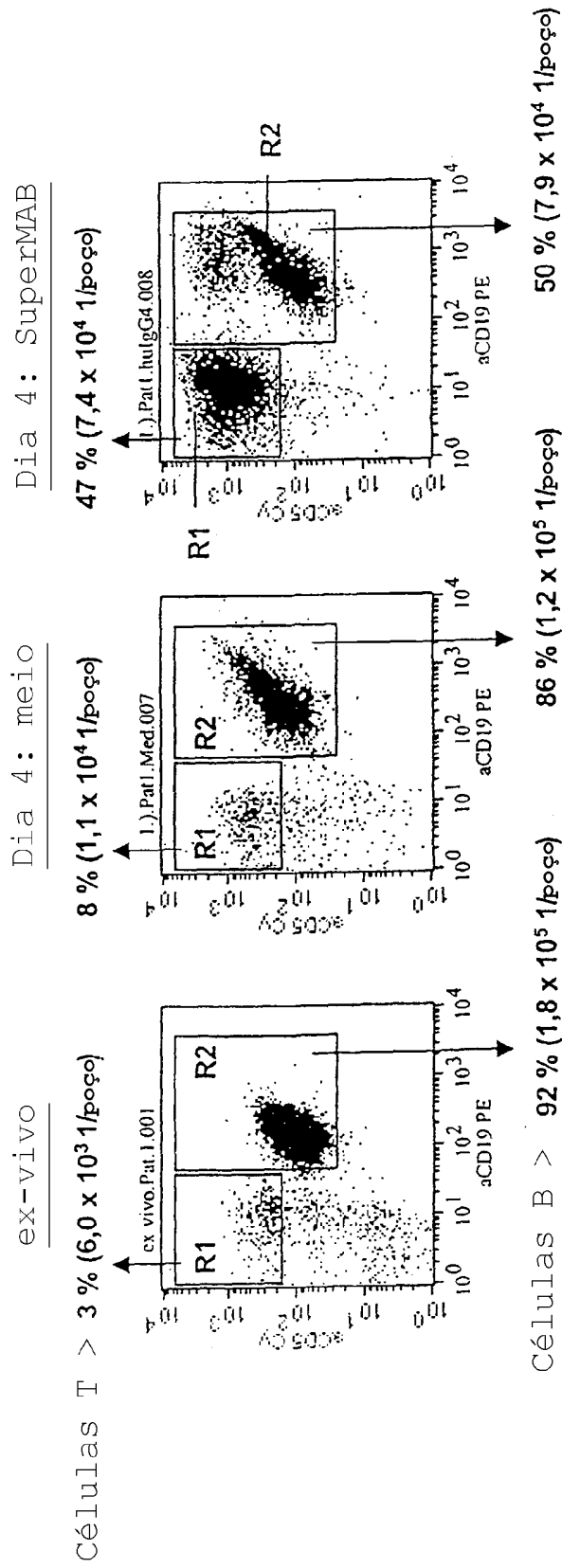


Figura 2

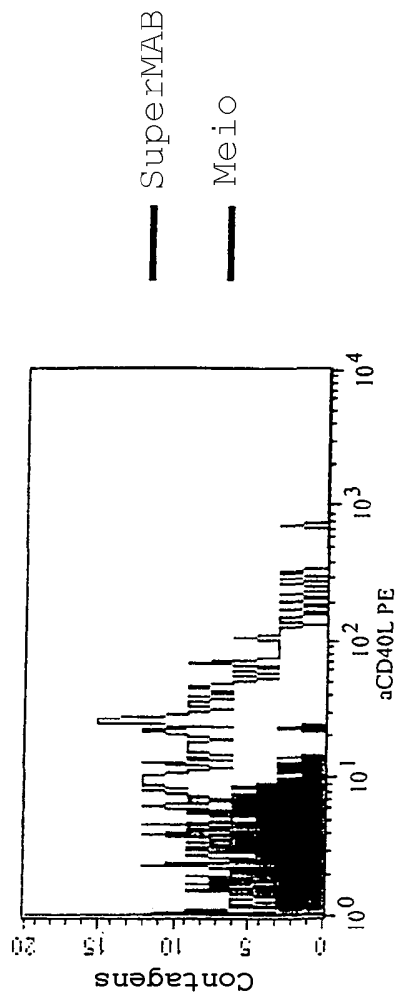


Figura 3

