

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

(22) Data de pedido: **2008.02.13**

(30) Prioridade(s): **2007.02.21 US 902432 P**

(43) Data de publicação do pedido: **2009.12.02**

(45) Data e BPI da concessão: **2014.01.15**
074/2014

(73) Titular(es):

UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS
225 FRANKLIN STREET, 12TH FLOOR BOSTON,
MA 02110 **US**

(72) Inventor(es):

DONNA AMBROSINO **US**
TERESA BROERING **US**
SUSAN SLOAN **US**
GREGORY J. BABCOCK **US**
WILLIAM D. THOMAS **US**

(74) Mandatário:

NUNO MIGUEL OLIVEIRA LOURENÇO
RUA CASTILHO, Nº 50 - 9º 1269-163 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **ANTICORPOS HUMANOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E SEUS USOS**

(57) Resumo:

SÃO DIVULGADOS ANTICORPOS MONOCLONAIIS HUMANOS ISOLADOS QUE SE LIGAM AO VÍRUS DA HEPATITE C (HCV), E COMPOSIÇÕES E MOLÉCULAS BASEADAS EM ANTICORPOS RELACIONADAS. OS ANTICORPOS HUMANOS PODEM SER PRODUZIDOS NUM TRANSFECTOMA OU NUM ANIMAL NÃO HUMANO TRANSGÉNICO, P.EX., UM CAMUNDONGO TRANSGÉNICO, CAPAZ DE PRODUZIR MÚLTIPLOS ISOTIPOS DE ANTICORPOS MONOCLONAIIS HUMANOS SUBMETENDO-SE A RECOMBINAÇÃO DE V-D-J E TROCA DE ISOTIPOS. TAMBÉM DIVULGADAS SÃO COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS COMPREENDENDO OS ANTICORPOS HUMANOS, ANIMAIS NÃO HUMANOS TRANSGÉNICOS, E HIBRIDOMAS QUE PRODUZEM OS ANTICORPOS HUMANOS, E MÉTODOS TERAPÊUTICOS E DE DIAGNÓSTICO PARA USO DOS ANTICORPOS HUMANOS.

RESUMO

"ANTICORPOS HUMANOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E SEUS USOS"

São divulgados anticorpos monoclonais humanos isolados que se ligam ao vírus da hepatite C (HCV), e composições e moléculas baseadas em anticorpos relacionadas. Os anticorpos humanos podem ser produzidos num transfectoma ou num animal não humano transgênico, p.ex., um camundongo transgênico, capaz de produzir múltiplos isotipos de anticorpos monoclonais humanos submetendo-se a recombinação de V-D-J e troca de isotipos. Também divulgadas são composições farmacêuticas compreendendo os anticorpos humanos, animais não humanos transgênicos, e hibridomas que produzem os anticorpos humanos, e métodos terapêuticos e de diagnóstico para uso dos anticorpos humanos.

DESCRIÇÃO

"ANTICORPOS HUMANOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C (HCV) E SEUS USOS"

Antecedentes da Invenção

O vírus da hepatite C (HCV), originalmente nomeado "hepatite não A e não B" (NANBH), é um vírus de ARN de cadeia única, positiva da família *Flaviviridae*. O seu genoma contém uma grelha de leitura aberta longa única que codifica uma poliproteína com cerca de três mil resíduos de aminoácidos (Choo et al. (1989) *Science* 244:359-362). A poliproteína é processada pela célula hospedeira e proteases virais em três principais proteínas estruturais e várias proteínas não estruturais necessárias para replicação viral. A sequência de nucleótidos do HCV é altamente variável, partilhando os isolados mais divergentes somente 60% de homologia de sequência de nucleótidos. Vários genótipos diferentes do HCV com sequências genómicas ligeiramente diferentes foram identificados.

Isolados de todo o mundo foram agora agrupados em 6 tipos principais, cada um com vários subtipos, baseados em dados de sequência (Simmonds et al. (1995) *Hepatology* 21 : 570-83). Os tipos 1-3 são responsáveis por quase todas das infeções na Europa, o tipo 4 é predominante no Egito e no Zaire, o tipo 5 na África do Sul e o tipo 6 em Hong Kong.

O vírus é transmitido principalmente pelo sangue e produtos sanguíneos. A maioria dos indivíduos infetados ou recebeu transfusões de sangue antes de 1990 (quando o rastreio do fornecimento de sangue quanto ao HCV foi implementado), ou usou drogas intravenosas. Aproximadamente 200 a 400 milhões de pessoas globalmente estão cronicamente infetadas com

HCV, cerca de 2 a 5 milhões destas estão nos Estados Unidos. A infecção crónica do HCV, que afeta cerca de 80% daqueles infetados, perdura ao longo da vida e leva frequentemente ao desenvolvimento de cirrose e cancro do fígado.

O desenvolvimento de vacinas contra o HCV tem sido atrasado pela extrema variabilidade antigénica do vírus. Mesmo quando disponíveis, as vacinas não aliviarão os problemas enfrentados por milhões de transportadores crónicos do HCV globalmente.

A maioria dos anticorpos para HCV não desempenha um papel principal na eliminação da infecção, embora exista neutralização dos anticorpos. No entanto, estes tendem a ser específicos da estirpe e são ineficazes contra estirpes emergentes.

Presentemente, a única terapia com qualquer eficácia demonstrada contra a doença do fígado induzida pelo HCV envolve o uso de alfa-IFN, mas esta abordagem tem alcançado somente sucesso limitado. Mesmo os melhores ensaios clínicos com tratamento com alfa-IFN relatam que somente 40-50% de doentes crónicos respondem e 50% destes indivíduos têm recaída quando o tratamento é parado. Existe também evidência de que o tratamento com alfa-IFN é muito menos eficaz contra alguns genótipos de HCV do que outros.

Correntemente, não foram ainda desenvolvidos nenhuns fármacos convencionais contra infecção pelo HCV (sem ser alfa-IFN). Conformemente, são necessárias imunoterapias melhoradas para tratamento e prevenção de infecção pelo HCV.

Sumário da Invenção

A presente invenção resolve os problemas acima mencionados pelo proporcionar de um anticorpo monoclonal humano anti-HCV que se liga especificamente a uma ampla variedade de isolados de HCV e inibe a capacidade do vírus de infectar células.

Numa forma de realização, isto é demonstrado pela capacidade dos anticorpos de neutralizarem (i.e., inibirem ou bloquearem) o HCV *in vitro* (p.ex., num ensaio de neutralização de pseudovírus de HCV). Noutra forma de realização, isto é demonstrado pela capacidade dos anticorpos de inibirem a infectividade do HCV *in vivo* num sujeito, tal como um animal ou um humano.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser preparados eficazmente, em quantidades virtualmente ilimitadas, em forma altamente purificada. Conformemente, os anticorpos são adequados para prognóstico, diagnóstico, e/ou tratamento de um indivíduo exposto ou suspeito de ter sido exposto ao HCV. Os anticorpos podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas para fabrico de anticorpos humanos conhecidas na técnica. Por exemplo, como exemplificado aqui, os anticorpos podem ser gerados em animais transgênicos expressando segmentos do gene da imunoglobulina humana, p.ex., camundongos transgênicos compreendendo um locus de Ig humana. Além do mais, os anticorpos podem ser administrados sozinhos ou em combinação, p.ex., com uma vacina anti-HCV ou outros anticorpos, para aumentar as taxas de sobrevivência de sujeitos (p.ex., animais e humanos) infectados com HCV.

