



MD 1367 C2

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 1367⁽¹³⁾ C2

(51) Int. Cl.⁷: A 61 K 39/395, 43/00;
A 61 P 35/00;
C 12 N 15/02;
C 12 P 21/08

(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: 95-0311

(22) Data depozit: 1993.11.12

(31) Nr.: 07/978,891; 08/149,099

(32) Data: 1992.11.13 ; 1993.11.03

(33) Țara: US

(41) Data publicării cererii:
1998.06.30, BOPI nr. 6/1998

(44) Data publicării hotărârii de
acordare a brevetului cu
examinarea in fond:

1999.12.31, BOPI nr. 12/99

(85) 1995.06.05

(86) PCT/US93/10953, 1993.11.12

(87) WO 94/11026; 1994.05.26

(71) Solicitant: IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, US

(72) Inventatori: ANDERSON, Darrell, R., US; RASTETTER, William, H, US; HANNA, Nabil, US;
LEONARD, John, E., US; NEWMAN, Roland, A., US; REFF Mitchell, E., US

(73) Titular: IDEC PHARMACEUTICALS CORPORATION, US

(54) Metode de tratament al limfomului celulelor B, anticorpi anti-CD20,
hibridom.

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la domeniul medicinei, anume la oncologie și este destinată tratamentului limfomului celulelor B.

Esența invenției constă în aceea că tratamentul limfomului celulelor B include administrarea anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ, care poate fi obținut din transfectom cuprinzând anti-CD20 în TCAE 8, depozitat în Colecția Americană de Specii de Culturi (ATCC) sub nr. 69119. Administrarea anticorpului poate fi efectuată repetat. Mai mult decât atât, se solicită metoda tratamentului limfomului celulelor B ce constă în administrarea anticorpului anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, secretat de hibridomul depozitat în ATCC sub nr. HB 11388.

2

Limfomul celulelor B, de asemenea, este tratat prin administrarea, în prima perioadă, a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ, totodată se poate administra un anticorp anti-CD20 himeric obținut de la transfectomul menționat. Apoi în perioada a doua a tratamentului se administrează anticorpul anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi care poate include un anticorp monoclonal secretat de hibridomul revendicat.

Rezultatul constă în distrugerea și extenuarea specială a celulelor B neoplazice și prevenirea reacției de hipersensibilitate.

Revendicări: 20

Figuri: 17

MD 1367 C2

Descriere:

Invenția se referă la domeniul medicinei, anume la oncologie, și este destinată tratamentului limfomului celulelor B.

Sistemul imun al vertebratelor (de exemplu al primatelor, inclusiv uman, al mamiferelor, etc.) constă dintr-o serie de organe și tipuri de celule care au evoluat pentru recunoașterea exactă și specifică a microorganismelor eterogene ("antigen"), care invadează gazda vertebrată, configurarea specifică a acestor microorganisme eterogene și eliminarea lor (distrugerea de astfel de microorganisme eterogene). Printre altele pentru sistemul imun limfocitele sunt critice. Limfocitele sunt produse în timus, splină și măduvă osoasă la maturi și constituie cca 30% din totalul de leucocite sangvine din sistemul circulator uman (adult). Există două subpopulații principale de limfocite: celule T și celule B. Celulele T sunt responsabile pentru imunitatea mediată celular, celulele B - pentru producerea anticorpilor (imunitate umorală).

Fiecare celulă B în gazdă exprimă pe suprafața sa diverși anticorpi. Astfel, o celulă B exprimă un anticorp specific pentru un antigen, în timp ce altă celulă B exprimă anticorp specific pentru alt antigen. Astfel, celulele B sunt absolut diferite și această diversitate are o importanță deosebită pentru sistemul imun. La om fiecare celulă B poate produce un număr enorm de molecule de anticorpi (adică cca de la 10^7 la 10^8). De regulă, o asemenea producere de anticorpi încetează (sau descrește considerabil) după neutralizarea antigenului eterogen. Ocazional, însă, proliferarea anumitelor celule B este continuă și o asemenea proliferare poate avea ca rezultat un cancer, așa-numitul limfom al celulei B.

Atât celulele T, cât și celulele B conțin proteine celulare de suprafață, care se utilizează ca "marcheri" pentru diferențiere și identificare. Unul din acești marcheri ai celulei B umane este antigenul Bp35 uman cu diferențiere limitată a limfocitelor B, indicat ca "CD20". CD20 se exprimă în evoluția precoce a precelulelor B și se menține până la diferențierea celulelor plasmiei. În special, molecula CD20 poate regla o etapă în procesul de activare, care este necesar pentru inițierea ciclului celular și diferențiere și, de regulă, se exprimă la niveluri supraînalte pe celule B neoplazice ("tumoare"). Prin definiție, CD20 este prezent atât pe celulele B "normale", cât și pe celulele B "maligne", adică pe acele celule B, proliferarea continuă a cărora poate cauza limfomul celulei B. Astfel, antigenul CD20 are toate posibilitățile de a fi "afectat" de limfomul celulei B.

În esență, o astfel de afectare se produce în modul următor: pacientului i se introduc, de exemplu, anticorpi specifici pentru antigenul CD20 al celulei B. Acești anticorpi anti-CD20 se conjugă specific cu antigenul celular de suprafață CD20, evident atât al celulelor B normale, cât și celor maligne. Anticorpul anti-CD20 conjugat cu antigenul de suprafață CD20 poate provoca deteriorarea și epuizarea celulelor B neoplazice. În plus, substanțele chimice sau elementele marcate radioactiv, cu abilitate de distrugere a tumorii, pot fi conjugate cu anticorpul anti-CD20 astfel că substanța special se furnizează, de exemplu în celulele B neoplazice.

Este cunoscută metoda de tratament al limfomului celulelor B prin afectarea antigenului superficial CD20, care include administrarea anticorpului IF5 monoclonal murin (șoarece) (un anticorp anti-CD20) cu ajutorul infuziei intravenoase continue [1].

Este cunoscută metoda de tratament al limfomului celulelor B prin afectarea antigenului superficial CD20, care include administrarea anticorpului IF5 monoclonal murin marcat cu iod - 131 [2].

Dezavantajul metodelor sus-enumerate constituie dozele mari depășind 2 g de IF5 și rezultatele «instabile» ale tratamentului. În afară de aceasta, injecțiile repetate de asemenea anticorpi eterogeni pot duce la inducerea răspunsului imun, provocând reacții periculoase de hipersensibilitate. În plus, acești anticorpi «eterogeni» pot fi expuși acțiunii sistemului imun al gazdei, astfel încât ei în realitate sunt neutralizați până a-și atinge ținta sa.

Este cunoscut anticorpul himeric șoarece-om destinat acțiunii împotriva antigenului CD20 [3].

Însă, nu este furnizată nici o informație despre abilitatea, eficacitatea sau utilizarea practică a acestor anticorpi himerici pentru tratamentul tulburărilor celulei B. Mai mult decât atât, cercetările funcționale *in vitro* nu pot prezice capacitatea inerentă *in vivo* a anticorpilor himerici de a distruge sau reduce celulele țintă care exprimă antigenul specific.

Problema pe care o rezolvă prezenta invenție constă în sporirea eficienței tratamentului limfomului celulelor B.

Problema în cauză se rezolvă prin aceea că pentru tratamentul limfomului celulelor B se administrează o cantitate terapeutic eficientă a unui anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ cuprinsă între 0,001 și 30 mg/kg greutate corporală, totodată anticorpul poate fi obținut din

MD 1367 C2

3

transfectom, cuprinzand anti-CD20 în TCAE 8, depozitat la ATCC sub numărul 69119. Administrarea anticorpului poate fi înfăptuită repetat. Anticorpul pot fi administrați în 3 perioade, a doua perioadă a tratamentului fiind realizată cel târziu peste 7 zile de la prima perioadă, iar perioada a treia a tratamentului - cel târziu peste 14 zile de la prima perioadă. În a doua perioadă a tratamentului se poate administra un anticorp anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, cuprinzand anticorp monoclonal secretat de hibridomul depozitat la ATCC sub numărul HB 11388.

În afară de aceasta, se solicită un hibridom cu depozitul la ATCC sub numărul HB 11388, care secretă anticorpul anti-CD20 și un anticorp anti-CD20 monoclonal secretat de el. Anticorpul poate fi marcat cu izotopi radioactivi, totodată marcajul radioactiv se alege din grupa care include ytriu [90], indiu [111] și iod [131] și se folosește în cantități terapeutice eficiente.

Linfomul celulelor B, de asemenea, se tratează pe calea administrării în prima perioadă a tratamentului a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ, apoi în a doua perioadă a tratamentului a anticorpului anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, totodată se poate administra un anticorp anti-CD20 himeric, derivat de la un transfectom cuprinzand anti-CD20 în TCAE 8, depozitat la ATCC ca parte a numărului 69119. În a doua perioadă a tratamentului se poate administra anticorpul anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, care pot conține anticorpul monoclonal secretat de hibridomul depozitat la ATCC sub numărul HB 11388.

Celulele B sunt responsabile pentru producerea anticorpilor și în cazul intrării antigenului în organismul uman are loc stimularea lor față de diferențierea și producerea de către celulele B a anticorpilor împotriva antigenului.

Însă uneori proliferarea anumitelor celule B continuă neîncetat, ceea ce poate provoca tumoarea, numită «limfomul celulei B». Celulele B conțin proteine superficiale, care se utilizează pentru diferențiere și identificare. Unul din acești markeri ai celulelor B este antigenul Bp35 uman cu diferențiere limitată a limfocitului B marcat «CD20».

Administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, specifici la antigenul superficial CD20 provoacă distrugerea rapidă și extenuarea celulelor B neoplazice, ceea ce conduce la extenuarea celulelor B ale sangelui periferic, inclusiv a celulelor B ale limfomului, întrucât ele posedă funcționalitatea efectorilor omului, adică sunt în stare să completeze liza dependentă de complement sau să supună lizei celulele țintă umane cu ajutorul toxicității celulare care este în funcție de anticorpi sau prin intermediul fagocitozei completate de receptorii Fc.

Administrarea anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi înlătură problema accesului limitat la limfom, totodată face posibilă reducerea cantității totale a anticorpului necesar.

Administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi poate fi realizată ca administrare unică sau ca o serie de administrări succesive fără temeri față de posibilitatea dezvoltării reacției de hipersensibilitate. Iar administrarea combinată a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi și anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi face posibil de a reduce doza anticorpilor administrați, de a distruge mai rapid și sigur limfomul, fără inducerea răspunsului imunologic.

Rezultatul constă în distrugerea și extenuarea direcțională a celulelor B neoplazice și destituirea reacției de hipersensibilitate.

Invenția se elucidează prin desenele prezentate în fig. 1-17:

- fig. 1, reprezentare diagramatică a vectorului de expresie al anticorpilor himerici în tandem, folosit pentru producerea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi («TCAE 8»);
- fig. 2A-2E, secvența acidului nucleic a vectorului din fig. 1;
- fig. 3A-3F, secvența acidului nucleic a vectorului din fig. 1, cuprinzând în plus segmentele variabile ale catenelor ușoare și grele murine («anti-CD20 în TCAE 8»);
- fig. 4, acidul nucleic și secvențele aminoacide (inclusiv CDR și segmentele constante) ale segmentelor variabile ale catenei ușoare murine derivată de la anticorpul 2B8 anti-CD20 monoclonal murin;
- fig. 5, acidul nucleic și secvențele aminoacide (inclusiv CDR și segmentele constante) ale segmentelor variabile ale catenei grele murine derivate de la anticorpul 2B8 anti-CD20 monoclonal murin;
- fig. 6, rezultatele citometriei curgătoare care confirmă legarea C1q uman marcat prin fluorescență cu anticorpul anti-CD20 himeric, ce include în calitate de martor C1q marcat; C1q marcat și anticorp 2B8 anti-CD20 monoclonal murin; C1q marcat și IgG1, k uman;
- fig. 7, rezultatele lizei mediate de complement comparand anticorpul anti-CD20 himeric și anticorpul 2B8 anti-CD20 monoclonal murin;

MD 1367 C2

4

- fig. 8, rezultatele citotoxicității celulare mediate de anticorpi cu celule efectoare umane *in vivo*, comparand anticorpii anti-CD20 himerici și 2B8;
- fig. 9, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sangelui periferic la primatelor non-umane după infuzia a 0,4 mg/kg (A) de anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ;
- fig. 10, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sangelui periferic la primatelor non-umane după infuzia a 1,6 mg/kg de anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ;
- fig. 11, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sangelui periferic la primatelor non-umane după infuzia a 6,4 mg/kg de anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ;
- fig. 12, rezultatele limfopeniei celulelor B ale sangelui periferic la primatelor non-umane după infuzia a 0,01 mg/kg de anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ;
- fig. 13, rezultatele impactului tumoricid al Y2B8 într-un model xenografic de șoarece utilizând o tumoră limfoblastică de celule B;
- fig. 14, rezultatele impactului tumoricid al C2B8 într-un model xenografic de șoarece utilizând o tumoră limfoblastică de celule B;
- fig. 15, rezultatele impactului tumoricid al combinației Y2B8 și C2B8 într-un model xenografic de șoarece utilizând o tumoră limfoblastică de celule B;
- fig. 16, rezultatele analizei clinice la stadiul I/II demonstrând extenuarea populației de celule B sub acțiunea C2B8 peste un anumit timp la pacienții la care se manifestă o remisiune parțială;
- fig. 17, rezultatele analizei clinice la stadiul I/II demonstrând extenuarea populației de celule B sub acțiunea C2B8 peste un anumit timp la pacienții la care se manifestă o remisiune minoră.

Prezentarea pe scurt a invenției

Aici sunt descrise metode terapeutice de tratament al tulburărilor celulelor B și, în special, al limfoamelor celulelor B.

Aceste protocoale se bazează pe administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi. Pentru reducerea celulelor B în sângele periferic, inclusiv a celulelor B asociate cu limfom, se aplică administrarea anticorpilor anti-CD20 marcați radioactiv pentru țintirea celulelor B și administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici și anticorpilor anti-CD20 marcați radioactiv într-o strategie terapeutică asociată.

Utilizarea unui anumit anticorp anti-CD20, care se conjugă specific cu antigenul CD20 celular superficial, provoacă o digerare direcțională și o epuizare a celulelor neoplazice (făcând generalul), adică, înlătură dereglările celulelor B, vindecând limfomul celular B (făcând specialul).

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

Descrierea detaliată a invenției

Drept consecință a efectului de atenuare al limfomului celulelor B și a celei mai curente necesități de a asigura în practică tratamentul viabil al acestei maladii, au fost elaborate diverse metode, folosind anticorpii specifici 2B8 în calitate de element de legătură între metode. În cadrul uneia din ele se exploatează avantajos capacitatea sistemelor de mamifere de a recunoaște cu ușurință și eficient celulele B sangvine periferice. Folosind această metodă se înlătură sau se reduc celulele B în sângele periferic și țesutul limfatic cu scopul înlăturării limfomului celulelor B. Aceasta se realizează prin utilizarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi. Într-o altă abordare s-au făcut tentative de distrugere a celulelor efectoare tumorale cu marcaje radioactive.

O altă abordare, cea mai preferată pentru dezvoltarea anticorpului anti-CD20 himeric non-uman, se bazează pe utilizarea unui vector de expresie care include inițial DNA ce codifică segmentele constante din catenele grele și ușoare dintr-o sursă umană. Un asemenea vector permite inserarea de DNA ce codifică segmentul variabil non-uman astfel, încât se pot genera diverși anticorpi anti-CD20 non-umani, care se pot cerceta și analiza.

Ceea ce este nevoie și ceea ce ar fi un avantaj mare în domeniu, sunt abordările terapeutice având ca obiect antigenul CD20 pentru tratamentul limfoamelor celulelor B la primat, inclusiv, dar fără să se limiteze la oameni.

Termenul “anticorp anti-CD20”, folosit în prezenta descriere, semnifică un anticorp care recunoaște specific o fosfoproteină neglicozilată pe suprafața celulară și care are o mărime de 35 000 Daltoni, de regulă, numită antigen Bp35 cu diferențiere limitată a limfocitelor B, uman menționat ca CD20. Termenul “himeric” folosit cu referire la anticorpii anti-CD20 cuprinde anticorpi care sunt derivați preferențial folosind metode recombinante cu acid dezoxiribonucleic care

MD 1367 C2

5

conțin atât componente umane, cât și non-umane (inclusiv specii imunologic “inrudite”, de exemplu cimpanzeu), segmentul constant al anticorpului himeric este preferențial identic cu segmentul constant al unui anticorp uman natural; segmentul variabil al anticorpului himeric este derivat preferențial de la o sursă non-umană și are antigenicitatea și specificitatea dorită față de antigenul CD20 pe suprafața celulei. Sursa non-umană poate fi orice animal vertebrat care poate fi folosit pentru a genera anticorpi față de antigenul CD20 uman celular de suprafață sau un material ce include antigenul CD20 uman pe suprafața celulei. Asemenea surse non-umane includ (fără însă a se limita) rozătoare (de exemplu șoareci, șobolani, iepuri, etc.) și primat non-umane (Old World Monkey, maimuțe, etc.). În special, componenta non-umană (segmentul variabil) este derivată dintr-o sursă murină. Expresia “imunologic activ” folosită aici cu referire la anticorpii anti-CD20 himerici semnifică un anticorp himeric care fixează C1q uman și prezintă veriga intermediară a lizei mediate de complement (“CDC”) a liniilor de celule B limfoide umane și a lizei celulelor țintă umane prin citotoxicitate celulară intermediată de anticorpi (“ADCC”). Expresiile “marcare indirectă” și “principiul marcării indirecte” folosite aici exprimă că un agent chelatic este atașat covalent la un anticorp și, cel puțin, un radionuclid este inserat în agentul chelatic. Agenții chelatici și radionuclizii preferențiali sunt descriși în sursele [Srivastava, S.C. și Mease, R.C.; “Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies”, Nucl. Med. Bio., 18/6, 1991, p. 589-603]. Un agent chelatic preferențial este acidul 1-izotiocismatobenzil-3-metildiotilen triaminpentacetic (“MX-DTPA”); radionuclizii preferați pentru marcarea indirectă includ indiu [111] și ytriu [90]. Expresiile “marcare directă” și “principiul marcării directe” folosite aici exprimă că un radionuclid este atașat covalent direct la un anticorp (de regulă, prin restul aminoacid). Radionuclizii preferați sunt prezentați în [Srivastava, S.C. și Mease, R.C.; “Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies”, Nucl. Med. Bio., 18/6, 1991, p. 589-603]; iar radionuclidul cel mai preferat pentru marcarea directă este iodul [131] atașat covalent prin intermediul resturilor tirozinice. În special preferat însă este principiul marcării indirecte.

Metodele terapeutice descrise aici se bazează pe proprietățile sistemului imun al primatelor de a recupera rapid sau de a revitaliza celulele B din sângele periferic. În plus, datorită răspunsului imun principal al primatelor ocazionat de celulele T, în cazurile când sistemul imun are o deficiență de celule B în sângele periferic, se exclude necesitatea precauțiilor “extraordinare” (adică, izolarea pacientului, etc.). Ca o consecință a acestor și altor proprietăți ale sistemului imun al primatelor, principiul propus de terapie a tulburărilor celulelor B prevede înlăturarea celulelor B din sângele periferic folosind anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi.

Intrucât afectarea celulelor B din sângele periferic, conform definiției, poate indica necesitatea tratamentului sângelui, calea preferențială de administrare a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi și anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi este cea parenterală. Termenul “parenteral” folosit aici include administrarea intravenoasă, intramusculară, subcutanată, rectală, vaginală sau intraperitoneală, cea mai preferată fiind cea intravenoasă.

Anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi și anticorpii anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi, de regulă, se obțin prin tehnici standard, folosind un tampon acceptabil farmaceutic, de exemplu soluție fiziologică sterilă, apă-tampon sterilă, propilenglicol sau combinațiile lor, etc. Procedeele de preparare a agenților pentru administrare parenterală sunt deja cunoscute [Pharmaceutical Carriers & Formulations, Martin, Remington’s Pharmaceutical Sciences, 15th Ed. (Mack Pub. Co., Easton, PA 1975)].