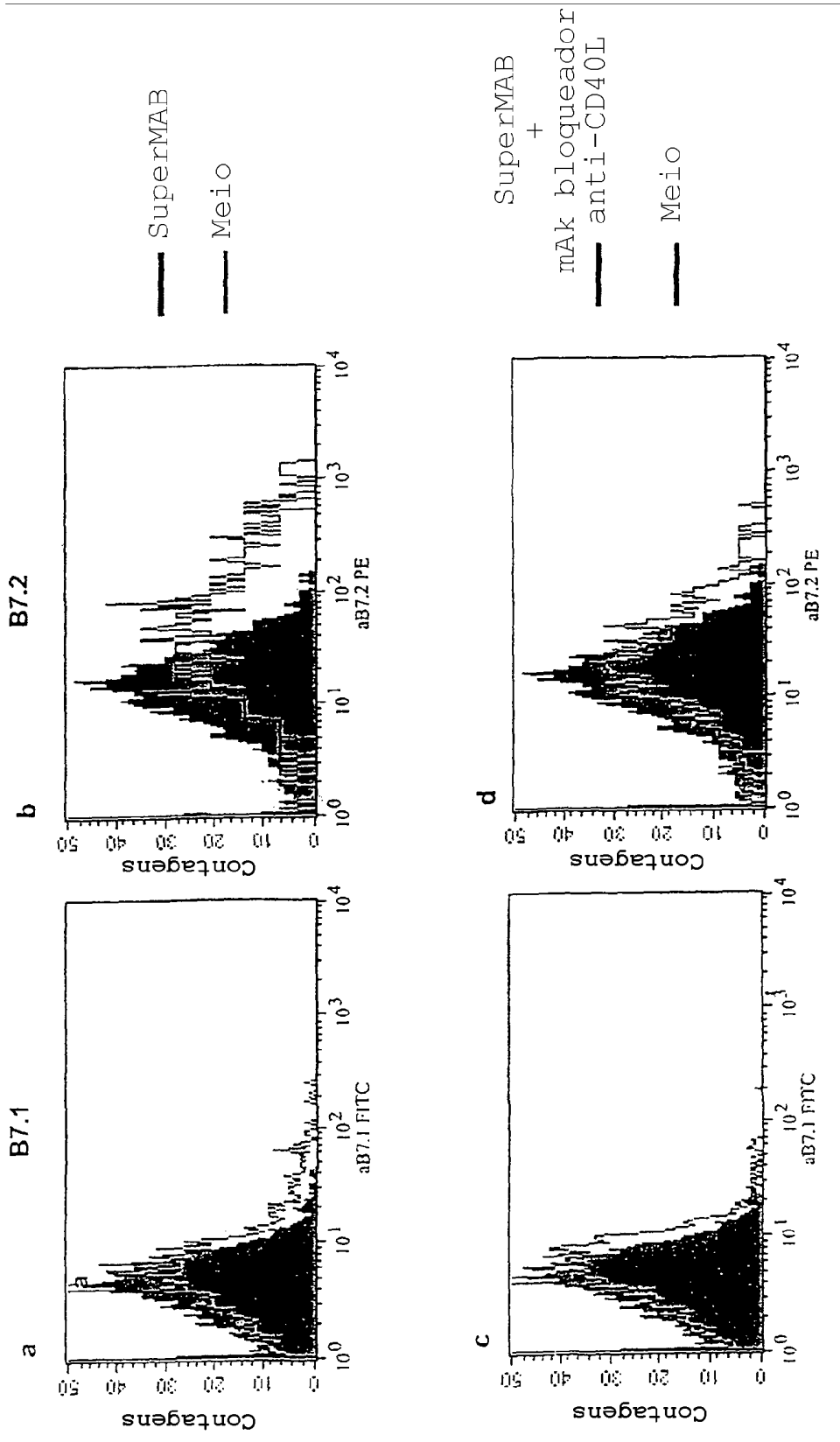
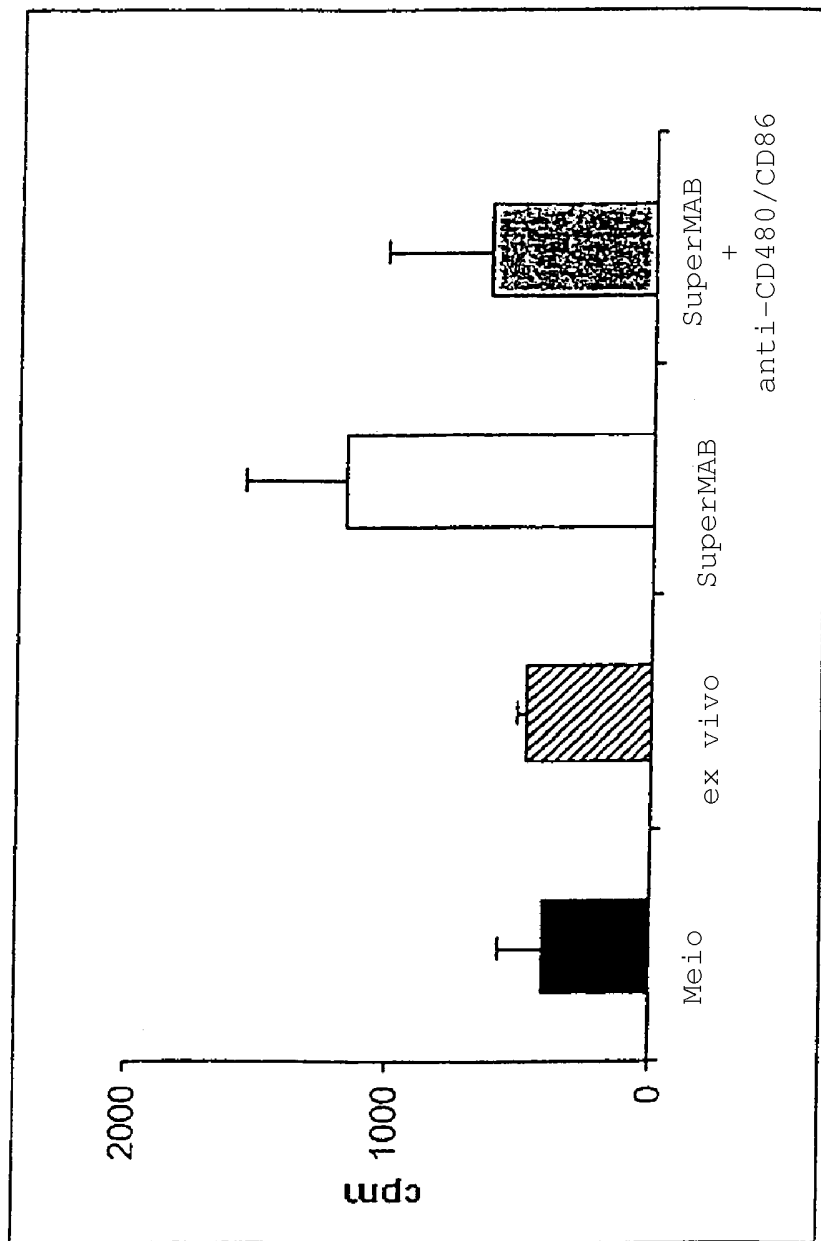
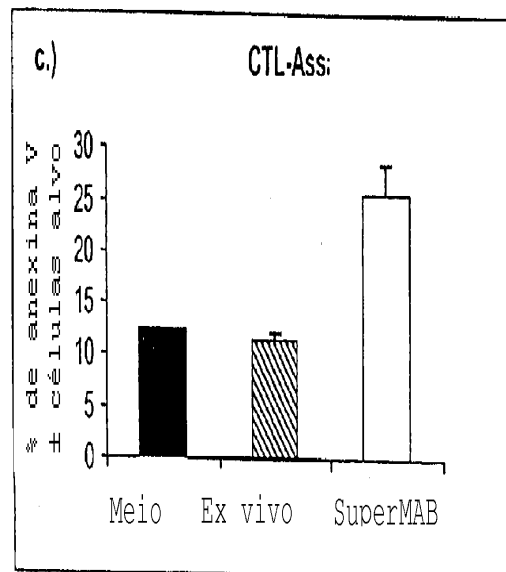