Conformemente, a invenção proporciona várias vantagens que incluem o, mas não estão limitadas ao, seguinte:

- um anticorpo recombinado completamente humano anti-HCV para prognóstico, diagnóstico, e/ou tratamento do HCV num sujeito, p.ex., protege de ou inibe morbidez ou mortalidade mediada pelo HCV num sujeito;
- uma composição (p.ex., farmacêutica) e/ou um conjunto compreendendo um ou mais anticorpos recombinantes completamente humanos anti-HCV que podem ser usados sozinhos ou em combinação com vacinas comercialmente disponíveis para tratar infecção pelo HCV.

Os anticorpos monoclonais humanos ou suas porções de ligação do antígeno da invenção ligam-se especificamente a um epítopo não conformacional da proteína E2 do HCV. Anticorpos ou suas porções de ligação do antígeno particulares ligam-se especificamente a um epítopo dentro da proteína E2 do HCV. Preferencialmente, o epítopo da proteína E2 do HCV compreende resíduos de aminoácidos 412-423. Noutra forma de realização, o epítopo da proteína E2 do HCV consiste em resíduos de aminoácidos 412-423. Numa forma de realização, a proteína E2 do HCV compreende resíduos de aminoácidos 413, 418, e/ou 420.

Os anticorpos monoclonais humanos ou suas porções de ligação do antígeno podem ser caracterizados como se ligando especificamente a uma proteína E2 do HCV com uma K_D menor do que cerca de 10×10^{-9} M, ou uma K_D ainda mais favorável.

A invenção proporciona um anticorpo monoclonal humano isolado, ou sua porção de ligação do antígeno, em que o anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, compreende:

- (a) regiões variáveis da cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs: 1 e 2; ou
- (b) uma sequência da CDR3 da região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:9, uma sequência da CDR3 da região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:18, uma sequência da CDR2 da região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:8, uma sequência da CDR2 da região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:17, uma sequência da CDR1 da região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:7, uma sequência da CDR1 da região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:16.

Também divulgados são anticorpos ou suas porções de ligação do antígeno que se ligam especificamente a um epítopo que se sobrepõe a um epítopo ligado por um anticorpo produzido pelo clone 83-128, 85-2 ou 073-1 e/ou compete pela ligação a um HCV, ou sua porção, com um anticorpo produzido pelo clone 83-128, 85-2 ou 073-1.

Os anticorpos monoclonais humanos da presente invenção incluem anticorpos de comprimento total, por exemplo, que incluem um domínio efetor (p.ex., um domínio Fc), bem como porções ou fragmentos de anticorpos, tais como anticorpos de cadeia única e fragmentos Fab. Os anticorpos podem estar também ligados a uma variedade de agentes terapêuticos (p.ex., agentes antivirais ou toxinas) e/ou um marcador.

Noutro aspeto, a invenção caracteriza-se por polipéptidos isolados que incluem uma porção de ligação do antígeno do anticorpo da invenção.

A invenção também proporciona um ácido nucleico isolado codificando uma região variável de um anticorpo que se liga ao HCV, compreendendo o referido ácido nucleico SEQ ID

NO:25 e SEQ ID NO:26. A invenção também se caracteriza por vetores de expressão incluindo o ácido nucleico acima mencionado bem como células hospedeiras compreendendo tais vetores de expressão.

Células hospedeiras adequadas para expressão de anticorpos da invenção incluem uma variedade de células eucarióticas, p.ex., células de levedura, células de mamífero, p.ex., células de ovário do *hamster* chinês (CHO), células NSO, células de mieloma, ou células de planta.

Noutro aspeto, a invenção caracteriza-se por composições e conjuntos que incluem um ou mais anticorpos monoclonais humanos isolados da invenção ou suas porções de ligação do antígeno.

Por exemplo, a invenção proporciona uma composição compreendendo o anticorpo ou porção de ligação do antígeno da invenção e um transportador farmacêuticamente aceitável.

A invenção também proporciona um conjunto compreendendo um ou mais anticorpos monoclonais isolados, ou suas porções de ligação do antígeno, da invenção, e instruções para uso no tratamento de uma doença mediada pelo HCV.

A invenção também proporciona um anticorpo monoclonal isolado, ou sua porção de ligação do antígeno, da invenção para uso num método de tratamento de uma infeção pelo HCV num sujeito, preferencialmente um sujeito humano.

A invenção também proporciona uma composição para uso num método de tratamento de uma doença ou distúrbio mediado pelo HCV num mamífero, em que a referida composição compreende o anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, da invenção, num transportador farmacêuticamente

aceitável. A composição pode adicionalmente compreender um segundo anticorpo que se liga ao HCV.

A invenção também proporciona um método de detecção de uma infecção pelo HCV num mamífero compreendendo contacto de um fluido corporal obtido de um mamífero com um anticorpo da invenção, ou sua porção de ligação do antigénio, e determinação se ocorre ligação, sendo a referida ligação indicativa da presença de uma infecção pelo HCV.

Os anticorpos monoclonais humanos ou suas porções (e composições compreendendo os anticorpos ou suas porções) da invenção podem ser administrados numa variedade de modos adequados, p.ex., intravenosamente (IV), subcutaneamente (SC), ou intramuscularmente (IM) ao sujeito. O anticorpo ou sua porção de ligação do antigénio pode ser administrado sozinho ou em combinação com outro agente terapêutico, p.ex., um segundo anticorpo monoclonal humano ou sua porção de ligação do antigénio. Num exemplo, o segundo anticorpo monoclonal humano ou sua porção de ligação do antigénio liga-se especificamente a um segundo isolado de HCV que difere do isolado ligado ao primeiro anticorpo. Noutro exemplo, o anticorpo é administrado em conjunto com outro agente, por exemplo, um agente antiviral. Noutro exemplo, o anticorpo é administrado em conjunto com uma gama-globulina policlonal (p.ex., gamaglobulina humana). Noutro exemplo, o anticorpo é administrado antes de, após, ou contemporaneamente com uma vacina contra o HCV.

O tratamento de humanos com anticorpos monoclonais humanos oferece várias vantagens. Por exemplo, é provável que os anticorpos sejam menos imunogénicos em humanos do que anticorpos não humanos. A terapia é também rápida porque pode ocorrer inativação do HCV logo que o anticorpo alcance locais de infecção e neutralize diretamente o HCV causador

de doença. Os anticorpos humanos também se deslocam para locais apropriados em humanos mais eficazmente do que anticorpos não humanos. Além do mais, o tratamento é específico para o HCV, e é recombinante e altamente purificado e, ao contrário de terapias tradicionais, evita o potencial de ser contaminado com agentes adventícios.

Também divulgados são métodos para fabrico de um anticorpo ou sua porção de ligação do antigénio que se liga especificamente a um HCV. O método pode envolver imunização de um animal não humano transgénico tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana com uma composição que inclui um HCV, p.ex., vírus vivo ou inativo e isolamento de um anticorpo, célula produtora de anticorpo, ou ácido nucleico codificando um anticorpo do animal. O HCV pode ser inativado, por exemplo, por tratamento químico e/ou liofilização. O método pode adicionalmente incluir avaliação da ligação do anticorpo ao HCV ou proteína E2 do HCV.