Capacitatea terapeutică eficientă, specifică a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, utilă pentru producerea unui efect terapeutic unic asupra oricărui pacient poate fi determinată prin tehnici standard bine cunoscute pentru specialiștii în domeniu.

Dozajele eficiente (adică, cantitățile terapeutic eficiente) ale anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, sunt cuprinse într-un domeniu aproximativ de la 0,001 până la 30 mg/kg greutate corporală, de preferință, de la cca 0,01 până la 25 mg/kg greutate corporală, cea mai preferențială fiind gama cuprinsă între cca 0,4...20,0 mg/kg greutate corporală. Sunt viabile și alte dozaje. Factorii care influențează dozajul includ, însă nu se limitează, severitatea bolii, tratamentele anterioare, starea generală a sănătății pacientului, alte boli prezente, etc. Specialistul în domeniu poate cu ușurință să analizeze starea unui pacient și să determine doza necesară din gama menționată de dozaje sau, dacă este cazul, o doză depășind aceste limite.

Administrarea anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi în acest domeniu de doze poate fi realizată ca administrare unică sau mai multe administrări succesive. În ce privește anticorpii himerici, este de preferință o serie de administrări succesive. Această metodă preferată este

MD 1367 C2

6

elaborată pe bază de tratament metodologic al acestei maladii. Evitând aprofundarea în teorie, urmează de menționat că datorită activității imunologice și legăturii cu CD20, anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi, chiar de la prima administrare produc extenuarea celulelor B în sângele periferic; mai mult ca atât, se observă o reducere aproape completă în cca 24 de ore după tratamentul prin infuzie. Deci, drept indicație pentru administrare(-ări) ulterioară a anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi (sau anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi) pot prezenta: a) celulele B clare în sângele periferic; b) inițierea extenuării celulelor B din ganglionii limfatici; c) inițierea extenuării celulelor B din alte surse tisulare, de exemplu din măduva osoasă, tumoare, etc. Altfel formulat, prin administrările repetate ale anticorpilor anti-CD20 himerici imunologic activi, are loc o serie de fenomene, fiecare fiind considerat important pentru tratamentul eficient al bolii. Primul "fenomen" poate fi considerat ca orientat în principal spre a reduce substanțial celulele B din sângele periferic al pacientului; următoarele "fenomene" pot fi considerate fie ca orientate în special spre a înlătura simultan sau succesiv celulele B remanente din sistemul ganglionilor limfatici, fie ca înlăturare a celulelor B din alte țesuturi.

Realmente, în timp ce un dozaj unic asigură un efect pozitiv și poate fi utilizat eficient pentru tratarea și manipularea bolii, este preferențială o serie de tratament în câteva etape. Este recomandabil de a se administra pacientului o dată pe săptămână, timp de cca 2...10 săptămâni, preferențial 4 săptămâni, cca 0,4...20 mg/kg greutate corporală de anticorpi anti-CD20 himerici imunologic activi.

Referitor la folosirea anticorpilor anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi este preferabil ca anticorpii să nu fie himerici. Acest fapt este dictat de perioada circulatorie de înjumătățire semnificativ mai lungă a anticorpilor himerici față de anticorpii murini (adică, radionuclidul cu o perioadă circulatorie de înjumătățire mai lungă este prezent în organismul pacientului un timp mult mai îndelungat). Totuși, anticorpii himerici marcați cu izotopi radioactivi pot fi utilizați benefic în doze mult mai scăzute, în mili-Curie ("mCi"), împreună cu un anticorp himeric înrudit cu anticorpii murini. Acest fapt permite reducerea toxicității în măduva osoasă până la un nivel acceptabil, menținând în același timp efectul terapeutic.

Conform prezentei invenții pot fi aplicați mulți și diverși radionuclizi cunoscuți din care specialiștii în domeniu vor avea posibilitatea să determine ușor radionuclidul adecvat pentru fiecare caz concret.

Cu apariția agenților chelatici superiori posibilitatea atașării grupelor chelatice metalice la proteine a permis de a utiliza alți radionuclizi, cum sunt indiul [131] și ytriul [90]. Ytriul [90] are câteva avantaje în cazul utilizării în radioimunoterapie: perioada de înjumătățire a ytriului [90] de 64 de ore este suficient de lungă pentru a permite acumularea anticorpilor în tumoare și, de exemplu, spre deosebire de iod [131], ytriul [90] este un emițător pur de radiație beta de energie înaltă neînsoțită de radiația gama la atenuarea ei cu un domeniu în țesuturi de la 100 până la 1000 diametre celulare. În plus, cantitatea minimă de radiație penetrantă permite administrarea anticorpilor marcați cu ytriu [90] pacienților fără să fie în mod necesar spitalizați. Mai mult decât atât, nu este necesară interalieră anticorpului marcat pentru distrugerea celulelor, iar emisia locală de radiație ionizantă va fi letală pentru celulele tumorale învecinate lipsite de antigen țintă.

Unica limitare neterapeutică pentru ytriu [90] se bazează pe absența radiației gama semnificative care face dificilă obținerea imaginii. Pentru evitarea acestor probleme se poate utiliza un radionuclid de diagnosticare cum este indiul [111] care "formează imagini" pentru localizarea și determinarea mărimii relative a tumorii înaintea administrării dozei terapeutice de anti-CD20 marcat cu ytriu [90]. Indiul [111] este preferat în special ca radionuclid de diagnosticare, deoarece în doză de cca 1...10 mCi el este inofensiv și poate fi administrat fără toxicitate manifestă; datele tomografice, de regulă, se prognozează prin distribuția ulterioară a anticorpului marcat cu ytriu [90]. De regulă, în studiile tomografice se utilizează anticorpii marcați cu 5 mCi de indiul [111], deoarece această doză este sigură și inofensivă, cu un rezultat tomografic substanțial eficientizat comparativ cu dozele mai mici, imaginea optimă fiind obținută la 3...6 zile după administrarea anticorpului [Murray J.L., 26 J. Nuc. Med., 1985, p. 3328 și Carraguiilo, J.A. et al., 26 J. Nuc. Med., 1985, p. 67].

Dozajele unice eficiente ale tratamentului (adică, cantitățile terapeutic eficiente) ale anticorpilor anti-CD20 marcați cu ytriu [90] sunt încadrate în domeniul de cca 5...75 mCi, preferabil între cca 10 și cca 40 mCi. Dozajele ablative unice, eficiente de tratament (adică, pot necesita transplantare de măduvă osoasă) ale anticorpilor anti-CD20 marcați cu iod [131] sunt cuprinse în domeniul de cca 30...600 mCi, de preferință, de la cca 50 și mai puțin decât cca 500 mCi. În combinație cu un anticorp anti-CD20 himeric, datorită perioadei circulatorii de înjumătățire mai îndelungate față de

MD 1367 C2

7

anticorpii murini, dozele ablative unice eficiente pentru tratamentul măduvei non-osoase ale anticorpilor anti-CD20 himerici marcați cu iod [131] sunt cuprinse în domeniul de cca 5...40 mCi, de preferință mai puțin de cca 30 mCi. Doza necesară, de exemplu a marcajului cu indiu [111] pentru obținerea imaginii constituie cel mult 5 mCi.

În ce privește anticorpii anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi, se poate aplica o terapie la fel folosind un tratament terapeutic unic sau folosind tratamente multiple. Datorită componentei radionuclidice, este de preferat ca înaintea tratamentului să fie prelevate celule din ramificațiile periferice ("PSC") sau măduva osoasă ("BM") la pacienții care manifestă toxicitate potențială fatală a măduvei osoase sub acțiunea radiației ionizante. BM și/sau PSC se prelevă folosind tehnici standard, apoi se curăță și se congelează pentru o posibilă reinfuzie. Suplimentar, adesea este de preferat ca anterior tratamentului să se facă un examen dozimetric de diagnosticare al pacientului, folosind un anticorp marcat pentru diagnosticare (de exemplu, folosind indiu [111]), scopul fiind asigurarea următorului moment: anticorpul marcat terapeutic (de exemplu, cu ytriu [90]) nu se va "concentra" în alt țesut sau organ sănătos.

Specialiștilor în domeniu le sunt cunoscute metodologii de generare a anticorpilor himerici. De exemplu, catenele ușoare și grele pot fi exprimate separat folosind, de exemplu, catena ușoară a imunoglobulinei și catenele grele ale imunoglobulinei în plasmide separate. Apoi, acestea pot fi purificate și colectate *in vitro* în anticorpi complecși. Sunt cunoscute metodologii de obținere a unor asemenea structuri [Scharff, M; Harvey Lectures, 1974, vol. 69, p. 125]. Sunt, de asemenea, cunoscuți parametrii reacției *in vitro* pentru obținerea anticorpilor IgG din catene grele și ușoare izolate reduse [Beychok, S. Cells of immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, p. 69, 1979]. De asemenea, este posibilă coexpresia catenelor ușoare și grele în aceleași celule pentru a obține asocierea intracelulară și conexiunea catenelor grele și ușoare în anticorpi complecși H₂L₂IgG. Asemenea coexpresie se poate realiza folosind aceeași plasmidă sau plasmide diferite în aceeași celulă gazdă.

Conform invenției, cei mai preferați anticorpi anti-CD20 himerici s-au obținut folosind vectorul TCAE 8 (această regiune reprezintă o secvență parțial slăbită Kozak).

Detalii referitoare la impactul sitului de start al inițierii marșului selectiv dominant al vectorilor TCAE (numiți, de asemenea, "vectori ANEX") vizavi de expresia proteinei sunt dezvăluite în cererea depusă și examinată paralel și include sectoare variabile murine, preparate din anticorpul anti-CD20 monoclonal. Acest anticorp se notează "2B8".

TCAE 8 cuprinde patru (4) casete transcripționale amplasate în tandem, adică, catenă ușoară de imunoglobulină umană fără regiune variabilă; catenă grea de imunoglobulină umană fără regiune variabilă; DHFR și NEO. Fiecare casetă transcripțională conține propriul său promotor eucariotic și regiunea de poliadenilare (referința este făcută la fig. 1, care este o reprezentare diagramatică a vectorului TCAE 8). În special:

1) promotorul/intensificatorul CMV în fața catenei grele a imunoglobulinei este o versiune truncată a promotorului/intensificatorului din fața catenei ușoare de la situl Nhe I cca - 350 până la situl Sst I cca -16;

2) o regiune constantă a catenei ușoare de imunoglobulină umană s-a derivat pe calea amplificării cDNA printr-o reacție PCR. În TCAE 8 s-au folosit regiuni constante kapa ale catenei ușoare de imunoglobulină umană (numerotate conform Kabat, aminoacizii 108...214 alotip Km 3 [Kabat, E.A. "Sequences of Proteins of immunological interest", NIH Publication, Fifth Ed., No. 91, 1991, p. 3242] și regiunea constantă gama 1 a catenei grele de imunoglobulină umană (numerotate conform Kabat a aminoacizilor 114...478, alotip Gmla, Gmlz). Catena ușoară s-a izolat din sângele uman normal (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA); RNA de aici s-a folosit pentru sinteza cDNA, care apoi a fost amplificat folosind tehnici PCR (primerii s-au derivat exact conform Kabat). Catena grea s-a izolat (folosind tehnici PCR) din cDNA preparat de la RNA care, la rândul său, s-a derivat din celule în care a fost transfectat un vector IgG1 uman [3 Prot. Eng. 531, 1990; vectorul pN₁62]. S-au substituit doi aminoacizi în IgG1 uman izolat pentru împerecherea secvenței aminoacide conform Kabat, anume: în poziția 225 aminoacidul valină a fost substituit cu alanină (GTT cu GCA), iar în poziția 287 aminoacidul metionină s-a substituit cu lizină (ATG cu AAG);

3) casetele catenelor ușoare și grele de imunoglobulină umană conțin secvențe de semnal sintetice pentru secretarea catenelor imunoglobuline;

4) casetele catenelor ușoare și grele de imunoglobulină umană conțin situri DNA de restricție specifice care permit inserarea regiunilor variabile ale catenelor ușoare și grele de imunoglobulină

MD 1367 C2

8

care mențin cadrul de citire tranzițional și nu alterează aminoacizii prezenți, de regulă, în catenele imunoglobulinei;

5) caseta DHFR conține propriul său promotor eucariotic (promotorul principal pe baza β -globinei de șoarece, "BETA") și regiunea de poliadenilare (poliadenilarea hormonului bovin de creștere, "BGH");

6) caseta NEO conține propriul său promotor eucariotic (BETA) și regiunea de poliadenilare (poliadenilare precoce SV40, "SV").

Referitor la vectorul TCAE 8 și caseta NEO, regiunea Kozak a fost parțial extenuată prin secvență conform Kozak (care include un sit Cla 1 în amonte);

Cla 1 -3 +1
GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt

(în vectorul TCAE 5.2, substituția are loc între regiunile Cla 1 și ATG, anume: ccAcc).

Lista secvenței complete TCAE 8 (inclusiv componentele specifice ale celor 4 casete transcripționale) este prezentată în fig. 2 (secvența 1D nr. 1).

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

S-a derivat o regiune variabilă non-umană preferențială cu specificitate față de antigenul CD20 folosind o sursă murină și tehnologia hibridoamelor. Folosind reacția de polimerizare de lanț ("PCR"), regiunile variabile murine ușoare și grele s-au clonat direct în vectorul TCAE 8, aceasta fiind ruta preferabilă pentru încorporarea regiunii variabile non-umane în vectorul TCAE. Această preferință este, în principiu, bazată pe eficiența reacției PCR și corectitudinea inserării. Totuși pentru realizarea acestei sarcini sunt acceptabile și alte proceduri echivalente. De exemplu, folosind TCAE 8 (sau un vector echivalent) se poate obține secvența regiunii variabile a anticorpului anti-CD20 non-uman, urmată de sinteza oligonucleotidelor, porțiunilor secvenței sau dacă corespunde, a întregii secvențe; ulterior, porțiunile sau întreaga secvență sintetică se poate insera în localizările corespunzătoare din vector. Specialiștii în domeniu au pregătirea pentru realizarea acestora.

Anticorpii anti-CD20 himerici imunologic activi, conform invenției, preferențial s-au derivat din utilizarea vectorului TCAE 8 care a inclus regiuni variabile derivate de la anticorpii monoclonali față de CD20; acest anticorp (va fi descris în detaliu în continuare), s-a numit "2B8". Secvența completă a regiunilor variabile obținute din 2B8 în TCAE 8 ("anti-CD20 în TCAE 8") este prezentată în fig. 3 (secvența 1D nr. 2).

Linia celulară gazdă utilizată pentru expresia proteinei preferențial este de origine mamiferă. Specialiștii în domeniu pot determina liniile celulare gazdă speciale ce sunt cele mai adecvate pentru produsul genetic opțional care trebuie exprimat în ele. Liniile celulare gazdă standard includ, fără însă să fie limitate, DG44 și DUXB11 (linie ovariană de hamster chinezesc (CHO), minus DHFR), HELA (carcinom uman cervical), CVI (linie renală de maimuță), COS (un derivat al CVI cu antigen SV 40 T), R1610 (fibroblaste de hamster chinezesc), BALBC/3T3 (fibroblaste de șoarece), HAK (linie renală de hamster), SP2/0 (mielom de șoarece), P3x63-Ag3.653 (mielom de șoarece), BFA-lclBPT (celule endoteliale bovine), RAJI (limfocite umane) și 293 (rinichi uman). Liniile celulare gazdă de regulă sunt obținute din surse comerciale, de la ATCC sau sunt selectate din literatura publicată.

De preferință, linia celulară gazdă este DG44 ("CHO") sau SP2/0 [Urland, G. et al., "Effect of gamma ray and the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions." *Som. Cell & Mol. Gen.* 12/6, 1986, p. 555-566], [Shulman, M. et al., "A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies." *Nature*, 1978, p. 276-269]. Cea mai preferată este linia celulară gazdă DG44.

Transfecția plasmidei în celula gazdă se poate realiza prin orice metodă accesibilă specialiștilor în domeniu. Acestea includ, însă nu se limitează la, transfecția (inclusiv electroforeza și electroporarea), fuziunea celulară cu DNA învelit, microinjectarea și infectarea cu virus intact [Ridgway, A.A.G. "Mammalian Expression Vectors", cap. 24.2, p. 470-472 Vectors, Rodriguez and Denhardt, Eds (Butterworths, Boston, MA 1988)]. Cea mai preferată cale de administrare a plasmidei în gazdă este cea a electroporării.

S-a derivat o regiune variabilă non-umană preferențială cu specificitate față de antigenul CD20 folosind o sursă murină și tehnologia hibridoamelor. Folosind reacția de polimerizare în lanț

MD 1367 C2

9

(“PCR”), regiunile variabile murine ușoară și grea s-au clonat direct în vectorul TCAE 8, aceasta fiind ruta cea mai preferată pentru încorporarea regiunii variabile non-umane în vectorul TCAE. Această preferință este în principal bazată pe eficiența reacției PCR și corectitudinea inserării. Totuși, pentru realizarea acestei sarcini sunt accesibile și alte proceduri echivalente. De exemplu, folosind TCAE 8 (sau un vector echivalent) se poate obține secvența regiunii variabile a anticorpului anti-CD20 non-uman, urmată de sinteza oligonucleotidelor, porțiunilor secvenței sau, dacă corespunde, a întregii secvențe; ulterior, porțiunile sau întreaga secvență sintetică se poate insera în localizările corespunzătoare din vector.

Specialiștii în domeniu au pregătirea necesară pentru realizarea acestora.

EXAMPLE

Următoarele exemple nu vor fi interpretate ca limitând invenția. Exemplele ilustrează vizualizarea dozei folosind anticorpi anti-CD20 marcați cu izotopi radioactivi (I2B8[™]); anticorpul anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi (Y2B8) și anticorpul anti-CD20 himeric imunologic activ (“C2B8”) derivat prin utilizarea unui vector specific (“TCAE 8”) și regiunilor variabile derivate de la un anticorp anti-CD20 monoclonal murin (“2B8”).

1. ANTICORP 2B8 ANTI-CD20 MARCAT CU IZOTOPI RADIOACTIVI

A. Obținerea anticorpului anti-CD20 monoclonal (murin) (“2B8”)

Șoarecii BALB/c s-au imunizat repetat cu linia celulară limfoblastică umană SB [Adams, R.A. et al., Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2. Can Res, vol. 28, 1968, p.1121-1125] (această linie celulară este accesibilă la Colecția Americană de Culturi de Țesuturi (ATCC), Rockville, MD, sub nr. de acces ATCC CL 120) prin injecții săptămânale timp de 3-4 luni. S-au identificat șoareci care manifestă titre serice ridicate de anticorpi anti-CD20, așa cum s-a determinat prin inhibiția anticorpilor CD20 specifici cunoscuți (anticorpii anti-CD20 utilizați au fost Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA nr. catalog 7670 și B1, Coulter Corp.; Hialeah, FL, nr. catalog 6602201); apoi de la acești șoareci s-a îndepărtat splina. Celulele splenice s-au fuzionat cu celule de mielom SP2/0 de șoarece în conformitate cu protocolul cunoscut (SP2/0 are nr. de acces la ATCC, ATCC CRL 8006) [EINFELD D.A. et al., EMBO, 1988, vol.7, p. 711] .