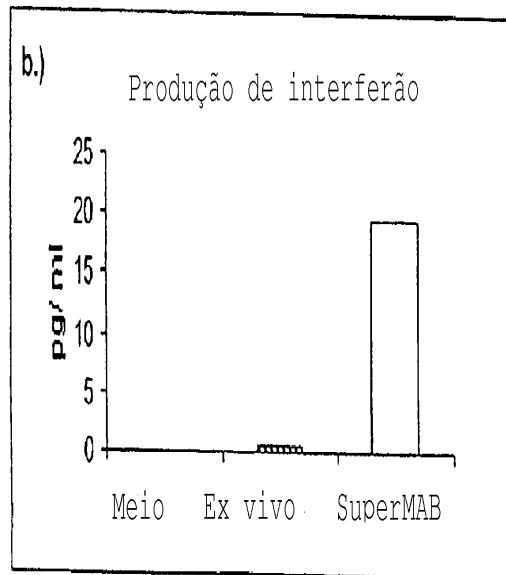
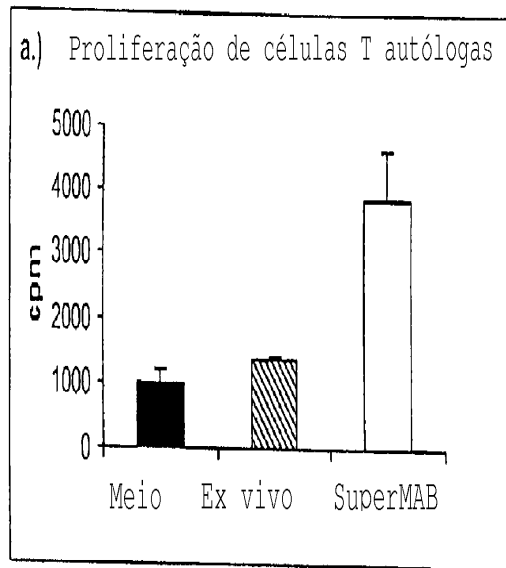