Também divulgados são métodos para fabrico dos anticorpos ou suas porções de ligação do antigénio por expressão de ácidos nucleicos codificando anticorpos humanos numa célula hospedeira (p.ex., ácidos nucleicos codificando a porção de região de ligação do antigénio de um anticorpo). Também divulgado é um hibridoma ou transfectoma incluindo os ácidos nucleicos acima mencionados.

Também divulgado é um método para fabrico de um hibridoma que expressa um anticorpo que se liga especificamente a um HCV por imunização de um animal não humano transgénico tendo um genoma que inclui um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana, com uma composição que inclui o HCV ou proteína E2 do HCV;

isolamento de esplenócitos do animal; geração de hibridomas dos esplenócitos; e seleção de um hibridoma que produz um anticorpo que se liga especificamente ao HCV ou sua proteína E2 do HCV.

Também divulgado é um antigénio compreendendo um epítopo não conformacional da proteína E2 do HCV, aminoácidos 412-464, 412-423, ou 413-420. O antigénio pode ser usado para aumento, rastreio, ou detecção da presença de um anticorpo anti-E2 do HCV ou pode ser usado como um agente em imunoterapia ativa, i.e. como uma vacina. Como uma vacina, o antigénio pode ser usado sozinho ou em combinação com um adjuvante apropriado ou hapteno, p.ex., misturado ou conjugado ou quimicamente ou geneticamente. Conjugados incluem mas não estão limitados a toxoides, partículas do tipo vírus (VLPs), e transportadores proteicos todos os quais são desenhados para intensificar a resposta imune ao antigénio da vacina. O antigénio quando usado para imunoterapia ativa pode ser também usado em combinação com imunoterapia passiva, por exemplo, com qualquer um dos anticorpos anti-E2 do HCV divulgados aqui.

Outras características e vantagens da invenção serão aparentes a partir da seguinte descrição detalhada, e a partir das reivindicações.

Breve Descrição dos Desenhos

As Figuras 1A e 1B são gráficos mostrando a ligação do anticorpo humano 95-2 (Figura 1A) e anticorpo humano 83-128 (Figura 1B) a E2-660 de genótipo 1a de HCV solúvel (triângulos) e E2-661 de genótipo 1b de HCV solúvel (quadrados). As placas de ELISA foram revestidas com 2 µg/mL de antigénio e sondadas com anticorpo em diluições de duas vezes. O anticorpo ligado foi detetado com

anticorpo secundário de cabra-anti-humano conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

As *Figuras 2A e 2B* são gráficos mostrando a neutralização da infecção de células Hep3B com vários pseudovírus de genótipo de HCV na presença dos anticorpos humanos 95-2, 83-128, e 17C7 (mAb humano irrelevante). Diluições de cinco vezes de anticorpo foram incubadas com cada pseudovírus do HCV durante uma hora à temperatura ambiente. A mistura vírus-anticorpo foi adicionada a células Hep3B seguida por incubação a 37°C durante 72 horas. A infecção foi quantificada com ensaio de luciferase Brightglo e lida num leitor de placas Victor3 quanto a saída de luz. Anticorpo humano contra raiva (17C7) foi usado como um controle negativo.

As *Figuras 3A e 3B* são transferências de Western mostrando ligação do anticorpo a proteína E2 expressa em mamíferos solúvel purificada (E2-661) de genótipo 1a e 1b do HCV sujeita a SDS-PAGE redutora (Figura 3A) ou não redutora (Figura 3B) seguida por transferência para membrana de PVDF. As transferências de Westerns foram realizadas com 83-128 e 95-2 monoclonais (his) com marcador anti-his, usando IgG anti-camundongo (his) e IgG anti-humana (95-2 e 83-128) conjugada com HRP com reagente de detecção quimioluminescente intensificado. O genótipo da E2 solúvel está indicado acima das transferências. O anticorpo primário usado para detecção está listado em baixo das transferências. Os marcadores de peso molecular em quilodaltons estão listados à esquerda de cada conjunto de transferências.

A *Figura 4* é uma tabela mostrando a afinidade dos anticorpos humanos 95-2 e 83-128 ao epítipo 412-423 de E2 do HCV expresso como uma proteína de fusão bacteriana. Fc

de IgG anti-humana de cabra foi acoplado por amida ao *chip* da Biacore. Os anticorpos humanos 95-2 e 83-128 foram separadamente capturados no *chip* e a proteína expressa em bactérias E2-G contendo aminoácidos 412-423 de E2 fluiu a concentrações variáveis. O *software* BIAevaluation™ foi usado para ajustar as curvas e calcular as constantes de afinidade.

A *Figura 5* é um mapa da poliproteína de HCV mostrando a localização das proteínas expressas em mamíferos E1 e E2. A poliproteína E1 e E2 está indicada no topo por uma caixa branca longa com números de aminoácido notados em cima. Os domínios transmembranares (TM) estão indicados por caixas cinzento-claras e o domínio hipervariável 1 (HVR1) de E2 está indicado por uma caixa cinzento-escura. As proteínas de mamíferos expressas a partir de constructos manipulados estão listadas em baixo como barras cinzento-escuras. Os locais de clivagem de peptidase sinal estão indicados por setas. O nome de cada proteína é seguido pelos aminoácidos codificados em parêntesis e aminoácidos totais na proteína expressa.

As *Figuras 6A* e *6B* são gráficos mostrando os resultados de ELISA de captura da lectina de trunicações C-terminais expressas em mamíferos de E2. Sobrenadantes de cultura de células contendo trunicações C-terminais expressas em mamíferos de proteínas de fusão E2 contendo aminoácidos de E2 (indicados na *Figura 7*) foram revestidos numa placa de ELISA e sondados com diluições de duas vezes de anticorpos humanos 95-2 (*Figura 6A*) e 83-128 (*Figura 6B*) e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-

camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

A *Figura 7* é um mapa mostrando proteínas expressas em bactérias abrangendo os 80 aminoácidos com terminal amino de E2. Os primeiros 80 aminoácidos da proteína E2 estão representados no topo por uma caixa branca com os números de aminoácido notados em cima. A região hipervariável 1 (HVR1) com 27 aminoácidos no terminal amino está indicada por uma caixa cinzento-escuro. As proteínas expressas a partir de constructos manipulados estão indicadas por barras cinzento-claras com nomes à esquerda da barra e números de aminoácidos para o início e fim da proteína listados em baixo da barra.

As *Figuras 8A, 8B e 8C* são gráficos mostrando a ligação dos anticorpos humanos 95-2 (*Figura 8A*) e 83-128 (*Figura 8B*) e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his) (*Figura 8C*) a pedaços expressos em bactérias dos primeiros 80 aminoácidos de E2. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos de E2 (indicadas na *figura 7*) foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de anticorpo. Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

As *Figuras 9A, 9B e 9C* são gráficos mostrando a ligação dos anticorpos humanos 95-2 (*Figura 9A*) e 83-128 (*Figura 9B*) e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his) (*Figura 9C*) a proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com mutações. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com os

aminoácidos indicados mutados para uma alanina ou não contendo nenhuma mutações (WT) foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de anticorpo. Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

A *Figura 10* é uma tabela mostrando alinhamentos dos aminoácidos 412-423 de E2 da Base de Dados de Sequências do HCV de Los Alamos apoiada pelo NIH. O código de aminoácido de uma letra para a sequência de genótipo 1a protótipo para os aminoácidos 412-423 está listado na parte superior esquerda do gráfico (1a). Quaisquer aminoácidos que sejam idênticos à sequência 1a estão indicados com um traço e o aminoácido listado para qualquer posição que seja diferente da sequência de genótipo 1a protótipo. O número de vezes que esta sequência de doze aminoácidos é encontrada na base de dados condensada está listado sob contagem e a percentagem do total está listada sob percentagem. As sequências das proteínas E2 de genótipos 1a e 1b solúveis da presente invenção estão listadas nas duas linhas superiores.