Examinările pentru determinarea specificității CD20 s-au realizat prin test radioimun. Anti-CD20 B1 purificat a fost marcat cu izotopul radioactiv I¹²⁵ prin metoda cunoscută [Valentine, M.A. et al., J.Biol. Chem, 1989, vol. 264, p. 11282 (iodură de sodiu I¹²⁵, ICN, Irvine, CA, nr. catalog 28665H)]. Hibridoamele s-au concentrat prin incubare îmbinată a 0.05 ml de mediu din fiecare godeu de fuziune împreună cu 0.05 ml de anti-CD20 B1 marcat cu izotopul I¹²⁵ (10 ng) în BSA, PBS 1% (pH 7.4) și 0.5 ml din același tampon conținând 100 000 celule SB. După incubare, timp de 1 oră la temperatura camerei, celulele s-au recoltat prin transferare în plăci de titrare cu 96 godeuri (V&P Scientific, San Diego, CA) și s-au spălat intens. Godeurile duble conținând anti-CD20 B1 nemarcat și godeurile lipsite de anticorp inhibitor au fost folosite drept martor pozitiv și negativ, respectiv. Godeurile conținând anticorpi cu mai mult de 50 % inhibiție au fost mărite și clonate. Anticorpul manifestând cea mai ridicată inhibiție s-a derivat de la linia celulară clonată desemnată aici ca “2B8”.

B. Prepararea conjugatului 2B8-MX-DTPA

i. MX-DTPA

Ca agent chelatic pentru conjugarea izotopului radioactiv marcat cu 2B8 s-a utilizat acidul 1-izotiocianatobenzil-3-metildietilen-triamin-penta-acetic marcat cu C¹⁴ (“MX-DTPA marcat cu C¹⁴”). Manipulările de MX-DTPA s-au produs pentru menținerea condițiilor fără metale, adică folosind reactivi lipsiți de metale și, după posibilitate, s-au utilizat containere din polipropilenă (bidoane, cilindri gradați, pahare de laborator, pipete) spălate cualconox și clătite cu apă Milli-Q. S-a obținut MX-DTPA sub formă de solid uscat de la Dr. Otto Gansow (National Institute of Health, Bethesda, MD) și s-a depozitat astfel deshidratat la 4°C (protejat de lumină), soluțiile bazice fiind preparate în apă Milli-Q la o concentrație de 2-5 mM depozitate la -70°C.

MX-DTPA s-a obținut, de asemenea, de la Coulter Immunology (Hialeah, Florida) ca sare disodică în apă și s-a depozitat la -70°C.

ii. Prepararea 2B8

S-a preparat 2B8 purificat pentru conjugare cu MX-DTPA prin transferarea anticorpului în 50 mM bicin-NaOH lipsit de metale, pH 8.6, conținând 150 mM NaCl, utilizând schimbul repetat de tampon cu ajutorul filtrelor rotative CENTRICOM 30[™] (30 000 D, MWCO; Amicon). De regulă, în filtru se adaugă 50-200 μl de proteină (10 mg/ml), urmat de 2 ml tampon de bicin. Filtrul s-a centrifugat la 4°C într-o centrifugă Sorval SS-34 (6000 rot./min, timp de 45 min). Volumul menținut

MD 1367 C2

10

a constituit cca 50...100 μ l; mai mult decât atât, această procedură s-a repetat de două ori folosind același filtru. Volumul menținut s-a transferat într-o eprubetă din polipropilenă de 1.5 ml prevăzută cu capsulă de închidere, s-a examinat pentru proteină, s-a diluat până la 10.0 mg/ml și s-a depozitat la 4°C până la utilizare. Analogic proteina s-a introdus în 50 mM de citrat de sodiu, pH 5.5, conținând 150 mM NaCl și azotură de sodiu 0.05%, folosind protocolul de mai sus.

iii. Conjugarea 2B8 cu MX-DTPA

Conjugarea 2B8 cu MX-DTPA s-a realizat în eprubete de polipropilenă la temperatură ambiantă. Soluțiile bazice congelate de MX-DTPA s-au dezghețat imediat înainte de utilizare. 50...200 ml de proteină la 10 mg/ml au intrat în reacție cu MX-DTPA, raportul molar al MX-DTPA și 2B8 fiind 4:1. Reacțiile s-au inițiat prin adăugarea soluției de rezervă MX-DTPA agitând atent; conjugarea s-a efectuat de la 14 până la 20 ore la temperatura ambiantă. MX-DTPA nereacționat s-a înlăturat din conjugat prin dializă sau ultrafiltrare repetată, așa cum s-a descris mai sus în exemplul I.B.ii, în soluție salină normală lipsită de metal (0.9% greutate/volum) care conține azotură de sodiu 0.05%. Concentrația proteinei s-a corectat până la 10 mg/ml și s-a depozitat la 4°C într-o eprubetă de polipropilenă până la marcarea cu izotopi radioactivi.

iv. Determinarea încorporării de MX-DTPA

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

S-a preparat o soluție stoc de clorură de ytriu de concentrație cunoscută în HCl 0.05N fără metal la care s-a adăugat ytriu [90] fără purtător (sare clorică). S-a analizat un alicvot al acestei soluții prin numărarea de scintilații în lichid pentru a determina o activitate specifică precisă pentru acest reactiv. Într-o eprubetă de propilenă s-a adăugat un volum de reactiv clorură de ytriu egal cu 3 x numărul de moli de chelat așteptat să se atașeze la anticorp (de regulă, 2 mol/mol anticorp) și s-a corectat pH-ul până la 4.0...4.5 cu acetat de sodiu 2M. Ulterior s-a adăugat anticorpul conjugat și amestecul s-a incubat 15...30 min la temperatura ambiantă. Reacția s-a oprit prin adăugare de EDTA 20 mM până la o concentrație finală de 1 mM, pH-ul soluției s-a ajustat până la aproximativ pH 6 cu acetat de sodiu 2M.

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

v. Imunoactivitatea lui 2B8-MX-DTPA

Imunoactivitatea conjugatului 2B8 s-a examinat folosind celula integrală ELISA. S-au recoltat din cultură celule SB în faza Mid-log prin centrifugare și s-au spălat de 2 ori cu 1xHBSS. S-au diluat celulele până la 1-2 x10⁶ celule/ml în HBSS și s-au împărțit în plăci de microtitrare din polistiren cu 96 godeuri la 50000...100000 celule/godeu. Plăcile s-au uscat în vid timp de 2 ore la 40...45°C pentru fixarea celulelor la plastic, până la utilizare plăcile s-au păstrat la loc uscat la -20°C. Pentru examen s-au încălzit plăcile la temperatura ambiantă imediat înaintea folosirii, apoi s-au blocat cu 1xPBS, pH 7.2...7.4, care conține BSA 1% (2 ore). Probele pentru examinare s-au diluat în 1xPBS/BSA 1 %, s-au aplicat la plăci și s-au diluat serial (1:2) în același tampon. După incubarea plăcilor timp de 1 oră, la temperatura ambiantă plăcile s-au spălat de 3 ori cu 1xPBS. S-a adăugat la godeuri anticorpul secundar (50 μ l conjugat HRP anti-șoarece IgG1-specific) (diluție 1:1500d în 1xPBS/BSA 1%) și s-au incubat 1 oră la temperatura ambiantă. Plăcile s-au spălat de 4 ori cu 1xPBS, după care s-a adăugat soluție substrat ABTS (citrat de sodiu 50 mM, pH 4.5, conținând ATBS 0.01% și H₂O₂ 0.001%). Plăcile s-au citit la 405 nm după incubare 15...30 min. Celulele HSB antigen-negative s-au inclus în examinări pentru urmărirea legăturii nespecifice. Imunitatea conjugatului s-a calculat prin marcarea valorilor absorbantei față de factorul de diluție respectiv și comparând acestea cu valorile obținute folosind anticorp nativ (care reprezintă 100 % imunoactivitate), s-au testat pe aceeași placă, s-au comparat câteva valori de pe porțiunea lineară a profilului titrării și s-a determinat o valoare medie (date neprezentate).

vi. Prepararea lui 2B8-MX-DTPA marcat cu indiu [111] ("12B8")

Conjugatele s-au radiomarcate cu indiu [111] fără purtător. S-a transferat un alicvot al izotopului (0.1...2 mCi/mg anticorp) în HCl 0.05 M într-o eprubetă de propilenă și s-a adăugat aproximativ 1/10 volum de HCl 2M fără metal. După incubare timp de 5 min, s-a adăugat acetat de sodiu 2M

MD 1367 C2

11

fără metal pentru a ajusta pH-ul soluției până la 4.0...4.4. S-au adăugat dintr-o soluție stoc DTPA 10.0 mg/ml în soluție salină normală aproximativ 0.5 mg de 2B8-MX-DTPA, sau citrat de sodiu 50 mM/NaCl 150 mM conținând azotură de sodiu 0.05% și soluția s-a amestecat imediat cu grijă. S-a controlat pH-ul soluției cu hârtie de pH măsurând o valoare de 4.0...4.5 și amestecul s-a incubat la temperatura camerei timp de 15...30 min. Ulterior, reacția s-a oprit prin adăugare de EDTA 20 mM până la o concentrație finală de 1 mM și amestecul de reacție s-a adus la pH aproximativ 6.0 folosind acetat de sodiu 2 M.

După o incubare de 5...10 min radioizotopul necompletat s-a îndepărtat prin cromatografie de excludere după mărime. Unitatea HPLC a constatat dintr-un Waters Model 6000 sau TosoHaas Model TSK-6110, având sistem de eliberare respectiv, fiind prevăzut cu o valvă de injectare Waters U6K sau Rheodine 700. Separările cromatografice s-au realizat folosind o coloană cu gel de permeativitate (BioRad SEC-250; 7.3x300 mm sau o coloană comparabilă TosoHaas) și o coloană de gardă SEC-250 (7.5x100 mm). Sistemul a fost echipat cu un colector de fracție (Pharmacia Frac200) și un monitor UV prevăzut cu un filtru de 280 nm (Pharmacia model UV-1). S-au aplicat probele și s-au eluat izocromatic folosind 1xPBS, pH 7.4, la o rată de curgere de 1.0 ml/min. S-au colectat în eprubete de sticlă 100 ml de fracțiuni și alicvot din aceștia s-au cuantificat într-un numărător gama. Ferestrele inferioară și superioară s-au montat la 100 și respectiv 500 KeV.

S-a calculat radioîncorporarea prin însumarea radioactivității asociate cu maximul proteinei eluate și împărțirea acestui număr prin radioactivitatea totală eluată din coloană; această valoare a fost apoi exprimată ca procent (datele nu s-au prezentat). În câteva cazuri radioîncorporarea s-a determinat folosind cromatografia instantanee în strat subțire ("ITLC"). Conjugatul marcat cu izotopi radioactivi s-a diluat 1:10 sau 1:20 în 1xPBS sau în 1xPBS/DTPA 1mM, apoi 1 μ l s-a colorat la 1.5 cm de la capătul unei fâșii de hârtie ITLC SG de 1x5cm. Hârtia s-a dezvoltat prin cromatografie ascendentă folosind acetat de amoniu 10% în metanol: apă (1:1 v/v).

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

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

Pentru câteva experimente, 2B8-MX-DTPA s-a radiomarcant cu indiu [111] urmând un protocol similar cu unul dintre cele descrise mai sus, dar fără purificare prin HPLC: aceasta a fost denumit protocol "mix-and-shoot".

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

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

C. Studii pe animal non-uman

i. Biodistribuția lui 2B8-MX-DTPA marcat cu izotopi radioactivi

S-a evaluat I2B8 pentru biodistribuția tisulară la șoarecii BALB/c de 6 - 8 săptămâni. Conjugatul marcat cu izotopi radioactivi s-a preparat folosind 2B8-MX-DTPA grad clinic, urmând protocolul "mix-and-shoot", descris mai sus. Activitatea specifică a conjugatului a fost 2.3 mCi/mg și conjugatul s-a formulat în PBS, pH 7.4 care conține HSA 50 mg/ml. Șoarecii s-au injectat intravenos cu 100 μ l de I2B8 (aproximativ 21 μ Ci) și grupuri de câte 3 șoareci s-au sacrificat prin dislocare cervicală la 0, 24, 48 și 72 ore. După sacrificare s-au păstrat coada, inima, plămânii, ficatul, rinichii, splina, mușchii și femurul care s-au spălat și s-au cântărit. De asemenea, s-a recuperat pentru analiză o probă de sânge. Radioactivitatea asociată cu fiecare specimen s-a determinat prin numărare gama și ulterior s-a determinat procentul dozei injectate /g de țesut. Nu s-a acordat atenție contribuției scăderii activității reprezentată prin sângele asociat cu organele individuale.

Într-un protocol separat s-au incubat probe alicvot de 2B8-MX-DTPA la 4°C și 30°C timp de 10 săptămâni și s-au radiomarcant cu indiu [111] pentru activitate specifică de 2.1 mCi/mg pentru ambele preparate. Aceste conjugate s-au folosit apoi în studiile biodistribuției la șoareci așa cum s-a descris mai sus.

MD 1367 C2

12

Pentru determinări dozimetrice s-a radiomarcant 2B2-MX-DTPA cu indiu [111] până la activitate specifică de 2.3 mCi/mg și s-au injectat aproximativ 1.1 μ Ci în fiecare din 20 șoareci BALB/c. În continuare, grupuri de câte 5 șoareci s-au sacrificat la 1, 24, 48 și 72 ore, organele fiind păstrate și preparate pentru analiză. Suplimentar, s-au recuperat porțiuni de piele, mușchi și os și s-au prelucrat pentru analize; de asemenea, s-au colectat urina și fecalele și s-au analizat pentru momentele 24 și 72 ore.

Folosind o abordare similară, 2B8-MX-DTPA s-a radiomarcant, de asemenea, cu ytriu [90] și distribuția sa biologică s-a evaluat la șoarecii BALB/c după o perioadă de timp de 72 ore. După purificare prin cromatografie HPLC de excludere după mărime, 4 grupe de 5 șoareci fiecare s-au injectat i.v. cu aproximativ 1 μ Ci de conjugat formulat clinic (activitate specifică: 12.2 mCi/mg); grupele au fost apoi sacrificate la 1, 24, 48 și 72 ore, organele și țesuturile lor fiind analizate cum s-a descris mai sus. Radioactivitatea asociată cu fiecare specimen de țesut s-a determinat prin măsurarea energiei radiației de frânare cu un contor de scintilație gama. Valorile activității au fost exprimate ulterior ca procent doză injectată per gram țesut sau procent doză injectată per organ. Deoarece organele și alte țesuturi s-au clătit repetat pentru îndepărtarea sângelui superficial, organele nu au fost perfuzate. Astfel, valorile activităților organului nu au scăzut din contribuția de activitate reprezentată de către sângele intern asociat.

ii. Localizarea tumorală a I2B8

Localizarea 2B8-MX-DTPA marcat cu izotopi radioactivi s-a determinat la șoareci purtători de tumori ale celulei B atimice Ramos. Șoarecii atimici în vârstă de 6...8 săptămâni s-au injectat subcutanat (în partea dorsală stângă) cu 0.1 ml de RPMI-1640, conținând 1.2×10^7 celule tumorale Ramos care au fost anterior adaptate pentru creștere în șoareci atimici. Tumorile s-au dezvoltat în două săptămâni și au fost cuprinse în domeniul de greutate de la 0.07 până la 1.1 g. Șoarecii s-au injectat intravenos cu 100 μ l de 2B8-MX-DTPA marcat cu indiu [111] (16.7 μ Ci) și grupuri de câte 3 șoareci s-au sacrificat prin dislocare cervicală la 0, 24, 48 și 72 ore. După sacrificare s-au recuperat coada, inima, plămânii, ficatul, rinichii, splina, mușchii, femurul și tumoarea, fiind spălate și cântărite; de asemenea, s-a prelevat pentru analiză o probă de sânge. S-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare specimen prin numărare gama și s-a determinat procentul doză injectată/g țesut.

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

După experimentul preliminar asupra biodistribuției descris mai sus (Exemplul I.B.viii.a) s-a radiomarcant conjugatul 2B8 cu indiu [111] până la o activitate specifică de 2.3 mCi/mg și aproximativ 1.1 μ Ci s-au injectat în fiecare din 20 de șoareci BALB/c pentru a determina biodistribuția materialului marcat. În continuare, s-au sacrificat grupuri de 5 șoareci la 1, 24, 48 și 72 ore, iar organele lor și o porțiune de piele, mușchi și os s-au oprit și s-au prelucrat pentru analize. În plus, s-a colectat urina, fecalele și s-au analizat pentru momentele de timp 24 la 72 ore. Nivelul radioactivității în sânge a scăzut de la 40.3% doză injectată per gram la o oră, până la 18.9% la 72 ore (datele nu s-au prezentat). Valorile pentru inimă, rinichi, mușchi și splină au rămas în domeniul 0.7-0.9% de-a lungul experimentului. Nivelurile de radioactivitate găsite în plămâni au scăzut de la 14.2% la 1 oră până la 7.6% la 72 ore; în mod asemănător, respectiv doza injectată per gram în ficat a scăzut de la 10.3% la 9.9%. Aceste date s-au folosit în determinarea dozei de radiații absorbite estimate I2B8 descrisă mai jos.

Biodistribuția conjugatului marcat cu ytriu [90] având o activitate specifică de 12.2 mCi/mg anticorp s-a evaluat la șoareci BALB/c. S-au obținut radioîncorporări de peste 90% și anticorpusul marcat cu izotopi radioactivi s-a purificat prin HPLC. Depozitul tisular de radioactivitate s-a evaluat în organele principale și piele, mușchi, os, urină și fecale după 72 ore și s-a exprimat ca procent doză injectată/g țesut. Rezultatele (neprezentate) au evidențiat că în timp ce nivelurile de radioactivitate asociată cu sângele au scăzut de la aproximativ 39.2% doză injectată/g la o oră până la aproximativ 15.4% după 72 ore, nivelurile radioactivității asociate cu coada, inima, rinichiul, mușchiul și splina au rămas îndeajuns de constante la 10.2% sau mai mici în cursul experimentului. Important a fost faptul că radioactivitatea asociată cu osul a fost în domeniul de la 4.4% de doză injectată/g la 1 oră, până la 3.2% la 72 ore. Toate acestea, luate împreună, sugerează că puțin ytriu liber s-a asociat cu conjugatul și că puțin radiometal liber s-a eliberat în timpul desfășurării studiului. Aceste date s-au folosit pentru determinarea dozei de radiații absorbite pentru Y2B8 descris mai jos.

Pentru studii asupra localizării tumorale, s-a preparat 2B8-MX-DTPA și s-a marcat radioactiv cu indiu [111] până la o activitate specifică de 2.7 mCi/mg. În continuare s-au injectat 100 μ l de conjugat marcat (aproximativ 24 μ Ci) în fiecare din 12 șoareci atimici purtători de tumori Ramos ai

MD 1367 C2

13

celulei B. Tumorile au aparținut în greutate domeniului de la 0.1 până la 1.0 g. La momentele de timp 0, 24, 48 și 72 ore după injecție s-au prelevat 50 μ l de sânge prin puncție retro-orbitală, șoarecii s-au sacrificat prin dislocare cervicală și s-au reținut coada, inima, plămânii, ficatul, rinichii, splina, mușchii, femurul și tumoarea. După prelucrarea și cântărirea țesuturilor s-a determinat radioactivitatea asociată cu fiecare tip de țesut folosind un contor gama și valorile s-au exprimat ca procent doză injectată/g.

Rezultatele (neprezentate) au evidențiat că concentrațiile tumorale ale 2B8-MX-DTPA marcat cu indiu [111] au crescut constant în cursul experimentului. Din doza injectată 13% s-au acumulat în tumoare după 72 ore. În contrast, nivelurile sangvine au scăzut în timpul experimentului de la peste 30% la momentul 0, până la 13% la 72 ore. Toate țesuturile (excepție mușchiul) au conținut între 1.3 și 6.0% doză injectată/g țesut la sfârșitul experimentului; țesutul muscular a conținut aproximativ 13% din doza injectată/g.

D. Studii umane

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

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

În ganglionii limfoizi s-a observat imunoreactivitate într-o populație de limfocite B corticale mature la fel de bine ca și în celulele proliferative din centrele germinale. De asemenea, s-a observat reactivitate pozitivă în sângele periferic, ariile de celule B ale amigdalelor, pulpa albă a splinei și cu 40...70% din limfocitele medulare găsite în timus. De asemenea, s-a observat reactivitate pozitivă în foliculii laminei propria (Peyer's Patches) ale intestinelor mari. În final, au fost de asemenea pozitive cu anticorpul 2B8 celule grupate sau izolate în stroma diferitelor organe, inclusiv vezica urinară, sân, col uterin, esofag, plămân, parotidă, prostată, intestin subțire și stomac (datele nu s-au prezentat).