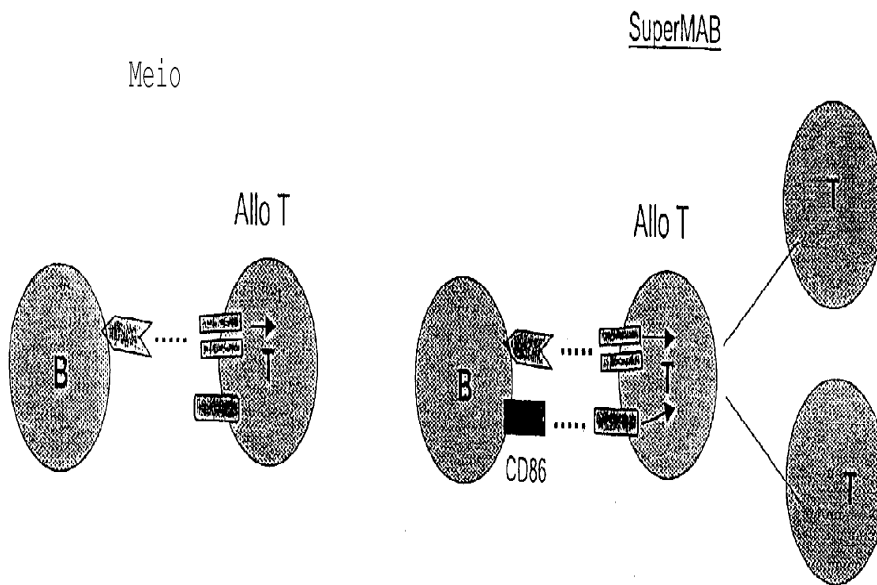
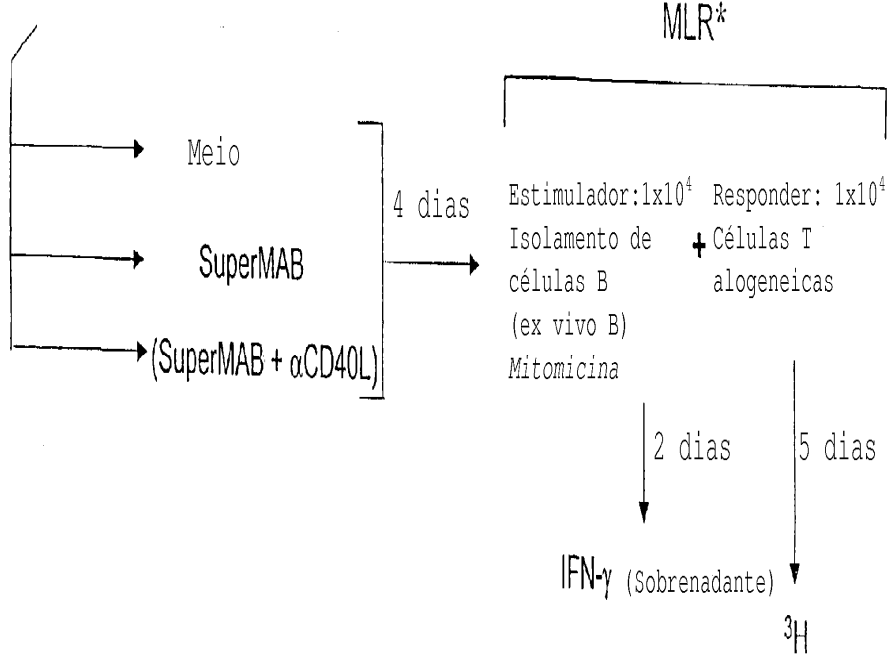
Figura 4