A *Figura 11* é uma tabela mostrando os aminoácidos 412-423 de E2 de outros genótipos. O código de aminoácido de uma letra para os aminoácidos 412-423 está listado para isolados que continham mudanças (sublinhado) em relação à sequência de genótipo 1a protótipo. O nome de genótipo está listado à direita seguido pelo número de acesso do Genbank em parêntesis.

As *Figuras 12A, 12B e 12C* são gráficos mostrando a ligação dos anticorpos humanos 95-2 (*Figura 12A*) e 83-128 (*Figura 12B*) e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his) (*Figura 12C*) a aminoácidos 412-423 de E2 de outros genótipos. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com a sequência do genótipo indicado foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de anticorpo. Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

A *Figura 13* ilustra a sequência H77 1a otimizada quanto ao codão E1/E2 (SEQ ID NO:27) incluindo extremidades adicionadas contendo restrições (representadas como minúscula a negrito), saliências adicionais para otimizar o corte da enzima de restrição (representadas como minúscula sublinhada), sequência de consenso de Kozak (representada como minúscula a negrito sublinhada) e codão de iniciação ATG (representado como maiúscula a negrito sublinhada).

A *Figura 14* ilustra o alinhamento da região variável da cadeia pesada de anticorpos derivados dos clones 83-128 (SEQ ID NO:1), 95-2 (SEQ ID NO:3), 95-14 (SEQ ID NO:32), 95-38 (SEQ ID NO:33), 95-25 (SEQ ID NO:34), 95-42 (SEQ ID NO:35), 95-43 (SEQ ID NO:36), 95-49 (SEQ ID NO:37), 95-54 (SEQ ID NO:38), 95-58 (SEQ ID NO:39) e 95-62 (SEQ ID NO:40) e que são reativos contra o epítopo 412-423 de glicoproteína E2-660 de HCV.

A *Figura 15* ilustra o alinhamento da região variável da cadeia leve de anticorpos derivados dos clones 83-128

(SEQ ID NO:2), 073-1 (SEQ ID NO:6), 95-2 (SEQ ID NO:4), 95-14 (SEQ ID NO:44) e 95-38 (SEQ ID NO:53).

Descrição Detalhada da Invenção

De modo a que a presente invenção possa ser mais prontamente entendida, certos termos são primeiramente definidos. Definições adicionais são apresentadas ao longo da descrição detalhada.

Definições

O termos "vírus da hepatite C", "HCV", hepatite não A e não B", ou "NANBH" são usados indistintamente aqui, e incluem qualquer "genótipo" ou "subgenótipo" (também denominado "subtipo") do virião, ou sua porção (p.ex., uma porção da proteína E2 de genótipo 1a do HCV), que é codificado pelo ARN do vírus da hepatite C ou que ocorre por variação alélica natural.

O HCV é organizado por uma região 5' não traduzida que é seguida por uma grelha de leitura aberta (ORF) que codifica cerca de 3.010 aminoácidos. A ORF estende-se do par de bases de nucleótidos 342 a 8.955 seguida por outra região não traduzida na extremidade 3'. Os aminoácidos estão subdivididos em dez proteínas na direção de 5' a 3' como se segue: C; E1; E2; NS1; NS2; NS3; NS4 (a e b); e NS5 (a e b). Estas proteínas são formadas a partir da clivagem do polipéptido maior por proteases do hospedeiro e virais. As proteínas C, E1, e E2 são estruturais e as proteínas NS1-NS5 são proteínas não estruturais. A região C codifica a proteína da nucleocápside do núcleo. E1 e E2 são proteínas do envelope glicosiladas que revestem o vírus. NS2 pode ser uma metaloproteínase de zinco. NS3 é uma helicase. NS4a funciona como um cofator de serina protease envolvido na clivagem entre NS4b e NS5a. NS5a é uma fosfoproteína de

serina cuja função é desconhecida. A região NS5b tem atividade de ARN polimerase dependente de ARN e transferase terminal.

Existem cerca de seis (6) genótipos distintos (*p.ex.*, genótipos 1, 2, 3, 4, 5, e 6) que são caracterizados por variações na proteína do núcleo e mais do que 80 subgenótipos que exibem variação adicional dentro de cada genótipo, alguns dos quais incluem: 1a; 1b; 1c; 2a; 2b; 2c; 3a; 3b; 4a; 4b; 4c; 4d; 4e; 5a; e 6a.

O termo "anticorpo" como referido aqui inclui anticorpos inteiros e qualquer fragmento de ligação do antigénio (*i.e.*, "porção de ligação do antigénio") ou sua cadeia única. Um "anticorpo" refere-se a uma glicoproteína compreendendo pelo menos duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interligadas por ligações de dissulfeto, ou uma sua porção de ligação do antigénio. Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável da cadeia pesada (abreviada aqui como V_H) e uma região constante da cadeia pesada. A região constante da cadeia pesada é compreendida por três domínios, C_{H1} , C_{H2} e C_{H3} . Cada cadeia leve é compreendida por uma região variável da cadeia leve (abreviada aqui como V_L) e uma região constante da cadeia leve. A região constante da cadeia leve é compreendida por um domínio, C_L . As regiões V_H e V_L podem ser adicionalmente subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinadoras da complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são mais conservadas, denominadas regiões *framework* (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, arranjadas a partir do terminal amino ao terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. As regiões variáveis das cadeias pesada e leve contêm um domínio de ligação que interatua com um antigénio. As regiões constantes dos anticorpos

podem mediar a ligação da imunoglobulina a tecidos ou fatores do hospedeiro, incluindo várias células do sistema imune (p.ex., células efectoras) e o primeiro componente (Clq) do sistema complemento clássico.

O termo "porção de ligação do antígeno" de um anticorpo (ou simplesmente "porção de anticorpo"), como usado aqui, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a um antígeno (p.ex., HCV). Mostrou-se que a função de ligação ao antígeno de um anticorpo pode ser realizada por fragmentos de um anticorpo de comprimento total. Exemplos de fragmentos de ligação englobados dentro do termo "porção de ligação do antígeno" de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios V_L , V_H , C_L e C_{H1} ; (ii) um fragmento $F(ab')_2$, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados por uma ponte de dissulfeto na região de charneira; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e C_{H1} ; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios V_L e V_H de um único braço de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward et al, (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste num domínio V_H ; e (vi) uma região determinadora da complementaridade (CDR) isolada ou (vii) uma combinação de duas ou mais CDRs isoladas que podem estar opcionalmente ligadas por um ligante sintético. Além do mais, embora os dois domínios do fragmento Fv, V_L e V_H , sejam codificados por genes separados, eles podem ser ligados, usando métodos recombinantes, por um ligante sintético que lhes permite serem fabricados como uma única cadeia de proteína na qual as regiões V_L e V_H emparelham para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFV); ver p.ex. Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; e Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad Sci. USA* 85:5879-5883). Tais

anticorpos de cadeia única também se destinam a estar englobados dentro do termo "porção de ligação do antígeno" de um anticorpo. Estes fragmentos de anticorpo são obtidos usando técnicas convencionais conhecidas daqueles com perícia na técnica, e os fragmentos são rastreados quanto à utilidade do mesmo modo como o são anticorpos intactos. Porções de ligação do antígeno podem ser produzidas por técnicas de ADN recombinante, ou por clivagem enzimática ou química de imunoglobulinas intactas.