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

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

În ganglionii limfoizi s-a observat imunoreactivitate în populația de celule B. Reactivitate puternică s-a văzut în pulpa albă a splinei și în limfocitele medulare ale timusului. De asemenea, s-a observat imunoreactivitatea în limfocite izolate din vezica urinară, inimă, intestinale groase, ficat, plămâni și uter și s-a atribuit prezenței celulelor inflamatoare aflate în aceste țesuturi. Ca și în cazul anticorpului nativ, nu s-a observat reactivitatea cu celule neuroectodermale sau cu elemente ale mezenchimului (datele nu s-au prezentat).

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

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

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

1. Recoltare cu eliminare de celule stemice periferice (PSC) sau măduvă osoasă (BM);
2. Formare de imagine I2B8;
3. Terapie Y2B8 (trei niveluri de doză); și
4. Transplantare PSC sau BM autologă (dacă este necesar, pe baza numărării neutrofililor sub $500/\text{mm}^3$ timp de trei zile consecutive, sau plachete sangvine sub $20000/\text{mm}^3$ fără evidențiere de recuperare a măduvei osoase).

Nivelurile dozei de Y2B8 au fost precum urmează:

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

MD 1367 C2

14

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

Studiile privind formarea de imagine (dozimetria) s-au condus după cum urmează: fiecare pacient s-a cuprins în două studii *in vivo* asupra biodistribuției folosind I2B8. În primul studiu se administrează ca infuzie intravenoasă (i.v.) timp de 1 oră o cantitate de 2 mg I2B8 (5 mCi); o săptămână mai târziu se administrează 2B8 (adică anticorp neconjugat) prin i.v. la o rată care nu depășește 250 mg/oră urmat imediat de 2 mg de I2B8 (5 mCi) administrat prin i.v. pe parcursul unei ore. În ambele studii, imediat după infuzia I2B8, fiecare pacient se supune formării unei imagini și aceasta se repetă la momentul $t=14-18$ ore (dacă s-a indicat), $t=24$ ore și $t=96$ ore (dacă s-a indicat). S-au determinat timpii de retenție medii pentru indiu [111] marcat pentru întregul corp, de asemenea, s-au făcut astfel de determinări pentru recunoașterea organelor sau leziunilor tumorale ("regiuni de interes"). Regiunile de interes s-au comparat la concentrațiile marcatului din întregul corp; pe baza acestei comparații se poate determina o estimare a localizării și concentrației lui Y2B8 folosind protocoale standard. Dacă doza cumulativă estimată a lui Y2B8 este mai mare decât $\delta \times$ doza estimată pentru întregul corp, sau dacă doza cumulativă estimată pentru ficat depășește 1500 cGy, nu va avea loc nici un tratament cu Y2B8.

Dacă studiile de formare a imaginii sunt acceptabile, se administrează prin i.v. 0,1 sau 1.0 mg/kg greutate corporală a pacientului 2B8 la o rată de infuzie care nu depășește 250 mg/oră.

Aceasta este urmată de administrarea Y2B8 (10, 20 sau 40 mCi) la o rată de infuzie de 20 mCi/oră.

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

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

1. Prelevare PSC sau MB;
 2. Formare de imagine I2B8;
 3. Terapie Y2B8 (trei niveluri de doză) pentru patru doze sau o doză cumulativă totală de 80mCi; și
 4. Transplantare PSC sau BM autologă (pe baza deciziei medicului practicant).
- Nivelurile dozei de Y2B8 au fost după cum urmează:

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

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

Studiile privind formarea de imagine (dozimetrie) s-au condus după cum urmează: s-a determinat cu primii 2 pacienți o doză preferată asupra formării imaginii pentru anticorpul nemarcat (adică, 2B8). Primii 2 pacienți au primit 100 mg de 2B8 nemarcat în 250 cm³ în soluție salină normală pe parcursul a 4 ore, urmat de 0.5 mCi de I2B8; s-a recoltat sange pentru datele de biodistribuție la momentele $t=0$, $t=10$ min, $t=120$ min, $t=24$ ore și $t=48$ ore. Pacienții au fost scanați cu o cameră pentru imagini gama din regiuni multiple la momentele $t=2$ ore, $t=24$ ore și $t=48$ ore. După scanare, la 48 ore, pacienții au primit 250 mg 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 4.5 mCi de I2B8. Așa cum s-au descris, au urmat recoltarea de probe de sânge și scanarea.

Dacă 100 mg 2B8 produc imagini superioare, atunci următorii 2 pacienți vor primi 50 mg de 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 0,5 mCi de I2B8, urmat 48 ore mai târziu de 100 mg 2B8 și apoi cu 4,5 mCi de I2B8. Dacă 250 mg de 2B8 produc imagini superioare, atunci următorii 2 pacienți vor primi 250 mg de 2B8 așa cum s-a descris, urmat de 0.5 mCi de I2B8, urmat 48 ore mai tarziu cu 500 mg 2B8 și apoi cu 4.5 mCi de I2B8. Următorii pacienți vor fi tratați cu cele mai scăzute cantități de 2B8 care furnizează formarea optimă de imagini. Formarea optimă de imagini va fi definită prin: (1) cea mai eficientă formare de imagine cu cea mai lentă dispariție a anticorpului; (2) cea mai bună distribuție care micșorează repartizarea într-un singur organ; și (3) cea mai bună rezoluție subiectivă a leziunii (tumoare/evoluția comparată).

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

Înainte de tratamentul cu Y2B8, pentru pacienții alții decât primii 4, 2B8 se va administra așa cum s-a descris urmat de infuzie i.v. de Y2B8 după 5...10 min. Se vor recolta probe de sange pentru

MD 1367 C2

15

biodistribuție la momentele $t=0$, $t=10$ min, $t=120$ min, $t=24$ ore și $t=48$ ore. Pacienții vor primi doze respective de Y2B8 (aceeași doză administrată ca și în cazul primei doze), aproximativ în fiecare 6...8 săptămâni pentru un maxim de 4 doze sau în total doza cumulată de 80 mCi. Cel mai adesea este de preferat ca pacienții să nu primească următoarea doză de Y2B8 până când WBC-ul pacienților este mai mare decât sau egal cu 3000 și AGC este mai mare sau egal cu 100000.

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

II. PRODUCEREA DE ANTICORP HIMERIC ANTI-CD20 ("C2B8")

A. Construcția vectorului de expresie DNA a imunoglobulinei himerice anti-CD20

S-a izolat RNA de la celulele hibridomice de șoarece 2B8 [Chomczynski, P. et al., Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction" Anal. Biochem., vol. 162, 1987, p. 156-159] și s-a preparat de la aceasta cDNA. DNA-ul regiunii variabile a catenei ușoare de imunoglobulină de șoarece s-a izolat de la cDNA prin reacție de polimerizare de lanț folosind un set de primeri ai DNA-ului cu omologie la secvențele semnal ale catenei ușoare de șoarece la capătul 5' și regiunea j a catenei ușoare de șoarece la capătul 3'. Secvențele primer au fost după cum urmează:

1. V_L sens (secvența ID nr. 3)

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

ATT ATC AGC TTC 3'

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

2. V_L Antisens (Secvența ID nr. 4)

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

(Porțiunea subliniată mai sus este un sit Bsi WI)

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

Acest fragment DNA rezultat s-a clonat direct în vectorul TCAE 8 în fața domeniului constant al catenei ușoare kapa umane și s-a divizat în secvențe. Secvența DNA determinată pentru regiunea variabilă a catenei ușoare murine este menționată în fig. 4 (Secvența ID nr. 5); de asemenea, vezi fig. 3 nucleotidele 978 până la 1362. Fig. 4 asigură suplimentar secvența aminoacidică de la această regiune variabilă murină, CDR-ul și regiunile cadru. Regiunea variabilă a catenei ușoare de șoarece de la 2B8 este din familia kapa VI de șoarece. Vezi Kabat de mai sus.

Regiunea variabilă a catenei grele de șoarece s-a izolat în mod asemănător și s-a clonat în fața domeniilor constante IgG. Primerii au fost după cum urmează:

1. V_H Sens (Secvența ID nr. 6)

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

(Porțiunea subliniată este un sit Mlu I).

2. V_H Antisens (Secvența ID nr. 7)

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

(Porțiunea subliniată este un sit Nhe I)

Vezi fig. 1 și 2 pentru siturile corespunzătoare Mlu I și Nhe I din TCAE 8 și fig. 3 pentru siturile corespunzătoare în anti-CD20 din TCAE 8.

Secvența pentru această catenă grea de șoarece este prezentată în fig. 5 (Secvența ID nr. 8), vezi, de asemenea, fig. 3, nucleotidele 2401 până la 2820. De asemenea, fig. 5 dă secvența aminoacidică de la această regiune variabilă murină, CRD-ul și regiunile cadru. Regiunea variabilă a catenei grele de șoarece de la 2B8 este din familia VH 2B de șoarece. Vezi Kabat de mai sus.

B. Prepararea de anti-CD20 himeric produs de transfectoamele CHO și SP2/0

S-au crescut celule de DG44 dintr-o linie celulară ovariană de hamster chinezesc ("CHO") în mediu SSFM II fără hipoxantină și timidină [Gibco, Grand Island, NY, Form a 91-0456PK]; celulele mielomice de șoarece SP2/0 s-au crescut pe mediul Eagles modificat după Dulbecco ("DMEM") [Irvine Scientific, Santa Ana, Ca., Cat. nr.9024], având adăugat 5% ser fetal bovin și 20 ml/L glutamină. S-au supus electroporării 4 milioane celule cu plasmidă DNA fie din 25 μg CHO fie din 50 μg SP2/0 restricționat cu Not I folosind un sistem de electroporare BTX 600 (BTX, San Diego, CA) în cuve de 0.4 ml jetabile. Condițiile au fost fie 210 V pentru CHO, fie 180 V pentru SP2/0, 400 μF, 13 ohmi. Fiecare electroporat s-a depus în 6 plăci cu 96 de godeuri (cca 7000 celule pe

MD 1367 C2

16

godeu). Plăcile au fost alimentate cu mediu conținând G418 [GENETICIN, Gibco, cat. nr. 860-1811], la 400 μg/ml de compus activ pentru CHO (mediul a inclus suplimentar 50 μM hipoxantină și 8 μM timidină) sau 800 μg/ml pentru SP2/0, electroporările s-au efectuat în următoarele două zile și apoi 2 sau 3 zile până la formarea coloniilor. Supernatantele de la colonii s-au examinat pentru prezența de imunoglobulină himerică pe calea unei ELISA specifică pentru anticorp uman. Coloniile care produc cea mai ridicată cantitate de imunoglobulină au fost extinse și depuse în plăci cu 96 godeuri, conținând mediu plus metotrexat (25 nM pentru SP2/0 și 5 nM pentru CHO), fiind alimentate cu mediu fiecare 2 sau 3 zile. Supernatantele au fost cercetate ca mai sus și de asemenea au fost examinate coloniile care produc cea mai ridicată cantitate de imunoglobulină. Din supernatant s-a purificat anticorpurul himeric anti-CD20 folosind cromatografia de afinitate a proteinei A.

Anti-CD20 himeric purificat s-a analizat prin electroforeză în geluri poliacrilamidice și s-a estimat a fi mai pur decât cca 95%. Afinitatea și specificitatea anticorpurului himeric s-a determinat pe baza 2B8. Anticorpurul himeric anti-CD20 s-a testat în încercări de legare directă și competitivă, când comparându-se cu anticorpurul anti-CD20 monoclonal murin 2B8, a manifestat afinitate și specificitate relativă pentru un număr de linii celulare B pozitive CD20 (datele nu s-au prezentat). Constanta ("Kap") afinității aparente a anticorpurului himeric s-a determinat prin legare directă de anti-CD20 himeric radiomarcant I^{125} și s-a comparat cu 2B8 radiomarcant prin graficul Scatchard; Kap-ul estimat pentru anti-CD20 himeric obținut din CHO a fost 5.2×10^{-9} M și pentru anticorpurul obținut din SP2/0 a fost 7.4×10^{-9} M. Kap-ul estimat pentru 2B8 a fost 3.5×10^{-9} M. S-a utilizat competiția directă la radioimunotest pentru a confirma atât specificitatea cât și menținerea de imunoreactivitate a anticorpurului himeric prin compararea capacității lui de a concura eficient cu 2B8. Au fost necesare cantități suficiente echivalente de anticorpi himerici anti-CD20 și 2B8 pentru a produce 50% inhibare a legării cu antigenii CD20 pe celule B (date neprezentate), adică, s-a observat o pierdere minimă de activitate de inhibare a anticorpurilor anti-CD20, probabil, datorită himerizării.

Rezultatele de la Exemplul IIB indică, printre altele, că anticorpii himerici anti-CD20 s-au obținut din transfectoamele CHO și SP2/0 folosind vectori TCAE 8. Acești anticorpi himerici au avut în principal aceeași specificitate și capacitate de legare ca anticorpurul anti-CD20 monoclonal murin 2B8.

C. Determinarea activității imunologice a anticorpurilor himerici anti-CD20

i. Analiza Clq uman

Anticorpii himerici anti-CD20 produși atât prin linia celulară CHO cât și SP2/0, s-au evaluat pentru legarea Clq uman într-un test de curent citometric folosind Clq marcat cu fluoresceină (Clq s-a obținut de la Quidel, Mira Mesa, CA, Prod. nr. A400 și marcajul FITC de la Sigma, St. Louis MO, Prod. nr. F-7250; FITC) [Selected Methods in Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed. W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, p.292]. Marcarea lui Clq s-a realizat conform protocolului cunoscut [Selected Methods In Cellular Immunology, Michell & Shiigi, Ed. (W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, p. 292)]. Rezultatele analitice s-au derivat folosind un citometru de flux Decton Dickinson FACScanTM (fluoresceina s-a măsurat pe un domeniu de 515...545 nm). S-au incubat cantități echivalente de anticorp himeric anti-CD20, IgG1 uman, proteină K mielomică (Binding Site, San Diego, CA, Prod. Nr. BP078) și 2B8 cu un număr echivalent de celule SB, CD20 pozitive, urmat de o etapă de spălare cu tampon FACS (2% BSA în PBS, pH 7.4, 0.02% azotură de sodiu) pentru îndepărtarea anticorpurului neatașat, urmată de incubare cu Clq marcat FITC. După o incubare de 30...60 min, celulele s-au spălat din nou. Cele trei condiții, inclusiv Clq marcat FITC drept martor, s-au analizat pe FACScanTM urmând instrucțiunile fabricantului. Rezultatele sunt prezentate în fig. 6.

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

ii. Lize celulare dependente de complement

Anticorpii himerici anti-CD20 s-au analizat pentru capacitatea lor de a supune lizei linii celulare de limfom în prezența serului uman (sursa de complement). Celulele SB, CD20 pozitive, s-au marcat cu ^{51}Cr prin amestecarea a 100 μCi de ^{51}Cr cu 1×10^6 celule SB timp de 1 oră la 37°C; celulele SB marcate au fost incubate apoi în prezența unor cantități echivalente de complement uman și cantități echivalente (0...50 μg/ml) de anticorpi himerici anti-CD20 sau 2B8 timp de 4 ore la 37°C [Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on

MD 1367 C2

17

⁵¹Cr-labeled allogeneic target cells *in vitro*". Immunology 14: 181-189 (1968)]. Rezultatele sunt prezentate în fig. 7.

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

iii. Examinarea citotoxicității celulare efector în funcție de anticorp

Pentru acest studiu s-au folosit celule pozitive CD20 (SB) și celule negative CD20 (celule T, linie leucemică HSB [Adams, Richard, "Formal Discussion", Can.Res. 27: 2479-2482 (1967)]; depozit ATCC nr. ATCC CL 120.1); ambele s-au marcat cu ⁵¹Cr. Analizele au urmat protocolul cunoscut [Brunner, K.T. et al., "Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ⁵¹Cr-labeled allogeneic target cells *in vitro*". Immunology 14: 181-189 (1968)]; s-a observat liză celulară substanțială a celulelor țintă SB pozitive CD20 (marcate cu ⁵¹Cr) mediată de anticorpii himerici anti-CD20 la sfârșitul incubării timp de 4 ore la 37°C. Acest efect s-a observat pentru ambii anticorpi obținuți din CHO și SP2/0 (celulele-efectoare au fost limfocitele periferice umane; raportul celule-efectoare : țintă a fost 100:1). Liză eficientă a celulelor țintă s-a obținut la 3.9 μg/ml. Invers, în aceleași condiții, anticorpii anti-CD20 monoclonali murini 2B8 a avut un efect statistic nesemnificativ și celulele CD20 negative HSB nu au fost supuse lizei. Rezultatele sunt prezentate în fig. 8.

Rezultatele exemplului II indică că anticorpii himerici anti-CD20 din exemplul I au fost imunologic activi.

III. REDUCEREA *IN VIVO* A CELULELOR B FOLOSIND ANTI-CD20

A. Studiul primatelor non-umane

S-au efectuat 3 studii separate ale primatelor neumane. Pentru conveniență, acestea au fost numite aici ca "Anti-CD20 himeric : CHO și SP2/0"; "Anti-CD20 himeric : CHO" și "Dozaj ridicat de anti-CD20 himeric". Condițiile au fost precum urmează:

Anti-CD20 himeric : CHO și SP2/0

Șase maimuțe *cynomolgus* cu greutatea cuprinsă între 4.5 și 7 kg [White Sands Research Center, Alamogordo, NM] s-au divizat în trei loturi a câte 2 maimuțe. Ambele animale din fiecare lot au primit aceeași doză de anticorp himeric anti-CD20 imunologic activ. Un animal din fiecare lot a primit anticorp purificat produs prin transfectom CHO; altul a primit anticorpii produs prin transfectom SP2/0. Cele trei loturi au primit doze de anticorp constituind 0.1 mg/kg, 0.4 mg/kg și 1.6 mg/kg în fiecare zi timp de 4 zile consecutive. Anticorpii himerici anti-CD20 imunologic activ amestecat cu soluție fiziologică sterilă s-a administrat prin infuzie intravenoasă. Înainte de fiecare infuzie au fost prelevate probe de sânge. Probe suplimentare de sânge s-au prelevat începând de la 24 ore după ultima injecție (T=0) și apoi în zilele 1, 3, 7, 14 și 28. Apoi au fost prelevate probe de sânge la intervale săptămânale până la finalizarea studiului la 90 de zile.

S-au centrifugat aproximativ 5 ml din sângele integral de la fiecare animal la 2000 rot./min timp de 5 min. S-a recuperat plasma pentru examenul nivelurilor de anticorp himeric anti-CD20 solubil. Precipitatul (conținând leucocite din sânge periferic și eritrocite sangvine) s-au resuspendat în ser fetal de mazăre pentru analiza anticorpului marcat fluorescent ["Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population"].

Anti-CD20 himeric : CHO

Șase maimuțe *cynomolgus* cu greutatea cuprinsă între 4...6 kg (White Sands) s-au divizat în 3 loturi a câte 2 maimuțe. Toate animalele s-au injectat cu anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi produși de transfectomul CHO (în soluție fiziologică sterilă). Aceste trei loturi s-au divizat după cum urmează: subplotul I a primit injecții intravenoase zilnice de 0.01 mg/kg anticorp cu interval de 4 zile; subplotul II a primit zilnic injecții intravenoase de 0.4 mg/kg anticorp cu interval de 4 zile; subplotul III - injecție intravenoasă unică de 6.4 mg/kg anticorp. De la toate trei subploturi s-au prelevat probe de sânge înainte de începerea tratamentului; de asemenea, s-au prelevat probe suplimentare de sânge la T=0, 1, 3, 7, 14 și 28 zile după ultima injecție. Aceste probe s-au prelucrat pentru analiza anticorpului marcat fluorescent ["Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population"]. Pe lângă cuantificarea celulelor B din sângele periferic, s-au prelevat biopsii din ganglionii limfatici la 7, 14 și 28 zile după ultima injecție și s-a colorat o piesă dintr-o singură celulă pentru cuantificarea populațiilor de limfocite prin citometrie în flux.