Cultura mista de linfócitos alogeneicos (MLR)

Isolamento de PBMC de um doente de B-CLL



Cultura mista de linfócitos autólogos (MLR)

Isolamento de PBMC; (T e B)

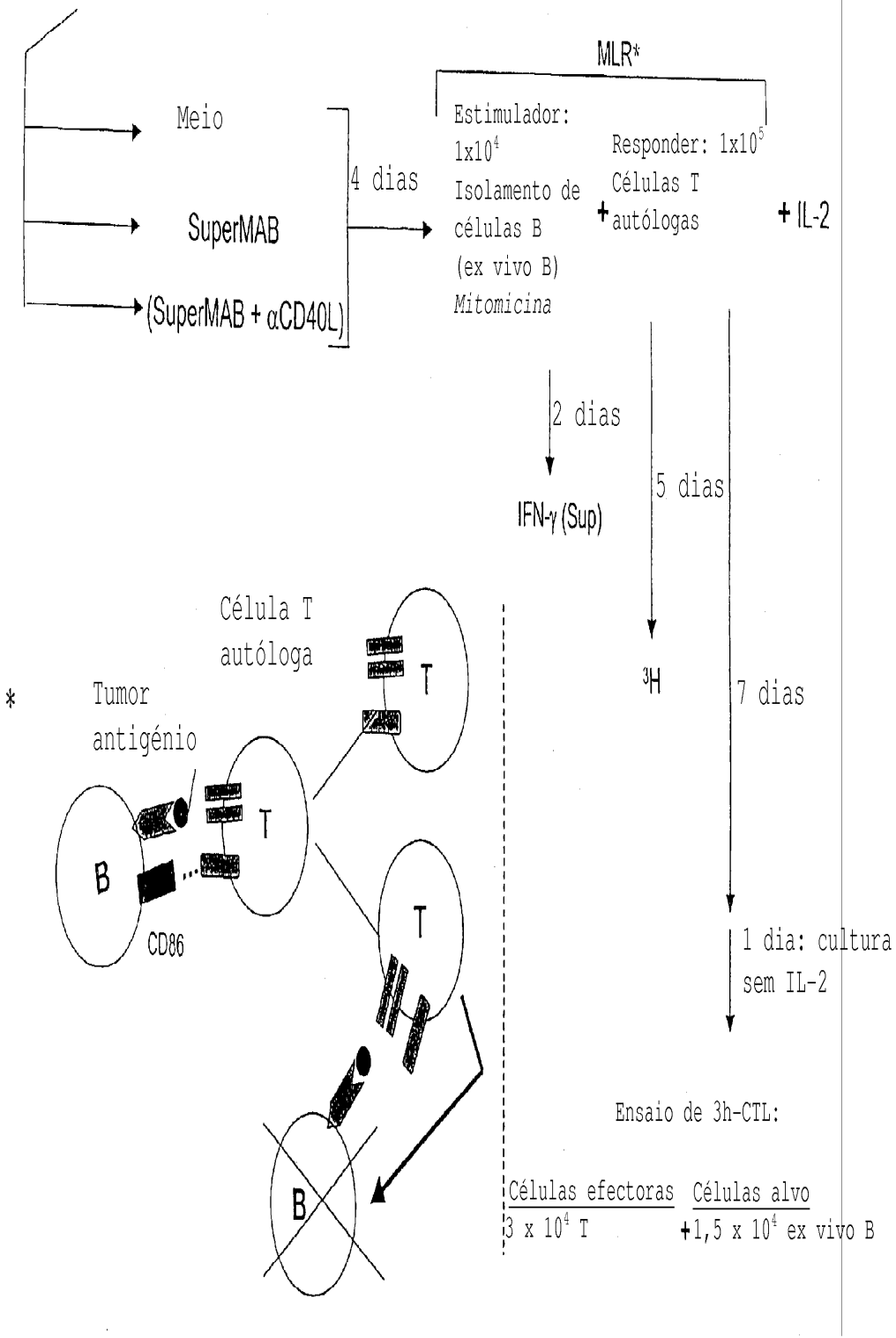


Figura 7

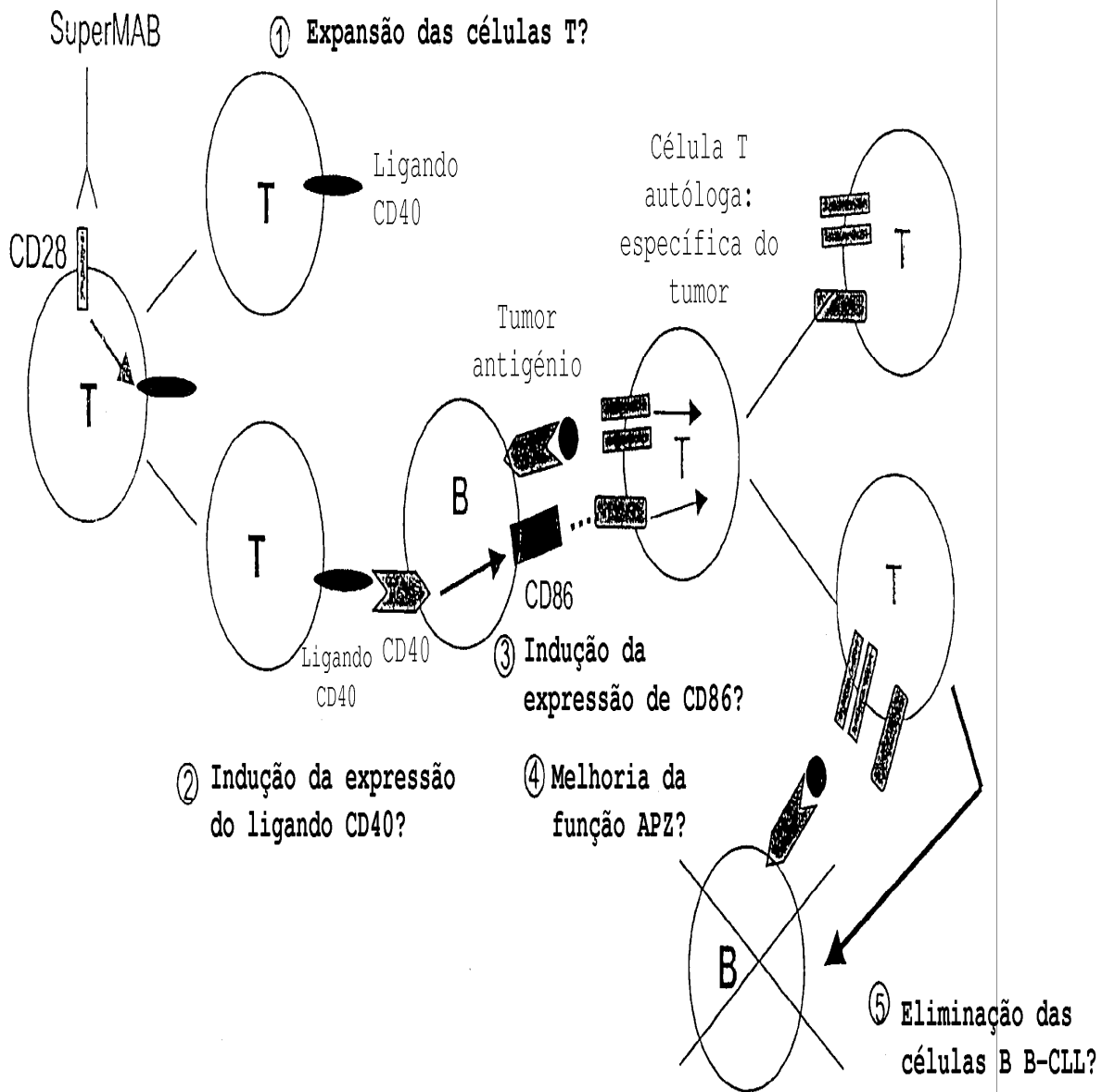


Figura 9a

Sequência AS da HC de TGN1412 inclusivamente o péptido líder

Líder

MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYIHWVRQAPGQ
GLEWIGCIYPGNVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYFCTRSHYGLDW -VHC
NFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT
SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSC
PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP ←
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPP CHC
SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKS
RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLKG

Possíveis variantes na extremidade C (sem prejuízo da função)

(...) SLGK ou (...) SLGKK ou (...) SLG

Péptido líder

MGWSCIIILFLVATATGVHS

Figura 9b

Líder

MGWSCIIILFLVATATGVHSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQNIYVWLNWYQQKPGKA
PKLLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYQCQQQTYPYTFGGGTKVE
IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD
SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

VLC

ELC

Péptido líder

MGWSCIIILFLVATATGVHS

Figura 9c

Sequência de ADN da HC de TGN1412 inclusivamente intrões, UTRs e péptido líder

```

1 ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag
61 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggtctgg acatatatat gggtgacaat
121 gacatccact ttgcctttct ctccacaggt gtgcattccc aggtgcagct ggtgcagctt
181 ggggctgagg tgaagaagcc tggggcctca gtgaaggctc cctgcaaggc ttctggatac
241 accttcacca gctactatat acactgggtg cgacaggccc ctggacaagg gottgagtgg
301 attggatgta ttatcctcgg aaatgtcaat actaactata atgagaagtt caaggacagg
361 gccaccctga ccgtagacac gtccatcagc acagcctaca tggagctgag caggctgaga
421 tctgacgaca ggcgcgtgta tttctgtaca agatcaoaact acggcctcga ctggaacttc
481 gatgtctggg gccaaaggac cacggtcacc gtctctcag gtgagtogta cgctagcaag
541 ctttctgggg caggccgggc ctgaacttgg ctggggggcag ggagggggct aaggtagcgc
601 aggtggcgcc agccaggtgc acacccaatg cccatgagcc oagacactgg accctgcctg
661 gaccatcgcg gatagacaag aaccgagggg cctctgcgcc ctgggcccag ctctgtccca
721 caccgcggtc acatggcacc acctctcttg cagcttccac caagggccca tccgtcttcc
781 ccttggcgcc ctgctccagg agcacctccg agagcacagc cgcctggggc tgcctggtca
841 aggactactt cccogaaccg gtgaoggtgt cgtggaactc agggcccctg accagcggcg
901 tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct caggacteta ctccctcagc agcgtggtga
961 ccgtgccttc cagcagcttg ggcacgaaga cctacacctg caacgtagat cacaagccca
1021 gcaacaccaa ggtggacaag agagtgggtg agaggccagc acagggaggg aggggtgctg
1081 ctggaagcca ggctoagccc tctgctctgg acgcaccccg gctgtgcagc cccagcccag
1141 ggcagcaagg catgcccocat ctgtctctc acccggagge ccttgaccac cccactcatg
1201 ctcagggaga gggctctctg gatcttcca ccaggctccg ggcagccaca ggtggatgc
1261 ccctacccca ggcctgctgc atacaggggc aggtgctgct ctcagacctg ccaagagcca
1321 tatccgggag gaccctgccc ctgacctaa gcccacccca aggccaaact ctccactccc
1381 tcagctcaga caocttctct cctccagat ctgagtaact cccaactctt tctctgcaga
1441 gtccaaatat ggtcccccat gccatcatg cccaggtaag ccaacccagg cctcgcctc
1501 cagctcaagg cgggacaggt gccctagagt agcctgcatc cagggacagg ccccagccgg
1561 gtgctgagc atccacctcc atctcttct cagcacctga gttcctgggg ggacctcag
1621 tcttctgtt cccccaaaa cccaaggaca ctctcatgat ctcccggacc cctgaggtca
1681 cgtgcgtggt ggtggacgtg agccaggaag accccgaggt ccagttcaac tggtagctgg
1741 atggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agcccgggga ggagcagttc aacagcacgt
1801 accgtgtggt cagcgtctct accgtcctgc accaggactg gctgaacggc aaggagtaca
1861 agtgcaaggc ctccaacaaa ggcctcccgt cctccatcga gaaaaccatc tccaaagcca
1921 aagggtgggac ccacggggtg cgaggggccac atggacagag gtcagctcgg cccacctct
1981 gccctgggag tgaccgctgt gccaacctct gtccctacag ggcagccccg agagccacag
2041 gtgtacaccc tgcccccatc ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc
2101 ctgggtcaaag gcttctaccc cagcgacatc gccgtggagt gggagagooa tgggcagccg
2161 gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg ctggactccg acggctcctt ctctctac
2221 agcaggctaa ccgtggacaa gagcaggtgg caggagggga atgtcttctc atgctccgtg
2281 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacaca cagaagagcc tctccctgtc tctgggtaaa
2341 tgagtgccag ggcgggcaag cccccgctcc cgggctctc ggggtcgcgc gaggatgctt
2401 ggcacgtacc ccgtctacat acttcccagg caccagcat ggaaataaag cccccacc
2461 tgcocctgggc ooctgtgaga otgtgatggt tctttccacg ggtcaggccg agtctgaggc
2521 ctgagtgaca tgaggggaggc agagcggatc o

```

Pos. 21 atg: codão líder
(líder com intrão!)