Um "anticorpo biespecífico" ou "bifuncional" é um anticorpo híbrido artificial tendo dois pares de cadeia pesada/leve diferentes e dois locais de ligação diferentes. Anticorpos biespecíficos podem ser produzidos por uma variedade de métodos incluindo fusão de hibridomas ou ligação de fragmentos Fab'. Ver, *p.ex.*, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

O termo "anticorpo monoclonal", como usado aqui, refere-se a um anticorpo que exhibe uma única especificidade de ligação e afinidade para um epítopo particular. Conformemente, o termo "anticorpo monoclonal humano" refere-se a um anticorpo que exhibe uma única especificidade de ligação e que tem regiões variável e constante derivadas de sequências de imunoglobulinas de linha germinativa humana. Numa forma de realização, anticorpos monoclonais humanos são produzidos por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não humano transgênico, *p.ex.*, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humana e um transgene de cadeia leve humana fundidos com uma célula imortalizada.

O termo "anticorpo humano recombinante", como usado aqui, inclui todos os anticorpos humanos que são preparados, expressos, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como (a) anticorpos isolados de um animal (p.ex., um camundongo) que é transgênico quanto ao gene de imunoglobulina humana ou um hibridoma preparado a partir deles, (b) anticorpos isolados de uma célula hospedeira transformada para expressar o anticorpo, p.ex., de um transfectoma, (c) anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatoriais recombinantes, e (d) anticorpos preparados, expressos, criados ou isolados por quaisquer outros meios que envolvem *splicing* de sequências de gene de imunoglobulina humana a outras sequências de ADN. Tais anticorpos humanos recombinantes têm regiões variável e constante derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Em certas formas de realização, no entanto, tais anticorpos humanos recombinantes podem ser sujeitos a mutagénese *in vitro* (ou, quando é usado um animal transgênico quanto a sequências de Ig humana, mutagénese somática *in vivo*) e assim sendo as sequências de aminoácidos das regiões V_H e V_L dos anticorpos recombinantes são sequências que, embora derivadas de e relacionadas com sequências de V_H e V_L da linha germinativa humana, podem não existir naturalmente dentro do repertório da linha germinativa de anticorpos humanos *in vivo*.

O termo "anticorpo humano" inclui anticorpos humanos tendo regiões variável e constante (se presentes) de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (p.ex., mutações introduzidas por mutagénese aleatória ou sítio-específica

in vitro ou por mutação somática *in vivo*) (ver, Lonberg, N. *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859); Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci* 764:536-546). No entanto, o termo "anticorpo humano" não inclui anticorpos nos quais as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outra espécie de mamíferos, tal como um camundongo, foram enxertadas em sequências *framework* humanas (*i.e.*, anticorpos humanizados).

Como usado aqui, um "anticorpo heterólogo" é definido em relação ao organismo não humano transgênico produzindo um tal anticorpo. Este termo refere-se a um anticorpo tendo uma sequência de aminoácidos ou uma sequência de ácido nucleico codificante correspondendo àquela encontrada num organismo não consistindo no animal não humano transgênico, e geralmente de uma espécie sem ser aquela do animal não humano transgênico.

Um "anticorpo isolado", como usado aqui, destina-se a referir-se a um anticorpo que está substancialmente isento de outros anticorpos tendo diferentes especificidades antigénicas (*p.ex.*, um anticorpo isolado que se liga especificamente ao HCV está substancialmente isento de anticorpos que se ligam especificamente a antigénios sem ser HCV). Adicionalmente, um anticorpo isolado está tipicamente substancialmente isento de outro material celular e/ou químicos. Numa forma de realização da invenção, uma combinação de anticorpos monoclonais "isolados" tendo diferentes especificidades de HCV é combinada numa composição bem definida.

O termo "epítopo" ou "determinante antigénico" refere-se a um local num antígeno ao qual uma imunoglobulina ou anticorpo se liga especificamente (*p.ex.*, E1 ou E2 de HCV, por exemplo, aminoácidos 412-464 de E2). Os epítopos podem ser formados a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos por moldagem terciária de uma proteína. Os epítopos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente retidos após exposição a solventes desnaturantes, ao passo que epítopos formados por moldagem terciária são tipicamente perdidos após tratamento com solventes desnaturantes. Um epítopo inclui tipicamente pelo menos 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ou 15 aminoácidos numa conformação espacial única. Métodos de determinação da conformação espacial de epítopos incluem técnicas na técnica e aqueles descritos aqui, por exemplo, cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear bidimensional. Ver, *p.ex.*, *Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996). Numa forma de realização preferencial, o epítopo (ou determinante antigénico) funciona como um epítopo linear na medida em que, mesmo quando no contexto de um segmento de aminoácidos maior, *p.ex.*, proteína tendo estrutura tridimensional, não é observado nenhum aumento na afinidade para o epítopo/determinante antigénico.

Como usado aqui, os termos "ligação específica", "ligação seletiva", "liga-se seletivamente", e "liga-se especificamente" referem-se a ligação de um anticorpo a um epítopo num antígeno pré-determinado. Tipicamente, o anticorpo liga-se com uma afinidade (K_D) aproximadamente menor do que 10^{-7} M, tal como aproximadamente menor do que 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou mesmo menor quando determinada por tecnologia de ressonância de plasmão de superfície (SPR) num instrumento BIACORE 3000 usando HCV recombinante

como o analito e o anticorpo como o ligando, e liga-se ao antígeno pré-determinado com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior do que a sua afinidade para ligação a um antígeno não específico (*p.ex.*, BSA, caseína) sem ser o antígeno pré-determinado ou um antígeno intimamente relacionado. As frases "um anticorpo reconhecendo um antígeno" e "um anticorpo específico para um antígeno" são usadas indistintamente aqui com o termo "um anticorpo que se liga especificamente a um antígeno".

Também englobados pela presente invenção são anticorpos que se ligam aos mesmos epítomos do que os anticorpos humanos descritos aqui, *i.e.*, anticorpos que competem pela ligação ao HCV. Anticorpos que reconhecem o mesmo epítopo podem ser identificados usando técnicas de rotina tais como um imunoensaio, por exemplo, mostrando a capacidade de um anticorpo em bloquear a ligação de outro anticorpo a um antígeno alvo, *i.e.*, um ensaio de ligação competitiva. A ligação competitiva é determinada num ensaio no qual a imunoglobulina sob teste inibe a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum, tal como HCV. Numerosos tipos de ensaios de ligação competitiva são conhecidos, por exemplo: radioimunoensaio de direto ou indireto de fase sólida (RIA), imunoensaio de enzima direto ou indireto de fase sólida (EIA), ensaio de competição em sanduíche (ver Stahli *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); EIA de biotina-avidina direto de fase sólida (ver Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); ensaio marcado direto de fase sólida, ensaio em sanduíche marcado direto de fase sólida (ver Harlow e Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); RIA marcado direto de fase sólida usando marcador I-125 (ver Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); EIA de biotina-avidina direta de fase sólida (Cheung *et al.*,

Virology 176:546 (1990)); e RIA marcado direto (Moldenhauer et al., *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)). Tipicamente, um tal ensaio envolve o uso de antígeno purificado ligado a uma superfície sólida ou células carregando qualquer um destes, uma imunoglobulina de teste não marcada e uma imunoglobulina de referência marcada. A inibição competitiva é medida por determinação da quantidade de marcador ligado à superfície sólida ou células na presença da imunoglobulina de teste. Usualmente, a imunoglobulina de teste está presente em excesso. Usualmente, quando um anticorpo competitivo está presente em excesso, ele inibirá a ligação específica de um anticorpo de referência a um antígeno comum por pelo menos 50-55%, 55-60%, 60-65%, 65-70%, 70-75% ou mais.