Dozaj ridicat de anti-CD20 himeric

Două maimuțe *cynomolgus* (White Sands) s-au infuzat cu 16.8 mg/kg anticorpi himerici anti-CD20 imunologic activi produși din transfectom CHO (în soluție fiziologică sterilă) săptămânal timp de 4 săptămâni consecutive. La încheierea tratamentului ambele animale au fost anesteziate pentru înlăturarea măduvei osoase; de asemenea, s-au prelevat biopsii din ganglionii limfatici.

MD 1367 C2

18

Ambele serii de țesuturi s-au colorat pentru determinarea prezenței de limfocite B, folosind Leu 16 prin citometrie în flux conform protocolului cunoscut [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;].

Marcarea fluorescentă a anticorpilor populației celulare limfoide

După îndepărtarea plasmei leucocitele s-au spălat de 2 ori cu soluție salină echilibrată Hanks ("HBSS") și s-au resuspendat într-un volum echivalent de plasmă de ser fetal bovin (inactivată termic la 56°C timp de 30 min). S-a distribuit un volum de 0.1 ml piesă celulară la 6 eprubete conice de centrifugă de 15 ml.

În 3 eprubete s-au adăugat anticorpi monoclonali marcați cu fluoresceină pentru markerii limfocitari umani de suprafață CD20 (AMAC, Westbrook, ME), CD20 (Becton Dickinson) și IgM uman (Binding Site, San Diego, CA) pentru identificarea populațiilor de limfocite T și B. Toți reactivii au fost testați anterior ca pozitivitate la antigenii corespunzători limfocitelor de maimuță. Legarea anticorpului himeric anti-CD20 la CD20 de la suprafața celulei B de maimuță s-a observat în eprubeta 4 folosind anticorp policlonal de capră anti-IgG uman cuplat cu ficoeritrină (AMAC). Acest reactiv s-a preadsorbit pe o coloană de sefăroză Ig maimuță pentru a preveni reactivitatea încrucișată la Ig maimuță, permițând astfel detectarea specifică și cuantificarea anticorpului himeric anti-CD20 legat la celule. A 5-a eprubetă a inclus reactivi anti-IgM și anti-IgG umani pentru colorație dublă a populației de celule B. A 6-a probă nu a inclus nici un reactiv pentru a se putea determina autofluorescența. Celulele s-au incubat cu anticorpi fluorescenți timp de 30 min, s-au spălat și s-au fixat cu 0.5 ml soluție-tampon de fixare (NaCl 0.15M, paraformaldehidă 1%, pH 7.4) și s-au analizat pe un instrument Becton Dickinson FACScan™. Populațiile limfocitare s-au identificat inițial prin sens direct: contra unghiului drept al luminii difuze într-un raster punctiform cu leucocite nemarcate. Apoi, s-a izolat populația totală de limfocite prin eliminarea tuturor celorlalte populații. Măsurările ulterioare de fluorescență au reflectat doar evenimentele specifice limfocitelor selectate.

Distrugerea limfocitelor B din sângele periferic.

Nu s-a putut stabili nici o diferență observabilă între eficiența anticorpilor produși din CHO și SP2/0 în distrugerea *in vivo* a celulelor B, deși o ușoară creștere în recuperarea celulelor B a început după 7 zile pentru maimuțele injectate cu anticorpi himerici anti-CD20 derivați de la transfectom CHO la nivel de dozare echivalent cu 1.6 mg/kg și 6.4 mg/kg, observându-se pentru maimuțele injectate cu anticorp produs din SP2/0 la nivelul de dozare de 0.4 mg/kg. Fig. 9A, B și C prezintă rezultatele obținute în studiul anti-CD20 himeric : CHO și SP2/0, fig. 9A se referă la nivelul dozei de 0.4 mg/kg; fig. 9B - nivelul dozei de 1.6 mg/kg și fig. 9C - 6.4 mg/kg.

Așa cum este evident din fig. 9, a existat o descreștere dramatică în nivelul celulelor B periferice (>95%) după tratamentul terapeutic față de toate domeniile de doză testată. Aceste niveluri s-au menținut până la 7 zile postinfuzie; după această perioadă, celulele B au început să se recupereze, și momentul inițierii recuperării a fost independent de nivelurile dozei.

În studiul anti-CD20 himeric : CHO s-a utilizat o concentrație de dozare a anticorpului de 10 ori mai scăzută (0.01 mg/kg) o perioadă de timp de 4 injecții zilnice (total 0.04 mg/kg). Fig. 10 prezintă rezultatele acestui studiu. Acest dozaj a distrus populația de celule sangvine B periferice până la aproximativ 50% din nivelurile normale estimate fie cu antigen de suprafață IgM, fie cu anticorp Leu 16. De asemenea, rezultatele indică saturația antigenului CD20 pe populația limfocitară B care nu s-a obținut cu anticorpul himeric anti-CD20 imunologic activ la această perioadă de timp pentru primare non-umane. Limfocitele B acoperite cu anticorpi s-au detectat în primele 3 zile ale tratamentului terapeutic. Totuși, de la a 7-ea zi nu s-au mai detectat celule acoperite cu anticorp.

Tabelul 1 rezumă rezultatele acțiunii anticorpului himeric anti-CD20 imunologic activ în doză unică și doze multiple asupra populațiilor sangvine periferice. Doză unică a fost 6.4 mg/kg; doză multiplă a fost 0.4 mg/kg timp de 4 zile consecutive (aceste rezultate au fost derivate de la maimuțele descrise mai sus).

MD 1367 C2

19

Tabelul 1

Studiul C2B8 din populația sangvină periferică de la primate

Maimuță	Doză	Zi	CD20	Anti-IgG uman
A	0.4 mg/kg (4 doze)	sange prelevat anterior	81.5	–
		0	86.5	0.2
		7	85.5	0.0
		21	93.3	–
		28	85.5	–
B	0.4 mg/kg (4 doze)	sange prelevat anterior	81.7	–
		0	94.6	0.1
		7	92.2	0.1
		21	84.9	–
		28	84.1	–
C	6.4 mg/kg (1 doză)	sange prelevat anterior	77.7	0.0
		7	85.7	0.1
		21	86.7	–
		28	76.7	–
D	6.4 mg/kg (1 doză)	sange prelevat anterior	85.7	0.1
		7	94.7	0.1
		21	85.2	–
		28	85.9	–

Tabelul 1 (continuare)

Maimuță	Anti-IgG uman, + Anti-IgM uman*	Leu-16	Distrugerea celulei B, %
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

* Colorarea dublă a populației care indică gradul de acoperire a celulei B cu anti-CD20 himerici.

Datele rezumate în tabelul 1 arată că distrugerea celulelor B din sângele periferic în condițiile excesului de anticorpi se produce rapid și eficient indiferent de nivelurile de dozare unice sau

MD 1367 C2

20

multiple. Suplimentar, s-a observat distrugere la cel puțin 7 zile după ultima injecție, cu recuperarea parțială de celule B observată la 21 zile.

Tabelul 2 rezumă efectul anticorpilor himerici anti-CD20 imunologic activi asupra populațiilor celulare ale ganglionilor limfatici folosind regimul de tratament din tabelul 1 (4 doze zilnice de 0.4 mg/kg; o doză de 6.4 mg/kg); de asemenea, se dau valori comparate pentru ganglionii limfatici normali (maimuța martor, axilar și inghinal) și măduva osoasă normală (2 maimuțe).

Tabelul 2

Populația celulară a ganglionilor limfatici				
Maimuță	Doză	Zi	CD20	Anti-IgM uman
A	0.4 mg/kg (4 doze)	7	66.9	–
		14	76.9	19.6
		28	61.6	19.7
B	0.4 mg/kg (4 doze)	7	59.4	–
		14	83.2	9.9
		28	84.1	15.7
C	6.4 mg/kg (1 doză)	7	75.5	–
		14	74.1	17.9
		28	66.9	23.1
D	6.4 mg/kg (1 doză)	7	83.8	–
		14	74.1	17.9
		28	84.1	12.8

Tabelul 2 (continuare)

Maimuță	Anti-IgG uman + Anti-IgM uman	Leu-16	Distrugerea limfocitelor B, %
A	7.4	40.1	1
	0.8	22.6	44
	–	26.0	36
B	29.9	52.2	0
	0.7	14.5	64
	–	14.6	64
C	22.3	35.2	13
	1.1	23.9	41
	–	21.4	47
D	12.5	19.7	51
	0.2	8.7	78
	–	12.9	68

Tabelul

2 (continuare)

	CD2	Anti-IgG uman+ Anti-IgM uman	Anti-IgM uman	Leu -16	Distrugerea limfocitelor B, %
Ganglioni limfatici normali					
Martor 1					
Axilar	55.4	25.0	–	41.4	datele lipsesc
Inghinal	52.1	31.2	–	39.5	
Măduvă osoasă normală					
Martor 2	65.3	19.0	–	11.4	
Martor 3	29.8	28.0	–	16.6	

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

MD 1367 C2

21

Pe baza acestor date, studiul, la care s-a făcut referire sus ca doză unică de anti-CD20 himeric, s-a efectuat în principal spre determinarea farmacologică / toxicologică. Adică, acest studiu s-a orientat spre evaluarea oricărei toxicități asociate cu administrarea anticorpului himeric, precum și a eficienței distrugerii celulelor B din sângele periferic, ganglionii limfatici și măduva osoasă. Suplimentar, deoarece datele din tabelul II arată că pentru acest studiu majoritatea celulelor B din ganglionii limfa-

tici au fost distruse între 7 și 14 zile de tratament, un regim de dozare săptămânal poate avea rezultate mai eficiente. Tabelul III prezintă rezultatele studiului dozei ridicate de anti-CD20 himeric.

Tabelul 3

Populația celulară a ganglionilor limfatici și măduvei osoase

Populații limfocitare (%)

Maimuță	CD2	CD20 ^a	IgM+anti-C2B8 ^b	C2B8 ^c	zile ^d
Ganglionii limfatici inghinali					
E	90.0	5.3	4.8	6.5	22
F	91.0	6.3	5.6	6.3	22
G	89.0	5.0	3.7	5.8	36
H	85.4	12.3	1.7	1.8	36
Măduva osoasă					
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 Indică populația colorată cu Leu 16.

^b Indică populația colorată dublu, pozitivă pentru celulele IgM de suprafață și celulele acoperite cu anticorpi himerici.

^c Indică colorația completă a populației pentru anticorp himeric, inclusiv colorația dublă a celulelor IgM pozitive de suprafață și colorația unică (celule IgM negative de suprafață).

^d Numărul zilelor după injectarea dozei finale de 16.8 mg/kg.

Ambele animale evaluate la 22 zile după încetarea tratamentului au conținut mai mic de 5% de celule B comparativ cu 40% conținute în ganglionii limfatici din martor (vezi tabelul 2). Asemănător, în măduva osoasă a animalelor tratate cu anticorp himeric anti-CD20, nivelurile celulelor CD20 pozitive au fost mai mici decât 3% comparativ cu 11...15% la animalele normale (vezi tabelul 2). Din animalele evaluate la 36 zile după încetarea tratamentului, unul din animale (H) a avut aproximativ 12% celule B în ganglionii limfatici și 4.4% celule B în măduva osoasă, în timp ce altul (G) a avut aproximativ 5% celule B în ganglionul limfatic și 0.8% în măduva osoasă. Aceste date confirmă o distrugere semnificativă a celulelor B.

Rezultatele din exemplul III.A. confirmă că dozele scăzute de anti-CD20 himeric imunologic activ conduc pe termen lung la distrugerea celulelor B din sângele periferic la primate. De asemenea, datele arată că distrugerea semnificativă a populațiilor de celule B s-a atins în ganglionii limfatici periferici și măduva osoasă când s-au administrat repetat doze mari de anticorp. Continuarea urmăririi testului pe animale a arătat că chiar cu o asemenea distrugere severă de limfocite B periferice în timpul primei săptămâni de tratament nu au apărut alte efecte adverse.

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

B. Analiza clinică a C2B8

i. Test clinic, faza I/II, al C2B8: studiul terapiei cu doză unică

S-au tratat cu C2B8 într-un test clinic, faza I/II, 15 pacienți având documentația histologică de recădere în limfom a celulei B. Fiecare pacient a primit 1 singură doză de C2B8 într-un studiu cu doză crescătoare, au fost trei pacienți/doză; 10 mg/m²; 50 mg/m²; 100 mg/m²; 250 mg/m² și 500 mg/m². Tratamentul a fost prin infuzie i. v. printr-un filtru în linie de 0.22 μ cu C2B8 diluat într-un volum final de 250 cm³ sau o concentrație maximă de 1 mg/ml în soluție fiziologică standard. Rata

MD 1367 C2

22

inițială a fost $50 \text{ cm}^3/\text{h}$ în prima oră; dacă nu s-a observat nici o toxicitate doza ratei s-a mărit până la un maxim de $200 \text{ cm}^3/\text{h}$.

Toxicitatea (așa cum s-a indicat de către clinician) a fost de la “nici una”, la “febră” și la “moderat” (2 pacienți), la “severă” (1 pacient); toți pacienții au primit tratamentul terapeutic complet. S-au analizat limfocitele sangvine periferice pentru a determina impactul C2B8 asupra celulelor T și celulelor B. Consecutiv, pentru toți pacienții limfocitele B din sângele periferic au fost distruse după infuzie cu C2B8 și asemenea distrugere s-a menținut în exces timp de 2 săptămâni.

Unul dintre pacienți (doza de $100 \text{ mg}/\text{m}^2$ de C2B8) a evidențiat un răspuns parțial la tratamentul cu C2B8 (reducere mai mare de 50% în suma produselor diametrelor perpendiculare ale tuturor indicatorilor măsurabili ai leziunilor după mai mult de 4 săptămâni, timp în care nu au mai apărut leziuni noi și nici nu au mai existat leziuni mai mari); la cel puțin un pacient (care a primit $500 \text{ mg}/\text{m}^2$) s-a evidențiat un răspuns minor la tratamentul cu C2B8 (reducere mai mică decât 50%, dar cel puțin 25% în suma produselor celor două diametre perpendiculare celor mai lungi ale tuturor indicatorilor măsurabili ai leziunii). Pentru eficiența sugerată rezultatele PBL-urilor sunt prezentate în fig. 14; datele pentru pacientul care evidențiază un PR sunt prezentate în fig. 14A; pentru pacientul care evidențiază un MR, datele sunt prezentate în fig. 14B; în fig. 14, sunt aplicabile următoarele:  =limfocite;  =CD3+celule (celule T);  =CD20+celule;  = CD19+celule;  =kapa;  =lambda și  =C2B8.

Evident că markerii celulei B CD20, CD19, kapa și lambda s-au distrus după o perioadă depășind 2 săptămâni; în timp ce a existat o reducere ușoară inițială în numărul celulelor T, acestea au revenit la un nivel aproape inițial într-un timp-cadru relativ rapid.

ii. Test clinic, faza I/II, al C2B8: studiul terapiei cu doză multiplă

Pacienți având limfom al celulei B confirmat histologic cu boala în progres vizibil, au fost aleși pentru acest studiu care este împărțit în două părți: în faza I, constând dintr-o doză crescătoare pentru caracterizarea toxicității dozelor limită și determinarea nivelului dozei active tolerate biologic, loturi de câte 3 pacienți au primit săptămânal infuzii i.v. de C2B8 pentru un total de 4 infuzii separate. Doza cumulată la fiecare dintre cele 3 niveluri a fost după cum urmează: $500 \text{ mg}/\text{m}^2$ ($125 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infuzie}$); $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$ ($250 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infuzie}$); $1500 \text{ mg}/\text{m}^2$ ($375 \text{ mg}/\text{m}^2/\text{infuzie}$). Se definește o doză activă tolerată biologic și se va determina ca cea mai scăzută doză având atât toxicitate tolerabilă cât și activitate adecvată. În faza II, pacienții suplimentari vor primi doza activă tolerată biologic cu subliniere asupra determinării activității pentru cele 4 doze de C2B8.

IV. TERAPIE COMBINATĂ: C2B8 și Y2B8

S-a investigat o abordare terapeutică combinată folosind C2B8 și Y2B8 într-un model șoarece xenografic (șoareci nu/nu, femele de aproximativ 10 săptămâni ca vârstă), utilizând o tumoră limfoblastoidă de celulă B (celule tumorale Ramos). Pentru scopuri comparative, s-au tratat suplimentar, de asemenea șoareci, cu C2B8 și Y2B8.

Celulele tumorale Ramos (ATCC, CRL 1596) s-au menținut în cultură, folosind PRMI-1640 suplimentar cu 10% ser fetal de vițel și glutamină la 37°C și 5% CO_2 . S-au inițiat tumori la 9 femele de șoareci lipsiți de păr, în vârstă de aproximativ 7...10 săptămâni, prin injectare subcutanată de 1.7×10^5 celule Ramos într-un volum de 0.10 ml (HBSS) folosind o seringă de 1 cm^3 , prevăzută cu ac 25 g. Toate animalele s-au manipulat într-o hotă cu flux laminar și toate cuștile, așternuturile, alimentele și apa s-au autoclavat. Celulele tumorale s-au recuperat prin excizarea tumorilor și trecerea acestora printr-o sită de 40 cel. Celulele s-au spălat de 2 ori cu 1xHBSS (50 ml) prin centrifugare (1300 rpm), s-au resuspendat în 1xHBSS de la 10×10^6 celule/ml și s-au înghețat la -70°C până la folosire.

Pentru condițiile experimentale s-au dezghețat celule din câteva loturi înghețate, s-au prelevat prin centrifugare (1300 rot./min) și s-au spălat de 2 ori cu 1xHBSS. Apoi, celulele s-au resuspendat până la aproximativ 2.0×10^6 celule/ml. S-au injectat aproximativ 9...12 șoareci cu 0.10 ml suspensie celulară (s.c.) folosind o seringă de 1 cm^3 prevăzută cu un ac de 25 g; injecțiile s-au făcut pe partea stângă a animalului aproximativ pe porțiunea mediană. Tumorile s-au dezvoltat în aproximativ 2 săptămâni. S-au excizat tumorile și s-au prelucrat cum s-a descris mai sus. Șoarecii luați în studiu s-au injectat cum s-a descris mai sus cu 1.67×10^6 celule în 0.10 ml HBSS.

Pe baza experimentelor preliminare de dozare, s-a determinat că s-ar putea utiliza pentru studiu 200 mg de C2B8 și 100 μCi Y2B8. S-au injectat 90 femele de șoareci nu/nu (în vârstă de aproape 10 săptămâni) cu celule tumorale. După aproape 10 zile, s-au desemnat 24 șoareci pentru 4 loturi de studiu (6 șoareci/lot), urmând în acest timp menținerea unei distribuții a mărimii tumorilor comparabilă în fiecare lot (mărimia medie a tumorii, exprimată ca produs dintre lungimea și

MD 1367 C2

23

lăţimea tumorii a fost aproximativ de 80 mm²). Următoarele loturi s-au tratat cum s-a indicat pe calea injecţiilor în vena cubitală, folosind o seringă Hamilton de 100 µL prevăzută cu un ac de 25 g:

- A. Soluţie fiziologică standard,
- B. Y2B8 (100 µCi),
- C. C2B8 (200 µg) şi
- D. Y2B8 (100 µCi) + C2B8 (200 µg).

Loturile testate cu C2B8 au primit a doua injecţie de C2B8 (200 µg/şoarece) 7 zile după injecţia iniţială. Măsurările tumorii s-au făcut la fiecare 2...3 zile folosind un şubler.