Pos. 157 tcc: último codão líder

Pos. 160 cag: codão VHR

Pos. 517 tca: último codão VHR

Pos. 2338 aaa: último codão IgG4 const.

Pos. 2341 tga: STOP

Figura 9d

Sequência de ADN da LC de TGN1412 inclusivamente intrões, UTRs e péptido líder

```

1 ggtaccgggc cgacctcacc atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag
61 ctacaggtaa ggggctcaca gtagcaggct tgaggctctgg acatatatat gggtgacaat
121 gacatccact ttgcctttct ctccacagggt gtgcattccg acatccagat gaccocagtct
181 ccatcctccc tgcctgcctc tgtaggagac agagtcacca tcacttgcca tgccagtcaa
241 aacatztatg tttgggttaa ctgggtatcag cagaaaccag ggaaagcccc taagctcctg
301 atctataagg cttccaacct geacacaggg gtcccatcaa ggttcagtgg cagtggatct
361 gggacagatt tcaactctcac catcagcagt ctgcaaactg aagattttgc aacttactac
421 tgtcaacagg gtcaaaactta tccgtacacg ttoggcggag ggaccaaggt ggagatcaaa
481 cgtgagtcgt acgctagcaa gcttgatata gaattctaaa ctctgagggg gtcggatgac
541 gtggcoattc tttgcctaaa gcattgagtt tactgcaagg tcagaaaagc atgcaaagcc
601 ctcagaatgg ctgcaaagag ctccaacaaa acaatttaga aotttatta ggaatagggg
661 gaagctagga agaaactcaa aacatcaaga ttttaaatac gcttctctgg ctctctgcta
721 taattatctg ggataagcat gctgttttct gtctgtccct aacatgccct gtgattatcc
781 gcaacaaca cacccaaggg cagaaotttg ttacttaaac accatcctgt ttgcttcttt
841 cctcaggaac tgtggctgoa ccatctgtot tcatctccc gcoatctgat gacagttga
901 aatctgggaa tgcctctgtt gtgtgectgc tgaataactt ctatcccaga gaggccaaag
961 tacagtggaa ggtggataac gccctccaat cgggtaactc ccaggagagt gtcacagagc
1021 aggacagcaa ggacagcacc tacagcctca gcagcaccct gacgctgagc aaagcagact
1081 acgagaaaca caaagtctac gcctgcgaag tcacccatca gggcctgagc tcgccogtca
1141 caaagagott caacagggga gagtgttaga gggagaagtg cccccacctg ctctcagtt
1201 ccagcctgac cccctcccat cctttggcct ctgaccttt ttccacaggg gacctacccc
1261 tattgcggtc ctccagctca tctttcacct cccccctc ctctccttg gctttaatta
1321 tgctaattgt ggaggagaat gaataaataa agtgaatctt tgcacctgtg gtttctctct
1381 ttctcatttt aataattatt atctgtttgt ttaccaacta ctcaatttct ctataaggg
1441 actaaatatg tagtcatoot aaggcgcata aocatttata aaaatcatcc ttcatctctat
1501 ttaccctat catctctctc aagacagtc tccctcaaac ccacaagcct tctgtctca
1561 cagtcacctg ggccatggta ggagagactt gcttcttgt tttccccctc tcagcaagcc
1621 ctcatagtcc tttttaaggg tgacaggtct taoagtcata tatootttga ttcaattccc
1681 tgagaatcaa ccaaagcaaa ttcttcgagc ccgggggatc c

```

Pos. 21 atg: codão líder

Pos. 157 tcc: último codão líder

(líder com intrão!)

Pos. 160 gac: codão VLR

Pos. 478 aaa: último codão VLR

Pos. 1164 tgt: último codão kapa const.

Pos. 1167 tag: STOP

Sequência AS da LC de TGN1412 inclusivamente o péptido líder