O termo " K_D " como usado aqui destina-se a referir-se à constante de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular. Tipicamente, os anticorpos humanos da invenção ligam-se ao HCV com uma constante de equilíbrio de dissociação (K_D) menor do que aproximadamente 10^{-7} M, tal como menor do que aproximadamente 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou mesmo menor quando determinada por tecnologia de ressonância de plasmão de superfície (SPR) num instrumento BIACORE 3000 usando HCV recombinante como o analito e o anticorpo como o ligando.

O termo " K_{off} ", como usado aqui, destina-se a referir-se à constante de dissociação para a dissociação de um anticorpo do complexo anticorpo/antígeno.

O termo "EC50", como usado aqui, refere-se à concentração de um anticorpo ou sua porção de ligação do antígeno, que induz uma resposta, num ensaio *in vitro* ou *in vivo*, que é

50% da resposta máxima, *i.e.*, a meio caminho entre a resposta máxima e a linha de base.

Como usado aqui, "isotipo" refere-se à classe de anticorpos (*p.ex.*, IgM ou IgG1) que é codificada por genes da região constante da cadeia pesada. Numa forma de realização, um anticorpo monoclonal humano da invenção é do isotipo IgG1. Noutra forma de realização, um anticorpo monoclonal humano da invenção é do isotipo IgG2.

Como usado aqui, os termos "neutraliza HCV", "inibe HCV", e "bloqueia HCV" são usados indistintamente para se referirem à capacidade de um anticorpo da invenção de prevenir o HCV de infetar uma dada célula.

Como usado aqui, o termo "epítipo não conformacional" refere-se a um epítipo linear que é tipicamente compreendido por uma sequência de aminoácidos contíguos que é suficiente para ligação com um anticorpo capaz de se ligar a um tal epítipo. Isto é em contraste com um epítipo conformacional, que requiere sequências de aminoácidos descontínuos para formar uma estrutura tridimensional de modo a que ocorra ligação entre o epítipo e o anticorpo. Um epítipo linear pode ser também distinguido de um epítipo conformacional na medida em que sob condições desnaturantes (*p.ex.*, num ensaio de imunotransferência como descrito aqui), o epítipo pode estar ainda ligado a um anticorpo que reconhece um tal epítipo. Numa forma de realização, a invenção proporciona um epítipo de E2 de HCV que é linear, por exemplo, não conformacional, por exemplo, compreendendo os resíduos 412 a 423, ou consistindo nos resíduos 412-423. Numa forma de realização relacionada, os anticorpos da invenção ligam-se especificamente a um tal epítipo linear e não um epítipo conformacional. Ainda adicionalmente, a invenção proporciona um tal epítipo linear como adequado

para o uso no desenvolvimento de vacinas, o aumento de anticorpos para ele, e/ou para o uso em imunoterapia ativa sozinho ou em combinação com imunoterapia passiva.

Como usada aqui, "troca de isotipos" refere-se ao fenómeno pelo qual a classe, ou isotipo, de um anticorpo muda de uma classe de Ig para uma das outras classes de Ig.

Como usado aqui, "isotipo não trocado" refere-se à classe isotípica de cadeia pesada que é produzida quando não teve lugar nenhuma troca de isotipos; o gene C_H codificando o isotipo não trocado é tipicamente o primeiro gene C_H imediatamente a jusante do gene VDJ funcionalmente rearranjado. A troca de isotipos foi classificada como troca de isotipos clássica ou não clássica. A troca de isotipos clássica ocorre por eventos de recombinação que envolvem pelo menos uma região de sequência trocada no transgene. A troca de isotipos não clássica pode ocorrer por, por exemplo, recombinação homóloga entre σ_μ humano e Σ_μ humano (deleção associada a δ). Mecanismos de troca não clássica alternativos, tais como intertransgene e/ou recombinação intercromossomal, entre outros, podem ocorrer e efetuar troca de isotipos.

Como usado aqui, o termo "sequência de troca" refere-se àquelas sequências de ADN responsáveis por recombinação de troca. Uma sequência "dadora de troca", tipicamente, uma região de troca μ , estará 5' (*i.e.*, a montante) do região do constructo a ser eliminada durante a recombinação de troca. A região "aceitadora de troca" estará entre a região do constructo a ser eliminada e a região constante de substituição (*p.ex.*, γ , ε , etc.). Como não existe nenhum local específico onde a recombinação ocorra sempre, a sequência de genes final não irá ser tipicamente previsível a partir do constructo.

Como usado aqui, "padrão de glicosilação" é definido como o padrão de unidades de carboidrato que estão covalentemente anexadas a uma proteína, mais especificamente a uma proteína de imunoglobulina. Um padrão de glicosilação de um anticorpo heterólogo pode ser caracterizado como sendo substancialmente similar a padrões de glicosilação que ocorrem naturalmente em anticorpos produzidos pela espécie do animal não humano transgênico, quando um de perícia vulgar na técnica reconheceria o padrão de glicosilação do anticorpo heterólogo como sendo mais similar ao referido padrão de glicosilação na espécie do animal não humano transgênico do que a espécie da qual os genes C_H do transgene foram derivados.

O termo "que ocorre naturalmente" como usado aqui como aplicado a um objeto refere-se ao facto de que um objeto pode ser encontrado na natureza. Por exemplo, uma sequência de polipéptidos ou polinucleótidos que está presente num organismo (incluindo vírus) que pode ser isolada de uma fonte na natureza e que não foi intencionalmente modificada pelo homem no laboratório ocorre naturalmente.

O termo "rearranjado" como usado aqui refere-se a uma configuração de um locus de imunoglobulina de cadeia pesada ou cadeia leve em que um segmento V está posicionado imediatamente adjacente a um segmento D-J ou J numa conformação codificando essencialmente um domínio V_H ou V_L completo, respetivamente. Um locus de gene de imunoglobulina rearranjado pode ser identificado por comparação com ADN da linha germinativa; um locus rearranjado terá pelo menos um elemento de homologia de heptâmero/nonâmero recombinado.

O termo "configuração não rearranjada" ou "da linha germinativa" como usado aqui em referência a um segmento V

refere-se à configuração em que o segmento V não está recombinação de modo a estar imediatamente adjacente a um segmento D ou J.

O termo "molécula de ácido nucleico", como usado aqui, destina-se a incluir moléculas de ADN e moléculas de ARN. Uma molécula de ácido nucleico pode ter cadeia única ou cadeia dupla, mas preferencialmente é ADN de cadeia dupla. O termo "molécula de ácido nucleico isolada", como usado aqui em referência a ácidos nucleicos codificando anticorpos ou porções de anticorpo (p.ex., V_H , V_L , CDR3) que se ligam ao HCV, destina-se a referir-se a uma molécula de ácido nucleico na qual as sequências de nucleótidos codificando o anticorpo ou porção de anticorpo estão isentas de outras sequências de nucleótidos codificando anticorpos que se ligam a antígenos sem ser HCV, cujas outras sequências podem flanquear naturalmente o ácido nucleico em ADN genómico humano.