Prepararea materialelor pentru tratament s-au făcut conform următoarelor protocoale:

A. Preparare de Y2B8

S-a transferat clorură de ytriu [90] la o eprubetă de propilenă şi s-a ajustat pH-ul la 4.1-4.4 folosind acetat de sodiu 2M lipsit de metal. S-a adăugat 2B8-DTPA (0.3 mg în soluţie fiziologică standard; vezi mai sus prepararea 2B8-MX-DTPA) şi s-a amestecat cu grijă prin turbionare. După 15 min de incubare, reacţia s-a oprit prin adăugarea a 0.05x20 mM volum EDTA şi 0.05x2M volum acetat de sodiu. Radioactivitatea concentratului s-a determinat prin diluarea a 5.0 µL de amestec de reacţie în 2.5ml 1xPBS care conţine 75 mg/ml HSA şi 1 mM DTPA ("formulare-tampon"); număratoarea s-a realizat prin adăugarea de 10.0 µL la 20 ml de amestec de scintilaţie EcolumeTM. Amestecul reactiv rămas s-a adăugat la 3.0 ml formulare-tampon, s-a filtrat steril şi s-a depozitat la 2...8°C până la utilizare. S-a calculat activitatea specifică (14 mCi/mg la momentul injectării), folosind concentraţia de radioactivitate şi concentraţia proteinei calculate pe baza cantităţii anticorpului adăugat la amestecul de reacţie. Radioactivitatea asociată proteinei s-a determinat folosind cromatografia instantanee în strat subţire. Radioactivitatea a fost de 95%. S-a diluat Y2B8 în formulare-tampon imediat înaintea folosirii şi s-a filtrat steril (concentraţia radioactivităţii finale a fost 1.0 mCi/ml).

B. Preparare de C2B8

C2B8 s-a preparat cum s-a descris mai sus; C2B8 s-a asigurat ca reactiv steril în soluţie fiziologică normală la 5.0 mg/ml. Înainte de injectare C2B8 s-a diluat în soluţie fiziologică normală până la 2.0 mg/ml şi s-a filtrat steril.

C. Rezultatele

După tratament mărimea tumorii s-a exprimat ca un produs al lungimii şi lăţimii, şi măsurările s-au făcut în zilele indicate în fig. 11 (Y2B8 în comparaţie cu soluţia fiziologică); fig. 12 (C2B8 în comparaţie cu soluţia fiziologică) şi fig. 13 (Y2B8 + C2B8 în comparaţie cu soluţia fiziologică). De asemenea, s-a determinat eroarea standard.

Aşa cum s-a indicat în fig. 13, combinaţia Y2B8 şi C2B8 prezintă efecte tumoricide comparabile efectelor manifestate fie de către Y2B8, fie de C2B8.

V. Strategii de terapie alternativă

Strategiile terapeutice alternative recunoscute în optica exemplelor anterioare sunt evidente. O asemenea strategie constă în utilizarea unei doze terapeutice de C2B8 urmată în cea 1 săptămână de o combinaţie fie de 2B8, fie de 2B8 radiomarcant (de exemplu Y2B8); sau 2B8, C2B8 şi, de exemplu, Y2B8; sau C2B8 şi, de exemplu, Y2B8. O strategie suplimentară este utilizarea de C2B8 radiomarcant. O asemenea strategie permite utilizarea avantajelor porţiunii active imunologic a C2B8 plus acele avantaje asociate cu un marcaj radioactiv. Marcajele radioactive preferate includ: ytriu-90 care dă o viaţă de înjumătăţire a C2B8 în circulaţie mai mare faţă de anticorpul murin 2B8. Datorită capacităţii C2B8 de a distruge celulele B şi avantajelor de a fi derivat de la folosirea unui marcaj radioactiv, o strategie alternativă preferată este de a trata pacientul cu C2B8 (fie cu o doză unică, fie cu doze multiple), astfel încât majoritatea, dacă nu toate celulele periferice B să fie distruse. Aceasta ar fi apoi urmată de utilizarea 2B8 radiomarcant, datorită distrugerii celulelor periferice B, 2B8 radiomarcant menţine o şansă crescută de ţintire a celulelor tumorale. Este preferată utilizarea lui 2B8 marcat cu iod [¹³¹I] dat fiind tipurile rezultatelor raportate în literatura de acest marcaj (vezi [Kaminski, M.G. et al., "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with (¹³¹I) anti-B1 (Anti-CD20) Antibody" NEJM 329/7 (1993) (iodine-131 labeled anti-CD20 antibody B1; hereinafter "Kaminski")]).

O preferinţă alternativă implică utilizarea unui 2B8 radiomarcant (sau C2B8) iniţial într-un efort de creştere a permeabilităţii unei tumori urmat de tratamente unice sau multiple cu C2B8; intenţia acestei strategii este creşterea şanselor lui C2B8 de a ajunge atât în exteriorul, cât şi în interiorul masei tumorale. O strategie ulterioară implică utilizarea agenţilor chemoterapeutici în combinaţie cu C2B8. Aceste strategii includ aşa-numitele tratamente "înşelătoare", adică, tratament cu agent chemoterapeutic urmat de tratamentul cu C2B8, urmat de o repetiţie a acestui protocol.

MD 1367 C2

24

Alternativ, este viabil tratamentul inițial cu o doză unică sau doze multiple C2B8, după care urmează tratamentul chemoterapeutic. Agenți chemoterapeutici preferați, includ, dar nu se limitează la, ciclofosfamidă; doxorubicină; vincristină și prednison [Armitage, J.O. et al., Cancer, vol. 50, 1982, 1695].

Strategiile terapeutice alternative descrise mai sus nu au intenția să fie limitate, ci mai degrabă sunt prezentate ca fiind reprezentative.

LISTA SECVENȚELOR

(1) INFORMAȚII GENERALE

(i) SOLICITANT: Darrell Anderson, Nabil Hanna, John Leonard, Roland Newman and Mitchel Reff and William H. Rastetter

(ii) TITLUL INVENȚIEI: Metode de tratament al limfomului celulelor B, anticorpi anti-CD20, hibridom.

(iii) NUMĂRUL SECVENȚELOR: 8

(iv) ADRESA PENTRU CORESPONDENȚĂ:

(v) (A) ADRESANT: IDEC Pharmaceutical Corporation

(vi) (B) STRADA: 11011 Torreyana Road

(C) ORAȘ: San Diego

(D)

STATUL: California United states

(E) ȚARA: SUA

(F) ZIP: 92121

(vii) FORMA CITIBILĂ LA CALCULATOR:

(A) TIP SUPORT: 3.5 inch, 1.44 Mb (dischetă)

(B) CALCULATOR: Macintosh

(C) SISTEM DE OPERARE: MS.DOS

(D) Software: Microsoft Word

(viii) INFORMAȚII DESPRE MANDATAR:

(A) NUMELE: BURGOON, RICHARD P. JR

(B) NUMĂR DE ÎNREGISTRARE: 34,787

(ix) INFORMAȚII PENTRU TELECOMUNICAȚII:

(A) TELEFON: (619) 550-8500

(B) TELEFAX: (619) 550-8750

(2) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 1

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 8540 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: circulară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTISENS: nu

(v) DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr.1

MD 1367 C2

25

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CGGAGTTAGG GGCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGAAT	180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCCT	360
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC TTACGGTAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG	480
ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAAATG GGACTTTCCA TTGACGTCAA	540
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCCA TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA	600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGCCCACTAC	660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC	720
ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA	780
TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG	840
GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA	900
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC	960
CATCACAGAT CTCTACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG	1020
CTCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA	1080
TCTGTCTTCA TCTTCCCCCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG	1140
TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT GGATAACGCC	1200
CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC	1260

MD 1367 C2

26

AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC	1320
TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG	1380
TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTTCGT GACAACATGC	1440
GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT	1500
GTTTGCCCCCT CCCCCGTGCC TTCTTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCTTTTC	1560
TAATAAAATG AGGAAATGTC ATCGCATTTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT	1620
GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT	1680
GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCATTC	1740
ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT	1800
TTCTTACTTG GCACTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT	1860
GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCAGG GGGATTTCCT AGTCTCCACC	1920
CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC	1980
GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA	2040
TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC	2100
ATGGGTGGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CGCTAGCACC	2160
AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG	2220
GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTIONC CCCGAACCGG TGACGGTGTG GTGGAATCA	2280
GGCGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCTC AGGACTCTAC	2340
TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC	2400
AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT	2460
GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTGAGTC	2520
TTCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCAAC	2580
TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC	2640
GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC	2700
CGTGTGGTCA GCGTCTCAC CGTCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAGTACAAG	2760
TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA	2820
GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAAG	2880
AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG	2940
TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCTCCCGT GCTGGACTCC	3000
GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG	3060
AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC	3120
CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT	3180

MD 1367 C2

27

TCGTGACAAC ATGCGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CCTTCTAGTT	3240
GCCAGCCATC TGTGTGTTGC CCTTCCCCCG TGCCCTTCCTT GACCCCTGGAA GGTGCCACTC	3300
CCACTGTCCCT TTCTTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT	3360
CTTCTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATACCA	3420
GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT	3480
CCCGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT	3540
AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG	3600
AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA	3660
GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCAGAA	3720
GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG	3780
GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT	3840
CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTCCGCG	3900
CAAACCTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG	3960
GTTGACCAT TGAACGTCAT CGTCGCCGTG TCCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA	4020
GACCTACCCT GGCCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC	4080
TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT	4140
CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGCACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA	4200
GAACCAACCAC GAGGAGCTCA TTTCTTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT	4260
GAACAACCCG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGG TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT	4320
TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG	4380
GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA	4440
GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA	4500
GTCTACGAGA AGAAAGACTA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG	4560
CTATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCC	4620
TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG	4680
TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG	4740
GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA	4800
CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC	4860
TAGCTTTGCT TCTCAATTTC TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTTAAC	4920
ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT	4980
TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA	5040

MD 1367 C2

28

GCCAGTGAGT	GGCACAGCAT	TCTAGGAGAG	AATATGCTTG	TCATCACCGA	AGCCTGATTC	5100
CGTAGAGCCA	CACCTTGGTA	AGGGCCCAATC	TGCTCACACA	GGATAGAGAG	GGCAGGAGCC	5160
AGGGCAGAGC	ATATAAGGTG	AGGTAGGATC	AGTTGCTCCT	CACATTTGCT	TCTGACATAG	5220
TTGTGTTCGG	AGCTTGGATC	GATCCTCTAT	GTTTGAACAA	GATGGATTGC	ACGCAAGTTC	5280
TCCGGCCGGT	TGGCTGGAGA	GGCTATTCCG	CTATGACTGG	GCACAACAGA	CAATCGGCTG	5340
CTCTGATGCC	GCCGTGTTCC	GGCTGTCAGC	GCAGGGGCGC	CCGGTTCTTT	TTGTCAAGAC	5400
CGACCTGTCC	GGTGCCTTGA	ATGAACAGCA	GCACGAGGCA	GCAGCGCTAT	CGTGGCTGGC	5460
CACGACGGGC	GTTCCCTTGG	CAGCTGTGCT	CGACGTTGTC	ACTGAAGCGG	GAAGGGACTG	5520
GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGGCAGGA	TCTCCTGTCA	TCTCACCTTG	CTCCTGCCGA	5580
GAAAGTATCC	ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGCTGCAT	ACGCTTGATC	CGGCTACCTG	5640
CCCATTCCGAC	CACCAAGCGA	AACATCGCAT	CQAGCGAGCA	CGTACTCGGA	TGGAAGCCGG	5700
TCTTGTCCAT	CAGGATGATC	TGGACGAGGA	GCATCAGGGG	CTCGCGCCAG	CCGAACGTCT	5760
CGCCAGGCTC	AAGGCGCGCA	TGCCCGACGG	CGAGGATCTC	GTCTGACCCC	ATGGCGATGC	5820
CTGCTTGCCG	AATATCATGG	TGCAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTCATCG	ACTGTGGCCG	5880
GCTGGGTGTG	GCGGACCGCT	ATCAGGACAT	AGCGTTGGCT	ACCCGTGATA	TTGCTGAAGA	5940
GCTTGGCGGC	GAAATGGGCTG	ACCGCTTCCT	CCTGCTTTAC	GGTATCGCCG	CTCCCGATTC	6000
GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	GCCTTCTTGA	CGAGTTCTTC	TGAGCGGGAC	TCTGGGGTTC	6060
GAAATGACCG	ACCAAGCGAC	GCCCAACCTG	CCATCAGGAG	ATTTGATTC	CACCGCCGCC	6120
TTCTATGAAA	GGTTGGGGTT	CGGAATCGTT	TTCGGGAGCG	CCGGCTGGAT	GATCCTCCAG	6180
CGCGGGGATC	TCATGCTGGA	GTTCTTCGCC	CACCGCAACT	TGTTTATTGC	AGCTTATAAT	6240
GTTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAT	TTACAAATA	AAGCATTTTT	TTACTTGCAT	6300
TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	CTATCTTATC	ATGTCTGGAT	CGCGGCCGCG	6360
ATCCCGTCGA	GAGCTTGGCG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	6420
CGCTCACAAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCCG	GAAACATAAA	GTGTAAAGCC	TGGGCTGCCT	6480
AATGAGTGAG	CTAACTCACA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT	GCCCGCTTTC	CAGTCGGGAA	6540
ACCTGTCTGT	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAAACGCG	GGGGAGAGGC	GTTTTCGCTA	6600
TTGGGCGCTC	TTCCGCTTCC	TGCTCACTG	ACTCGCTGCG	CTCGGTCTGT	CGGCTGCGGC	6660
GAGCGGTATC	AGCTCACTCA	AAGGGGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	6720
CAGGAAAGAA	CATGTGAGCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCGAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	6780
TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCGCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	6840
GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	6900
CCCTCGTGCG	CTCTCCTGTT	CCGACCTGTC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTTCTCT	6960

MD 1367 C2

29

CTTCGGGAAG CGTGGCGGTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAAT TCGGTGTAGG	7020
TCGTTGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT	7080
TATCCCGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCAGTGGCAG	7140
CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA	7200
AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA	7260
AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG	7320
GTAGCGGTGG TTTTCTTCTT TCGAAGCAGC AGATTACGGC CAGAAAAAAA GGATCTCAAG	7380
AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAC TCACGTTAAG	7440
GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT	7500
GAAGTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TACCAATGCT	7560
TAATCACTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTCT TTCATCCATA GTTGCCTGAC	7620
TCCCGCTCGT GTAGATAACT ACATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGTGCAA	7680
TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG	7740
GRAGGCGCGA GCGCAGAAGT GGTCTTGCAA CTTTATCCGC CTCATCCAG TCTATTAAAT	7800
GTTGCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCCA	7860
TTGTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGGTTTATC AGCTCCGGT	7920
CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT	7980
TGGTCTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCACT GTTATCACTC ATGGTTATGG	8040
CAGCACTGCA TARTCTCTT ACTGTCTATG CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG	8100
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG	8160
CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GGAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA	8220
AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT	8280
AACCCACTCG TGACCCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGCGGT	8340
GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT	8400
GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA	8460
TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT	8520
TTCCCGGAAA AGTGCACCT	8540

MD 1367 C2

30

(3)

INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 2

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

(A) LUNGIME: 9209 baze

(B) TIP: acid nucleic

(C) IMPLETIRE: simplă

(D) TOPOLOGIE: circulară

(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)

(iii) IPOTETIC: da

(iv) ANTISENS: nu

DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr.2

```
GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120
GGAGAATGGG CGGAAGTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCTGTCTGG GGAGCCTGGG 240
GACTTTCAC ACCTGGTTGC TGAATAATG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
GGGGAGCCCTG GGGACTTTCC ACACCTTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT 360
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTTG 480
ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGAAGTTCCA TTGACGTCAA 540
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGGCAGTAC 660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
ATGGTGATGC GGTFTTGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
TTTCCAAGTC TCCACCCCAAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCCG CTGGAGACGC 960
CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020
GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080
GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGCCCC GCTCAAGTGT AAGTTACATC 1140
CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCTCC CCCAAACCTT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200
CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTACTCTCTC 1260
ACAATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGSAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380
TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1440
```

MD 1367 C2

31

TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGAAGGT	GGATAACGCC	1500
CTCCAATCGG	GTAACCTCCA	GGAGAGTGT	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC	1560
AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	1620
TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCGTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	1680
TGTTGAATTC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTCTG	GACAACATGC	1740
GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT	CTAGTTGCCA	GCCATCTGTT	1800
GTTTGCCCTT	CCCCCGTCCC	TTCTTTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTTCC	1860
TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCAATCTAT	TCTGGGGGGT	1920
GGGGTGGGSC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGGGAT	1980
GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	2040
ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCC	GTACATGACC	TTATGGGACT	2100
TTCTTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	2160
GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	2220
CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTGGC	ACCAAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	2280
GTAACAATCT	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	2340
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	ACCCGTCGAC	2400
ATGGGTGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCTCT	GTGCTGTTG	CTACGCGTGT	CCTGTCCCAG	2460
GTACAATGTC	AGCAGCCTGG	GGCTGAGCTG	GTGAAGCCTG	GGGCCTCAGT	GAAGATGTCC	2520
TGCAAGGCTT	CTGGCTACAC	ATTTACCAGT	TACAATATGC	ACTGGGTAAA	ACAGACACCT	2580
GGTCGGGGCC	TGGAATGGAT	TGGAGCTATT	TATCCCGGAA	ATGGTGATAC	TTCTTACAAT	2640
CAGAAGTTCA	AAGGCAAGGC	CACATTGACT	GCAGACAAAT	CCTCCAGCAC	AGCCTACATG	2700
CAGCTCAGCA	GCCTGACATC	TGAGGACTCT	GCGGTCTATT	ACTGTGCAAG	ATCGACTTAC	2760
TACGGCGGTG	ACTGGTACTT	CAATGTCTGG	GGCGCAGGGA	CCACGGTCAC	CGTCTCTGCA	2820
GCTAGCACCA	AGGGCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCACCCCT	CCTCCAAGAG	CACCTCTGGG	2880
GGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTCTCG	2940
TGGAATCAG	GCGCCCTGAC	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC	CGGCTGTCTT	ACAGTCTCTCA	3000
GGACTCTACT	CCCTCAGCAG	CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAGCTTGGG	CACCCAGACC	3060
TACATCTGCA	ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	AGCAGAGCCC	3120
AAATCTTGTG	ACAAAATCA	CACATGCCCC	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	CCTGGGGGGA	3180
CCGTCACTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAAACCC	AAGGACACCC	TCATGATCTC	CCGGACCCCT	3240
GAGGTACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	3300
TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC	AAGACAAAGC	GCGGGGAGGA	GCAGTACAAC	3360

MD 1367 C2

32

```

AGCAGGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCGTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC GCATCGAGAA AACCATCTCC 3480
AAGGCCAAG GGCAGCCCCG AGAACCCACAG GTGTACACCC TGCCCCCATC CCGGGATGAG 3540
CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600
GCCGTGGAGT GCGAGAGCAA TGGGCGCCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660
CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCTCTAC AGCAAGCTCA CGGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720
CAGCAGCGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCCTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGSATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840
AGACTGGATT CGTGACAACA TGCGGCCCTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900
CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CTTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAG 3960
GTGCCACTCC CACTGTCTCT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGATCGCAT TGTCTGAGTA 4020
GGGTTCATTG TATTCGGGG GGTGGCGCTG GGCAGGACAG CAAGGGGAG GATTGGGAG 4080
ACAAATAGAG GCATGCTGGG GATCGCGTGG GCTCTATGGA ACCAGGTGGG GCTCGACAGC 4140
GCTGGATCTC CGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAA 4200
AGGAAAATTA ATTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAATCGGTT GCCAAAAGG 4260
ATGCTTTAGA GACAGTGTTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTGAG AGGGAGTACC 4320
CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380
ATCACCGAAG CCGATTCCG TAGAGCCACA CTTGGTAAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440
ATAGACAGGG CAGGACCCAG GGCAGAGCAT ATAAGCTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500
CAATTCCTTC TGACATAGT GTGTTGGGAG CTGGATAGC TTGCACAGCT CAGGGCTGCG 4560
ATTTCCGCC AAACCTGAG GCAATCCTAG CGTGAGGGCT GGTAGGATT TATCCCGCT 4620
GCCATCATGG TTCGACCAT GAACTGCATC GTCGCGCTGT CCAAAAATAT GGGGATTGGC 4680
AAGAACGGAG ACCTACCCCT GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAGAATG 4740
ACCACAACCT CTTCACTGGA AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAACCTGG 4800
TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCACTAGA 4860
GAACTCAAG AACCAACAG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAGTTTGGA TGATGCCCTA 4920
AGACTTATT AACCAACCGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980
AGTTCTGTTT ACCAGGAAG CATGANTCAA CAGGCCACG TTAGACTCTT TGTGACAAAG 5040
ATCATGCAGG AATTTGAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAAA 5100
CTTCTCCAG AATACCCAG CGTCTCTCT GAGGTCCAGG ACGAAAAAG CATCAAGTAT 5160
AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220