Também divulgadas aqui são "modificações de sequência conservativas" das sequências apresentadas nas SEQ ID NOS da presente invenção, i.e., modificações de sequência de nucleótidos e aminoácidos que não revogam a ligação do anticorpo codificado pela sequência de nucleótidos ou contendo a sequência de aminoácidos, ao antígeno. Tais modificações de sequência conservativas incluem substituições, adições e deleções de nucleótidos e aminoácidos. Por exemplo, podem ser introduzidas modificações por técnicas padrão conhecidas na técnica, tais como mutagénese sítio-dirigida e mutagénese mediada por RCP. As substituições de aminoácidos conservativas incluem aquelas nas quais o resíduo de aminoácido é substituído por um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácidos tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica.

Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (p.ex., lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (p.ex., ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (p.ex., glicina, asparagina, glutamina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptofano), cadeias laterais não polares (p.ex., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadeias laterais beta-ramificadas (p.ex., treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (p.ex., tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina). Assim sendo, um resíduo de aminoácido não essencial previsto num anticorpo humano anti-HCV é preferencialmente substituído por outro resíduo de aminoácido da mesma família de cadeias laterais. Métodos de identificação de substituições conservativas de nucleótidos e aminoácidos que não eliminam a ligação do antigénio são bem conhecidas na técnica (ver, p.ex., Brummell *et al.*, *Biochem.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi *et al.* *Protein Eng.* 12(10):879-884 (1999); e Burks *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417 (1997)). Alternativamente, podem ser introduzidas mutações aleatoriamente ao longo de toda a ou parte da sequência codificante do anticorpo anti-HCV, tal como por mutagenese por saturação, e os anticorpos anti-HCV modificados resultantes podem ser rastreados quanto à atividade de ligação.

Uma "sequência de consenso" é uma sequência formada a partir dos aminoácidos (ou nucleótidos) que ocorrem com mais frequência numa família de sequências relacionadas (Ver p.ex., Winnaker, *From Genes to Clones* (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha 1987)). Numa família de proteínas, cada posição na sequência de consenso é ocupada pelo aminoácido que ocorre com mais frequência

nessa posição na família. Se dois aminoácidos ocorrerem igualmente frequentemente, qualquer um pode ser incluído na sequência de consenso. Um "*framework* de consenso" de uma imunoglobulina refere-se a uma região *framework* na sequência de imunoglobulina de consenso.

Como ilustrado na Figura 14, uma sequência de consenso para as CDRs da região variável da cadeia pesada é derivada por alinhamento ótimo das sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada dos anticorpos que são reativos contra o epítipo 412-423 da glicoproteína E2-660 do HCV. Por exemplo, os anticorpos derivados dos clones 83-128 (SEQ ID NO:1), 95-2 (SEQ ID NO:3), 95-14 (SEQ ID NO:32), 95-38 (SEQ ID NO:33), 95-25 (SEQ ID NO:34), 95-42 (SEQ ID NO:35), 95-43 (SEQ ID NO:36), 95-49 (SEQ ID NO:37), 95-54 (SEQ ID NO:38), 95-58 (SEQ ID NO:39) e 95-62 (SEQ ID NO:40) são otimamente alinhados para obter as sequências de consenso para CDR1, CR2 e CDR3. Conformemente, descobriu-se que a sequência de consenso para CDR1 da região variável da cadeia pesada era "1YGMH", apresentada em SEQ ID NO:87, onde "1" representa um resíduo de aminoácido pequeno e polar. Descobriu-se que a sequência de consenso para CDR2 da região variável da cadeia pesada era "VIWDX7NXYYADS1516G", mostrada em SEQ ID NO:88, onde "X" pode ser qualquer resíduo de aminoácido, "7" representa um resíduo de aminoácido polar pequeno e polar, "15" representa um resíduo de aminoácido hidrofóbico e "16" representa um resíduo de aminoácido polar e positivamente carregado. Descobriu-se que a sequência de consenso para CDR3 da região variável da cadeia pesada era "ARDI567XR10X12IYFD17", mostrada em SEQ ID NO:89, onde "X" pode ser qualquer resíduo de aminoácido, "5" representa fenilalanina ou nenhum aminoácido, "6" representa Serina ou Treonina, "7" e "12" representam um resíduo de aminoácido hidrofóbico, "10" representa um resíduo de aminoácido

pequeno e "17" representa um resíduo de aminoácido aromático.

Similarmente, a sequência de consenso para as CDRs da região variável da cadeia leve pode ser derivada por alinhamento ótimo das sequências de aminoácidos de anticorpos reativos contra o epítopo 412-423 da glicoproteína E2-660 do HCV, como mostrado na Figura 15. Por exemplo, as sequências derivadas das regiões variáveis da cadeia leve de anticorpos derivados dos clones 83-128 (SEQ ID NO:2), 073-1 (SEQ ID NO:6), 95-2 (SEQ ID NO:4), 95-14 (SEQ ID NO:44) e 95-38 (SEQ ID NO:53) são otimamente alinhadas para obter as sequências de consenso para CDR1, CDR2 e CDR3 da região variável da cadeia leve. Descobriu-se que a sequência de consenso para CDR1 da região variável da cadeia leve era "RASQSVXSYLA", apresentada em SEQ ID NO:90, onde "X" pode ser qualquer resíduo de aminoácido. Descobriu-se que a sequência de consenso para CDR2 da região variável da cadeia leve era "DASNRAT", apresentada em SEQ ID NO:91. Descobriu-se que a sequência de consenso para CDR3 da região variável da cadeia leve era "QQRSNW7T", apresentada em SEQ ID NO:92, onde "7" representa um resíduo de aminoácido pequeno e hidrofóbico.

Para ácidos nucleicos, o termo "homologia substancial" indica que dois ácidos nucleicos, ou suas sequências designadas, quando otimamente alinhadas e comparadas, são idênticos, com inserções ou deleções de nucleótidos apropriadas, em pelo menos cerca de 80% dos nucleótidos, usualmente pelo menos cerca de 90% a 95%, e mais preferencialmente pelo menos cerca de 98% a 99,5% dos nucleótidos. Alternativamente, existe homologia substancial quando os segmentos hibridarão sob condições de hibridação seletiva com o complemento da cadeia.

A identidade percentual entre duas sequências é uma função do número de posições idênticas partilhadas pelas sequências (*i.e.*, $\text{homologia} = \# \text{ de posições idênticas} / \# \text{ total de posições} \times 100$), tomando em consideração o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo, que necessitam de ser introduzidos para alinhamento ótimo das duas sequências. A comparação de sequências e a determinação da identidade percentual entre duas sequências podem ser alcançadas usando um algoritmo matemático, como descrito nos exemplos não limitantes em baixo.

A identidade percentual entre duas sequências de nucleótidos pode ser determinada usando o programa GAP no pacote de *software* GCG, usando uma matriz NWSgapdna.CMP e um peso de intervalo de 40, 50, 60, 70, ou 80 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6. A identidade percentual entre duas sequências de nucleótidos ou aminoácidos pode ser também determinada usando o algoritmo de E. Meyers e W. Miller (*CABIOS*, 4:11-17 (1989)) o qual foi incorporado no programa ALIGN (versão 2.0), usando uma tabela de resíduos de peso PAM120, uma penalidade de comprimento de intervalo de 12 e uma penalidade de intervalo de 4. Adicionalmente, a identidade percentual entre duas sequências de aminoácidos pode ser determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch (*J. Mol. Biol.* (48):444-453 (1970)) que foi incorporado no programa GAP no pacote de *software* GCG, usando ou uma matriz Blossum 62 ou uma matriz PAM250, e um peso de intervalo de 16, 14, 12, 10, 8, 6, ou 4 e um peso de comprimento de 1, 2, 3, 4, 5, ou 6.