```

MD 1367 C2

33

CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCCTC	5280
GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCCGTGC CTTCCTTGAC	5340
CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATG CATCGCATTG	5400
TCTGAGTAGG TGTCAATCTA TTCTGGGGGG TGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGAGGA	5460
TTGGGAAGAC AATAGCAAGC ATGCTGGGJA TGGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC	5520
TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT	5580
AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG	5640
AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA	5700
GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCAG	5760
GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG	5820
GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT	5880
CTGACATAGT TGTCTTGGGA GCTTGATCG ATCCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA	5940
CGCAGGTCTT CCGGCCGCTT GGGTGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC	6000
AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTCCG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTCTTTT	6060
TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC	6120
GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCTTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG	6180
AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC	6240
TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCCG CGGCTGCATA CGCTTGATCC	6300
GGCTACCTGC CCATTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT	6360
GGAAGCCGGT CTGTGCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC	6420
CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT CCCCACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA	6480
TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAATAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA	6540
CTGTGGCCCG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT	6600
TGCTGAAGAG CTGGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC	6660
TCCCATTTCG CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT	6720
CTGGGGTTTC AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTGATTTCC	6780
ACCGCCGCCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG	6840
ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA	6900
GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAATTC TCACAAATAA AGCATTTTTT	6960
TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC	7020
GCGGCCGCGA TCCCGTCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA	7080
ATTGTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAAGCCT	7140

MD 1367 C2

34

GGGGTGCCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCCCTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC	7200
AGTCGGGAAA CCTGTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACCCCGG GGGAGAGGCG	7260
GTTTCGGTAT TGGCGGCTCT TCGGCTTCCT CGCTCACTGA CTGGCTGCGC TCGGTCGTTC	7320
GGCTGCGGG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG	7380
GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA	7440
AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCGGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC	7500
GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGCACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC	7560
CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCTGCGC GCTTACCGGA TACCTGTCCG	7620
CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT	7680
CGGTGTAGGT CGTTCCGCTC AAGCTGGGCT GTGTGCAAGA ACCCCCCGTT CAGCCCCAGC	7740
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAAGACG GACTTATCGC	7800
CACCTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG	7860
AGTTCCTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAAG GACAGTATTT GGTATCTCGG	7920
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCCGAAAAA GAGTTCGTAG CTCTTGATCC GGCACAAAAA	7980
CGACCGCTGC TAGCGGTGCT TTTTGTGTTT GCAAGCAGCA GATTACCGGC AGAAAAAAG	8040
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGCTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT	8100
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA	8160
ATTAAAAATG AAGTTTTTAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT	8220
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTCCGT TCATCCATAG	8280
TTGCCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA	8340
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCCGCTCC AGATTATCA GCAATAAACG	8400
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAAGT GTCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT	8460
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCCGC AGTTAATAGT TTGCGCAACG	8520
TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTGGGTATG GCTTCATCA	8580
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG	8640
TTAGCTCCTT CGGTCCCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAAGT TTATCACTCA	8700
TGGTTATGCG AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG	8760
TGACTGGTCA GACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGT TATGCGGCGA CCGAGTTGCT	8820
CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA	8880
TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAA TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA	8940
GTTCGATCTA ACCCACTCGT GCACCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAAGG	9000
TTTCTGGGTG AGCAAAAAA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGCGGACAC	9060
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT	9120
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTGAAT GTATTAGAA AAATAACAA ATAGGGGTTT	9180
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT	9209

MD 1367 C2

35

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

- (A) LUNGIME: 54 baze
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) IMPLETIRE: simplă
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)
- (iii) IPOTETIC: da
- (iv) ANTISENS: nu

DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr. 3

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

(5) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 4

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

- (A) LUNGIME: 30 baze
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) IMPLETIRE: simplă
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)
- (iii) IPOTETIC: da
- (iv) ANTISENS: da

DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr. 4

5' TGC AGC ATC CGT ACG TTT GAT TTC CAG CTT 3'	30
---	----

(6) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 5

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

- (A) LUNGIME: 384 baze
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) IMPLETIRE: simplă
- (D) TOPOLOGIE: lineară
- (ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)
- (iii) IPOTETIC: da
- (iv) ANTISENS: nu

DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr. 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 TGC 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 TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC	357
GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA	384

(7) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 6

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

- (A) LUNGIME: 27 baze
- (B) TIP: acid nucleic
- (C) IMPLETIRE: simplă

MD 1367 C2

36

- (D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)
(iii) IPOTETIC: da
(iv) ANTISENS: nu
DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr. 6

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

27

(8) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 7

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

- (A) LUNGIME: 29 baze
(B) TIP: acid nucleic
(C) IMPLETIRE: simplă
(D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)
(iii) IPOTETIC: da
(iv) ANTISENS: da
DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr. 7

5' GGS TGT TGT GCT AGC TGM RGA GAC RGT GA 3' 29

(9) INFORMAȚIE PENTRU SECVENȚA ID NR. 8

(i) CARACTERIZAREA SECVENȚEI:

- (A) LUNGIME: 420 baze
(B) TIP: acid nucleic
(C) IMPLETIRE: simplă
(D) TOPOLOGIE: lineară
(ii) TIPUL MOLECULEI: DNA (genomic)
(iii) IPOTETIC: da
(iv) ANTISENS: nu
DESCRIEREA SECVENȚEI: Secvență ID nr. 8

```
ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTT TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG GGT GTC    51
CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTC AAG CCT GGG    102
GCC TCA GGG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TGT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC    153
AAT ATG CAC TGG GTA AAA CAG ACA CCT GGT CAG GGC CTG GAA TGG ATT GGA    204
GCT APT TAT CCC GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC    255
AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TTC 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 TGG GGC GCA GGC ACC ACG GTT    408
AGC CTC TGT GCA    420
```

(57) Revendicări:

1. Metodă de tratament al limfomului celulelor B cuprinzând administrarea unei cantități terapeutice eficiente a anticorpului anti-CD20, **caracterizată prin aceea că** în calitate de anticorp anti-CD20 se folosește cel puțin un anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ.
2. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** se administrează anticorpul anti-CD20 în doză de 0,001...30 mg/kg.
3. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** se administrează anticorpul anti-CD20 obținut de la un transfectom, cuprinzând anti-CD20 în TCAE 8, depozitat în Colecția Americană de Specii de Culturi (ATCC) ca parte a nr. 69119.
4. Metodă, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** se administrează repetat o cantitate terapeutică eficientă a cel puțin unui anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ.
5. Metodă, conform revendicării 4, **caracterizată prin aceea că** se administrează repetat anticorpul anti-CD20 cel târziu peste 7 zile după prima administrare a anticorpului anti-CD20.

MD 1367 C2

37

6. Metodă de tratament al limfomului celulelor B ce include administrarea anticorpului anti-CD20, **caracterizată prin aceea că** tratamentul se efectuează în trei perioade, totodată în prima perioadă a tratamentului se administrează prima cantitate terapeutic eficientă a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ, la a doua perioadă a tratamentului se administrează a doua cantitate terapeutic eficientă a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ și la perioada a treia de tratament se administrează a treia cantitate terapeutic eficientă a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ.

7. Metodă, conform revendicării 6, **caracterizată prin aceea că** se administrează anticorpus anti-CD20 în doză de 0,001...30 mg/kg, la fiecare perioadă.

8. Metodă, conform revendicării 6, **caracterizată prin aceea că** a doua perioadă de tratament se realizează cel târziu peste 7 zile de la prima perioadă.

9. Metodă, conform revendicării 6, **caracterizată prin aceea că** a treia perioadă de tratament se realizează cel târziu peste 14 zile de la prima perioadă.

10. Metodă, conform revendicării 6, **caracterizată prin aceea că** se administrează anticorpus anti-CD20 obținut de la un transfectom, cuprinzând anti-CD20 în TCAE 8 depozitat în ATCC cu nr. 69119.

11. Anticorp anti-CD20 himeric imunologic activ obținut de la un transfectom depozitat în ATCC sub nr. 69119.

12. Hibridom depozitat în ATCC sub nr. HB 11388, secretând anticorpus anti-CD20.

13. Anticorp anti-CD20 monoclonal secretat de hibridomul depozitat în ATCC sub nr. HB 11388.

14. Anticorp, conform revendicării 12, **caracterizat prin aceea că** este marcat cu izotopi radioactivi.

15. Anticorp marcat cu izotopi radioactivi, conform revendicării 14, **caracterizat prin aceea că** marcarea radioactivă este selectată din grupa constituită din ytriu [90], indiu [111] și iod [131].

16. Metodă de tratament al limfomului celulelor B cuprinzând administrarea unei cantități terapeutic eficiente a anticorpului anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, **caracterizată prin aceea că** în calitate de anticorp anti-CD20 se folosește anticorpus secretat de hibridomul depozitat în ATCC sub nr. HB 11388.

17. Metodă, conform revendicării 16, **caracterizată prin aceea că** se folosește anticorpus marcat cu ytriu [90].

18. Metodă de tratament al limfomului celulelor B ce include administrarea cantității terapeutic eficiente a anticorpului anti-CD20, **caracterizată prin aceea că** tratamentul se efectuează în două perioade, totodată în prima perioadă de tratament se administrează cantitatea terapeutic eficientă a anticorpului anti-CD20 himeric imunologic activ, în a doua perioadă de tratament se administrează anticorpus anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi.

19. Metodă, conform revendicării 18, **caracterizată prin aceea că** se administrează anticorpus anti-CD20 himeric obținut de la un transfectom, cuprinzând anti-CD20 în TCAE 8 depozitat în ATCC ca parte a nr. 69119.

20. Metodă, conform revendicării 18, **caracterizată prin aceea că** se administrează anticorpus anti-CD20 marcat cu izotopi radioactivi, cuprinzând anticorp monoclonal secretat de hibridomul depozitat în ATCC cu nr. HB 11388.

(56) Referințe bibliografice:

1. Press et. al, Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas. Blood. 1987, 69/2, p. 584-591
2. Eary, J. F et al. Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma. J. Nuc. Med. 1990, 31/8, p. 1257-1268
3. WO 88/04936 A

Șef secție:

EGOROVA Tamara

Examinator:

TIMONIN Alexandr

Redactor:

ANDRIUȚĂ Victoria

MD 1367 C2

38

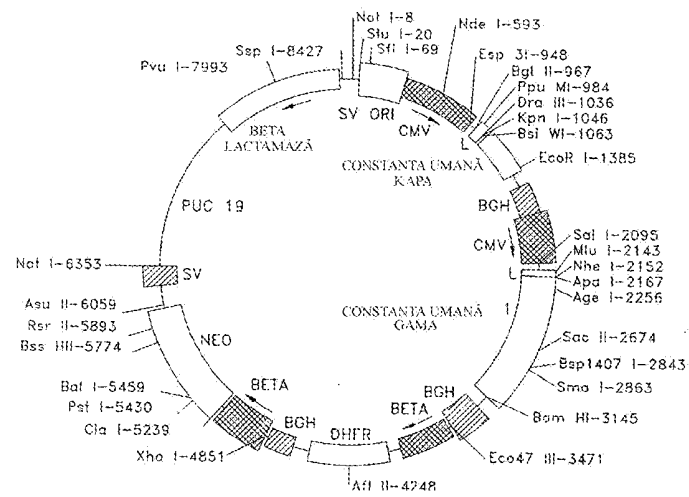


Fig. 1

MD 1367 C2

39

LINKER #1 15bp | SV40 ORIGIN = 332bp
GACGTCCGGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCIGG AATAGCTCAG 60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCLA TGCATGGGGC 120
GGAGAATGGG CGGAACGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACITC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCCTGCT 300
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAAT TAATTCCCCT 360
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420
GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCGATTG 480
CMV PROMOTOR-AMPLIFICATOR DE GENE = 567bp
ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CTTGGCATTG TGCCAGTAC 660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
CATCACAGAT CTCTACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020
CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080
TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1140
TGCCTGCTGA ATAACTTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT GGATAACGCC 1200
CONSTANTA UMANĂ KAPA 324bp 107 AMINOACID și STOP CODON
CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260
AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAACACAA AGTCTACGCC 1320
TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380
STOPAREA
CATENEI
USOARE
Eco RI LINKER #4=85bp
TGTTCGATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCGT GACAACATGC 1440
GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500

Fig. 2A

MD 1367 C2

40

```

GTTTGCCCT CCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCAC TGTCTTTCC 1560
      BGH poly A=231bp
TAATAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTTG CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1620
GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680
      LINKER #5=15bp
GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCTATTG 1740
      1702 3 1717 8
ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800
TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 1860
      CMV PROMOTOR-AMPLIFICATOR DE GENE =334bp
GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCAC AGTCTCCACC 1920
CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC 1980
GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040
      LINKER #6=7bp
TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCGAC 2100
      2051 2 2058 9
      CONDUCTOR=51bp
      Mlu I 2151 2 Nhe I
ATCGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT CGCTAGCACC 2160
      STARTUL CAIENEI GRELE -5 -4 -3 114 115
AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCAGCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG 2220
GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAAC TCA 2280
GGCGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCIC AGGACTCFAC 2340
      CONSTANTA UMANA GAMA I
TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC CGTGCCCTCC AGCAGCTTGG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400
      993bp=330 AMINOACID si STOP CODON
AACGTGAATC ACAAGCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460
GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTACGTC 2520
TTCTCTTCC CCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTCACA 2580
TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640
GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700
CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGAACAAC 2760
TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820
GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GGTGACCAGE 2880
AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG 2940
TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 3000

```

Fig. 2B

MD 1367 C2

41

```

GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060
AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120
      STOPAREA CATENEI GRELE : Bam HI LINKER #7=81bp
CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180
      3144 15
TCGTGACAAC ATGCGGCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTCGACTGTG CTTTCTAGTT 3240
      3225 16
GCCAGCCATC TGTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3300
      HORMON DE CREȘTERE BOVIN REGIUNEA POLIADENILATIEI =231bp
CCACTGTCCT TTCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360
CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA 3420
      LINKER #8=34bp
GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG AACCACTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480
      3456 17
CCCGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 3540
      3490 1
AATTTTAACA CCAATTCACT AGTTGATTGA GCAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600
      PROMOTOR MAJOR AL HEMOGLOBINEI BETA DE ȘOARECE =366bp
AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660
GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720
GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780
GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840
      LINKER #9=19bp 5' INTRANSLANT = 82 bp
CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTGCGGC 3900
      3856 17 3875 16
CAAACTTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG 3960
      3957 18
GTTTGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCCAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020
GACCTACCCT GGCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080
TCITCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140
      ȘOARECE =564bp=187 AMINOACID ȘI STOP CODON
CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200
GAACCAACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260
GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGG TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320
TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380
GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440
GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

```

Fig. 2C

MD 1367 C2

42

STOP DHFR
 GTCTACGAGA AGAAAGAC TA ACAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560
 4521 2
 3' INTRASLANT DHFR=82bp (LINKER #10=10bp)
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCCT CGACTGTGCC 4620
 4603 4 4613 4
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGGCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCTCGGAAGG 4680
 HORMON DE CREȘTERE BOVIN REGIUNEA POLIADENILATIEI =231bp
 TGCCACTCCC ACTGTCTTTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740
 GTGTCTTTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800
 CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC 4860
 4844 5 (LINKER #11=17bp)
 TAGCTTTGCT TCTCAATTTT TTATTTGCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTTAAC 4920
 ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980
 PROMOTOR MAJOR AL HEMOGLOBINEI BETA DE ȘOARECE =366bp
 TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040
 GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACC GA AGCCTGATTC 5100
 CGTAGAGCCA CACCTTGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCC 5160
 AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220
 LINKER #12=21bp (START NEO)
 TTGTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GGTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTT 5280
 5227 8 5248 9
 TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340
 CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTGAGC GCAGGGGCGC CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400
 TRANSFERARE FOSFORICĂ DE NEOMICINĂ
 CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAAGTGA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460
 795bp=264 AMINOACID ȘI STOP CODON
 CACGACGGGC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520
 GCTGCTATTG GCGGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCCTGCCGA 5580
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CGGCTACCTG 5640
 CCCATTCGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAGCCCG 5700
 TCTTGTCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760
 CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820
 CTGCTTGGCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTTCATG ACTGTGGCCG 5880
 GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940
 GCTTGCGCGC GAATGGGCTG ACCGCTTCCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCGCCGATTC 6000

Fig. 2D

MD 1367 C2

43

```

GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC STOP NEOTCAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060
604314
GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCAGAG ATTTGATTG CACCGCCGCC 6120
3' INTRANSANT NEO=173bp
TTCTATGAAA GGTGGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180
CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT TGTITATTGC AGCTTATAAT 6240
621617
GGTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAT TTCACAAATA AAGCATTTTT TTTACTGCAT 6300
SV40 POLI A ÎNCEPĂTOR =133bp LINKER #13=19bp
TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGCTCTGGAT CGCGGCCGCG 6360
6349150
ATCCCGTCTGA GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420
636819
CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCGG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT 6480
AATGAGTGAG CTAACACACA TTAATTGCGT TGGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540
ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTITGCGTA 6600
PVC 19
TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC 6660
GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720
CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT 6780
6792= ORIGINE BACTERIANĂ A REPRODUCERII
TGCTGGCGTT TTTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA 6840
GTGAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCCTTTCCC CCTGGAAGCT 6900
CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960
CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020
TCGTTCCGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT 7080
TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140
CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200
AGTGGTGGCC TAACTACGGC TAACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260
AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAACAAA ACCACCGCTG 7320
GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAG 7380
AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAA TCACGTTAAG 7440
GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

```

Fig. 2E

MD 1367 C2

44

GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG AGTAAACTTG GTCTGACAGT TA⁷⁵⁵⁰CCAATGCT 7560
 TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCCTGAC 7620
 TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 7680
 TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 7740
 GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT GGTCCCTGCAA CTTTATCCGC CTCCATCCAG TCTATTAATT 7800
 GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTTGCCA 7860
 TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CTTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTT 7920
 CCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAGCG GTTAGCTCCT 7980
 TCGGTCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCACT GTTATCACTC ATGGTTATGG 8040
 CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 8100
 AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 8160
 CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 8220
 AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT 8280
 AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG GATCTTTTAC TTTCACCAGC GTTCTGGGT 8340
 GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 8400
 GAATACT⁸⁴¹⁰CAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460
 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520
 TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

Fig. 2F

MD 1367 C2

45

```

LINKER #1=15bp |
GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60
15'6
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCACCCA TGCATGGGGC 120
SV40 ORIGINE = 332bp
GGASAATGGG CGGAAC TGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGAATAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACACAAAT TAATTCCTCT 360
347'8 LINKER #2=13bp
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCEC 420
GTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCAT TG 480
ACGTCATAAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540
CVM PROMOTOR-AMPLIFICATOR DE GENE =567bp
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCC CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720
ATGGTGATGC GGT TTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780
TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840
GACTTTCCAA AATGTGCTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960
927'8 LINKER #3=7bp 934'5
Bgl 2 | STARTUL CATENEI UȘOARE CONDUCTOR NATURAL =66bp
CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020
978'9
GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080
1044'5+1
GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140
CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200
REGIUNEA VARIABILĂ A CATENEI UȘOARE 318bp 106 AMINOACID
CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TTA CTCTCTC 1260
ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320
AACCACCCA CGTTCCGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380
1362'3 BsiWI
TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACATC CTCTGTTGTG 1440
TGCTGTCTGA ATAATTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT GGATAACGCC 1500

```

Fig. 3A

MD 1367 C2

46

CONSTANTA UMANĂ KAPA=324bp=107 AMINOACID și STOP CODON

CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1560

AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620

TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1680

STOPAREA
CATENEI
UȘOARE

Eco RI LINKER #4=81bp
TGTTGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1740

1646 17

GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800

1771 12

GTTTGCCCTT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCACD TGTCTTTTCC 1860

TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920

HORMON DE CREȘTERE BOVIN REGIUNEA POLIADENILĂȚIEI =231bp

GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1980

LINKER #5=15bp
GCGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040

2002 3 2017 8

ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100

TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2160

CMV PROMOTOR-AMPLIFICATOR DE GENE =334bp

GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTGACTCACG GGGATTTCCA AGTCTCCACC 2220

CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAAATGTC 2280

GTAACAACTC CGCCCCATTG ACGCAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2340

LINKER #6=7bp Sal I
TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCCA 2400

2351 2 2358 9

STARTUL
CATENEI GRELE CONDUCTOR SINTETIC ȘI NATURAL Mlu I 2457 8
ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGGGTGT CCGTCTCCAG 2460

2401 -5 -4 -3 -2 -1 +1

GTACAACTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520

TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580

VARIABILA CATENEI GRELE =363bp=121 AMINOACID

GGTCGGGGCC TGGAAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2640

CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700

CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760

TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GGCGCAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 2820

Nhe I
GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCCCT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880

GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCAGT GACGGTGTCG 2940

CONSTANTA UMANĂ GAMA I =993bp

TGGAACCTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTA 3000

Fig. 3B

MD 1367 C2

47

330 AMINOACID SI STOP CODON

GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060

TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGCAGAGCCC 3120

AAATCTTGTG ACAAACCTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180

CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240

GAGGTACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300

TACGTGGAGC GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360

AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420

GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCACAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480

AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG 3540

CTGACCAAGA ACCAGGTGAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600

GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGACGCCG GAGAACAACT ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660

CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720

CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACAGC 3780

CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA **STOPAREA CATENEI GRELE** **Bam HI** **LINKER #7=81bp**
 3813¹⁴ TCGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840

AGACTGGATT CGTGACAACA TGCGGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900
 3894¹⁵

CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTGTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960

GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020

GGTGTGATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080

ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC 4140
 4125¹⁶

GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200

AGGAAAATTA ATTTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAAGG 4260

PROMOTOR MAJOR AL HEMOGLOBINEI BETA DE ȘOARECE=366bp

ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTGAG AGGGAGTACC 4320

CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTC TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380

ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGTAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440

ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

Fig. 3C

MD 1367 C2

48

```

CATTTCCTTC TGACATAGTT GTGTTGGGAG CTTGGATAGC TTGGACAGCT CAGGGCTGCG 4560
|LINKER #9=19bp| 5' INTRANSANT DHFR=82bp
4525'6 4544'5

ATTTCCGCCCC AAACITGACG GCAATCCTAG CGTGAAGGCT GGTAGGATTT TATCCCCGCT 4620

|START DHFR|
GCCATCATGG TTCGACCATT GAACTGCATC GTCGCCGTGT CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680
4626'7

AAGAACGGAG ACCTACCCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAGAARTG 4740

ACCACAACCT CTTCACTGGA AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAAACCTGG 4800

DHFR=564bp=187 AMINOACID SI STOP CODON
TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCITTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860

GAACTCAAAG AACCAACCAG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTGA TGATGCCTTA 4920

AGACTTATTG AACACCCGA ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980

AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040

ATCATGCAGG AATTTGAAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTGGG GAAATATAAA 5100

CTTCTCCCAG AATACCCAGG CGTCCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT 5160

AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220
5140'1 3' INTRANSANT DHFR=82bp

CTCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCCTC 5280
5272'3 |LINKER #10|
=10bp|

GACTCTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTCGCCC TCCCCCGTGC CTTCTTGAG 5340

HORMON DE CREȘTERE BOVIN REGIUNEA POLIADENILATIEI =231bp
CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTC CATCCGATTG 5400

TCTGAGTAGG TGTCAATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460

TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TGGGTGGGC TCTATGGAAC CAGCTGGGGC 5520
5513'4 |LINKER #11|

TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATITCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 5580
5530'1 =17bp|

AATTTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 5640

PROMOTOR MAJOR AL HEMOGLOBINEI BETA DE ȘOARECE =366bp
AGACAGTGTT CTCTGCACAG ATAAGGACAA CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCAG 5700

GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCAG 5760

GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGC 5820

GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 5880

CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTATG GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940
5896'7 5917'8 |LINKER #12=21bp| |START NEO|

CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

```

Fig. 3D

MD 1367 C2

49

AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT 6060
 TRANSFERARE FOSFORICĂ NEOMICIN =795bp=264 AMINOACID SI STOP CODON
 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC 6120
 GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGGCG AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGCG 6180
 AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGTCAT CTCACCTTGC 6240
 TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCCG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300
 GGCTACCTGC CCATTGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360
 GGAAGCCGGT CTTGTCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420
 CGAAGTGTTC GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480
 TGGCGATGCC TGCTTCCGA ATATCATGGT GGAAATGGC CGCTTTTCTG GATTTCATCGA 6540
 CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600
 TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660
 TCCCGATTCC CAGCGCATCG CTTTCTATCG CTTCTTGAC GAGTTCTTC STOPARE NEO| 6720
 CTGGGGTTCC AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTCGATTCC 6780
 ACCGCCCGCT TCTATGAAAG 3' INTRANSANT NEO=173bp
 GTTGGGCTTC GGAATCGTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG 6840
 ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA 6900
 GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960
 TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCTGGATC 7020
 REGIUNEA DE POLIADENILATIE PRECOCE SV40=133bp
 LINKER #13=19bp
 GCGGCCGCGA TCCCGTCCAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080
 PUC 19
 ATTGTTATCC GTCACAAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGGCT 7140
 GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC 7200
 AGTCGGGAAA CCGTTCGTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGCG 7260
 GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCGTT 7320
 GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380
 GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440
 7461= ORIGINE BACTERIANĂ A REPRODUCERII
 AGGCCCGGTT GCTGGCGTTT TCCATAGGC TCCGCCCCCG TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

Fig. 3E

MD 1367 C2

50

```

GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACCAG GCGTTTCCCC 7560
CTGGAAGCTC CCTCGTGGC TCTCTGTTC CGACCCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620
CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7680
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCCGACC 7740
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800
CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860
AGTTCCTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTCCG 7920
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA 7980
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG 8040
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT 8100
CACGTTAAGG GATTTTGTTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA 8160
ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 8220
LACTAMAZA BETA ]
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 8280
TTGCCTGACT CCCCCTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTATCA GCAATAAACC 8400
LACTAMAZA BETA =861bp=286 AMINOACID SI STOP CODON
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAAGT GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTGCGC AGTTAATAGT TTGCCGAACG 8520
TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640
TTAGCTCCTT CGGTCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGCAGTG TTATCACTCA 8700
TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760
TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820
CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880
TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940
GGTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCGCG 9000
TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060
GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT 9180
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

```

Fig. 3F

MD 1367 C2

51

CONDUCTOR

FRAME 1	-20										-15										-10																																																										
	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										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		1065			1074			1083																																																														
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		1122			1131			1140																																																														
35										40										45										49										50										CDR2																													
Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Pro	Trp	Ile	Tyr	Ala	Thr	Ser	Asn																																																													
TGG	TTC	CAG	CAG	AAG	CCA	GGA	TCC	TCC	CCC	AAA	CCC	TGG	ATT	TAT	GCC	ACA	TCC	AAC																																																													
	1152			1161			1170		1179		1179			1188			1197																																																														
55										60										FR3										65										70																																							
Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser																																																													
CTG	GCT	TCT	GGA	GTC	CCT	GTT	CGC	TTC	AGT	GGC	AGT	GGG	TCT	GGG	ACT	TCT	TAC	TCT																																																													
	1209			1218			1227		1236		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										100										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																																																																				

Fig. 4

MD 1367 C2

52

CONDUCTOR

```

-19          -15          -10          -5
FRAME 1 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val
      ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC
          2409          2418          2427          2436          2445

-1  +1      FR1          10          15
Leu Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Ala Gly Ala Ser
CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA
      2460          2469          2478          2487          2496          2505

      20          25          30 31 CDR1          35 36
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG
      2517          2526          2536          2544          2553          2562

      40 FR2          45          49 50          52 52A 53 54
Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCC GGA AAT
      2574          2583          2592          2601          2610          2619

55 CDR2          60          65 66 FR3          70
Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA
      2631          2640          2649          2658          2667          2676

      75          80          82 82A 82B 82C 83          85
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC
      2688          2697          2706          2715          2724          2733

90          94 95 CDR3          100 100A 100B 100C 100D 101 102 103
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT GTC TGG GGC
      2745          2754          2763          2772          2781          2790

105 FR4          110          113
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT GCA
      2802          2811          2820

```

Fig. 5

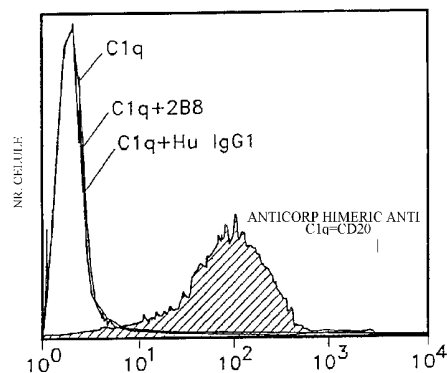


Fig. 6

MD 1367 C2

53

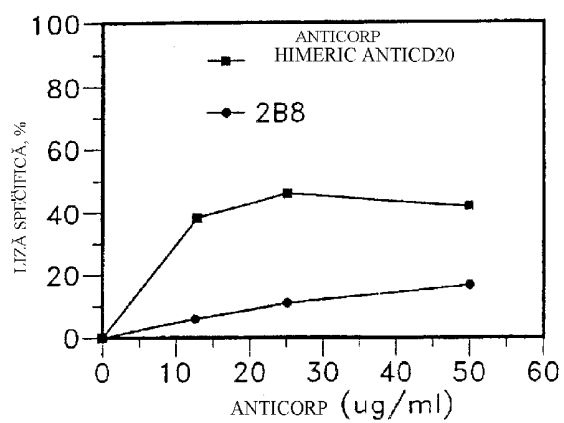


Fig. 7

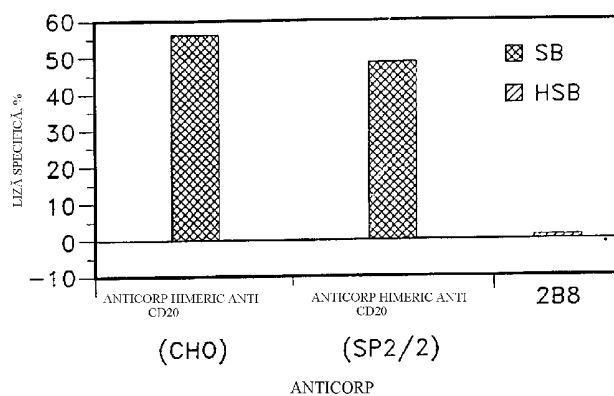


Fig. 8

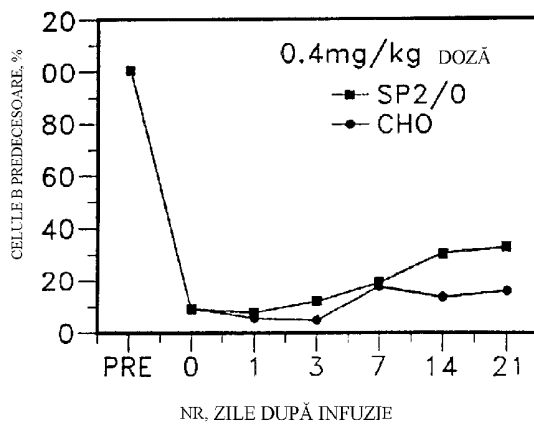


Fig. 9

MD 1367 C2

54

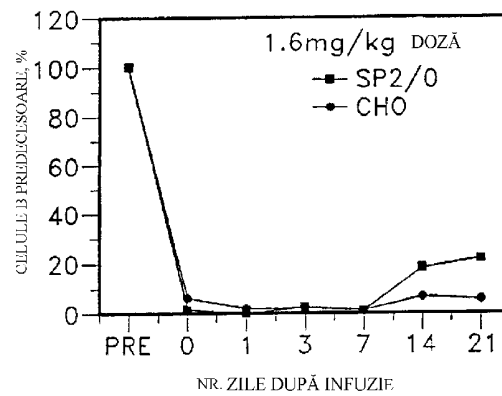


Fig. 10

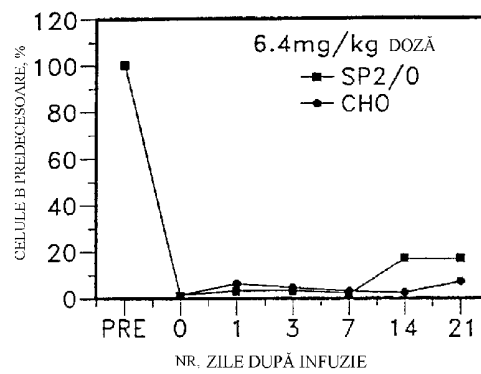


Fig. 11

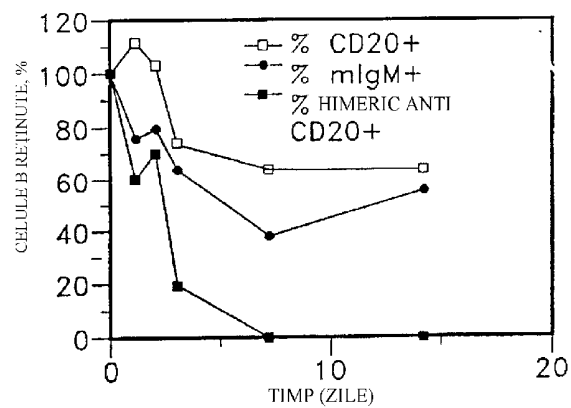


Fig. 12

MD 1367 C2

55

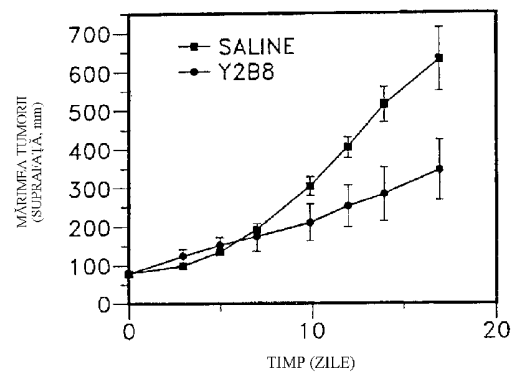


Fig. 13

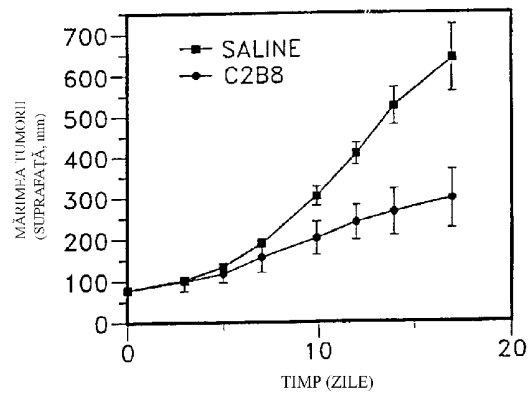


Fig. 14

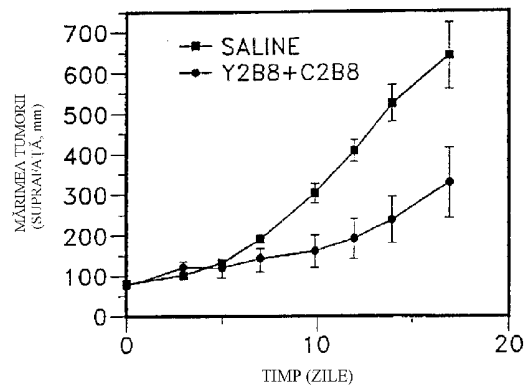


Fig. 15

MD 1367 C2

56

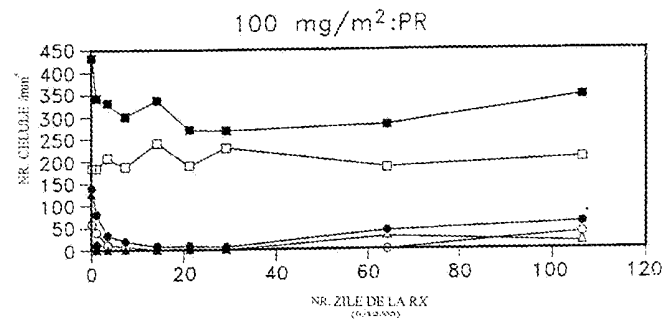


Fig. 16

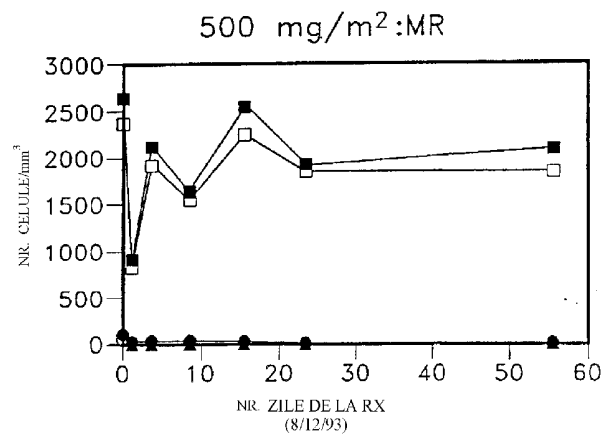


Fig. 17

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: 95-0311	(85) Data fazei naționale PCT: 05.06.1995				
(22) Data depozit: 12.11.1993	(86) Cerere internațională PCT: PCT/US93/10953, 12.11.1993				
(30) Priorități recunoscute : (31) nr.: 07/978,891; 08/149,099 32) data : 13.11.1992; 03.11.1993 33) țara: :US (54) Titlul : Metode de tratament al limfomului celulelor B, anticorpi anti-CD20, hibridom. Termeni caracteristici în limba română: limfom, hibridom, anticorp anti-CD20					
II. D O C U M E N T A R E ÎN LITERATURA DE BREVETE DE INVENȚII					
Indicii clasificărilor de brevete : (51) Int. Cl. : A 61 K 39/395, 43/00; C 12 N 15/02; C 12 P 21/08 <table border="0"> <tr> <td>MD Perioada 1994-1999</td> <td>Brevete: n-a fost selectat Cereri publicate: n-a fost selectat Cereri nepublicate: n-a fost selectat Certificate MU: n-a fost selectat</td> </tr> <tr> <td>BEA Perioada: 1996-1999</td> <td>Brevete: n-a fost selectat Cereri: n-a fost selectat Rapoarte de documentare n-a fost selectat</td> </tr> </table>		MD Perioada 1994-1999	Brevete: n-a fost selectat Cereri publicate: n-a fost selectat Cereri nepublicate: n-a fost selectat Certificate MU: n-a fost selectat	BEA Perioada: 1996-1999	Brevete: n-a fost selectat Cereri: n-a fost selectat Rapoarte de documentare n-a fost selectat
MD Perioada 1994-1999	Brevete: n-a fost selectat Cereri publicate: n-a fost selectat Cereri nepublicate: n-a fost selectat Certificate MU: n-a fost selectat				
BEA Perioada: 1996-1999	Brevete: n-a fost selectat Cereri: n-a fost selectat Rapoarte de documentare n-a fost selectat				
Data: 01.10.1999	Examinator Timonin Alexandr				