As sequências de ácido nucleico e proteína da presente invenção podem ser adicionalmente usadas como uma "sequência *query*" para realizar uma procura contra bases de dados públicas para, por exemplo, identificar sequências

relacionadas. Tais procuras podem ser realizadas usando os programas NBLAST e XBLAST (versão 2.0) de Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10. Podem ser realizadas procuras de nucleótidos BLAST com o programa NBLAST, pontuação = 100, comprimento de palavra = 12 para obter sequências de nucleótidos homólogas com as moléculas de ácido nucleico da invenção. Podem ser realizadas procuras de proteína BLAST com o programa XBLAST, pontuação = 50, comprimento de palavra = 3 para obter sequências de aminoácidos homólogas com as moléculas de proteína da invenção. Para obter alinhamentos com intervalos para propósitos de comparação, pode ser utilizado Gapped BLAST como descrito em Altschul et al., (1997) *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402. Quando se utilizam programas BLAST e Gapped BLAST, podem ser usados os parâmetros padrão dos respectivos programas (p.ex., XBLAST e NBLAST).

Os ácidos nucleicos podem estar presentes em células inteiras, num lisato de célula, ou numa forma parcialmente purificada ou substancialmente pura. Um ácido nucleico é "isolado" ou "tornado substancialmente puro" quando purificado de outros componentes celulares ou outros contaminantes, p.ex., outros ácidos nucleicos ou proteínas celulares, por técnicas padrão, incluindo tratamento alcalino/SDS, banda de CsCl, cromatografia em coluna, eletroforese em gel de agarose e outros bem conhecidos na técnica. Ver, F. Ausubel, et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, Nova Iorque (1987).

As composições de ácido nucleico da presente invenção, embora frequentemente numa sequência nativa (exceto para locais de restrição modificados e similares), de cADN, genómico ou suas misturas, podem estar mutadas, de acordo

com técnicas padrão para proporcionar sequências de gene. Para sequências codificantes, estas mutações podem afetar a sequência de aminoácidos como desejado. Em particular, sequências de ADN substancialmente homólogas com ou derivadas de trocas de V, D, J nativas, constantes, e outras tais sequências descritas aqui são contempladas (onde "derivado" indica que uma sequência é idêntica a ou modificada de outra sequência).

Um ácido nucleico está "operacionalmente ligado" quando é colocado numa relação funcional com outra sequência de ácido nucleico. Por exemplo, um promotor ou intensificador está operacionalmente ligado a uma sequência codificante se afeta a transcrição da sequência. No que diz respeito a sequências reguladoras da transcrição, operacionalmente ligado significa que as sequências de ADN estando ligadas são contíguas e, onde necessário para unir duas regiões codificantes de proteínas, contíguas e em grelha de leitura. Para sequências de troca, operacionalmente ligado indica que as sequências são capazes de efetuar recombinação de troca.

O termo "vetor", como usado aqui, destina-se a referir-se a uma molécula de ácido nucleico capaz de transportar outro ácido nucleico ao qual foi ligado. Um tipo de vetor é um "plasmídeo", que se refere a um anel de ADN de cadeia dupla circular no qual segmentos de ADN adicionais podem ser ligados. Outro tipo de vetor é um vetor viral, em que segmentos de ADN adicionais podem ser ligados no genoma viral. Certos vetores são capazes de replicação autónoma numa célula hospedeira na qual são introduzidos (*p.ex.*, vetores bacterianos tendo uma origem de replicação bacteriana e vetores de mamífero episomais). Outros vetores (*p.ex.*, vetores de mamífero não episomais) podem ser integrados no genoma de uma célula hospedeira após

introdução na célula hospedeira, e são desse modo replicados em conjunto com o genoma hospedeiro. Além do mais, certos vetores são capazes de direcionar a expressão de genes aos quais eles estão operacionalmente ligados. Tais vetores são referidos aqui como "vetores de expressão recombinante" (ou simplesmente, "vetores de expressão"). Em geral, vetores de expressão de utilidade em técnicas de ADN recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. Na presente especificação, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados indistintamente pois o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor. No entanto, a invenção destina-se a incluir tais outras formas de vetores de expressão, tais como vetores virais (p.ex., retrovírus com replicação defeituosa, adenovírus e vírus adeno-associados), que servem funções equivalentes.

O termo "célula hospedeira recombinante" (ou simplesmente "célula hospedeira"), como usado aqui, destina-se a referir-se a uma célula na qual um vetor de expressão recombinante foi introduzido. Deve ser entendido que tais termos destinam-se a referir-se somente à célula objeto particular mas à descendência de uma tal célula. Porque certas modificações podem ocorrer em gerações sucessivas devido a ou mutação ou influências ambientais, tal descendência pode não, de facto, ser idêntica à célula progenitora, mas está ainda incluída dentro do âmbito do termo "célula hospedeira" como usado aqui.

Os termos "trata", "tratar", e "tratamento", como usados aqui, referem-se a medidas terapêuticas ou preventivas descritas aqui. Os métodos de "tratamento" empregam administração a um sujeito, com necessidade de tal tratamento, de um anticorpo da presente invenção, por exemplo, um sujeito tendo um distúrbio mediado pelo HCV ou um sujeito que pode em última instância adquirir um tal

distúrbio, de modo a prevenir, curar, atrasar, reduzir a gravidade de, ou melhorar um ou mais sintomas do distúrbio ou distúrbio recorrente, ou de modo a prolongar a sobrevivência de um sujeito para além daquela esperada na ausência de tal tratamento.

O termo "distúrbio mediado pelo HCV", como usado aqui, inclui estados e/ou sintomas de doença associados a infecção pelo HCV. Em geral, o termo "distúrbio mediado pelo HCV" refere-se a qualquer distúrbio, o início, progresso ou a persistência dos sintomas que requerem a participação do HCV. Distúrbios mediados pelo HCV exemplares incluem, mas não estão limitados a, por exemplo, cirrose e cancro do fígado.

O termo "dose eficaz" ou "dosagem eficaz" é definido como uma quantidade suficiente para alcançar ou pelo menos parcialmente alcançar o efeito desejado. O termo "dose terapeuticamente eficaz" é definido como uma quantidade suficiente para curar ou pelo menos parcialmente parar a doença e suas complicações num paciente já sofrendo da doença. Quantidades eficazes para este uso dependerão da gravidade do distúrbio sendo tratado e do estado geral do sistema imune do paciente.

O termo "paciente" inclui sujeitos humanos e outro mamíferos que recebam tratamento profilático ou terapêutico.

Como usado aqui, o termo "sujeito" inclui qualquer animal humano ou não humano. Por exemplo, os métodos e composições da presente invenção podem ser usados para tratar um sujeito com uma doença inflamatória, tal como artrite, *p.ex.*, artrite reumatoide. O termo "animal não humano" inclui todos os vertebrados, *p.ex.*, mamíferos e não

mamíferos, tais como primatas não humanos, ovelha, cão, vaca, galinhas, anfíbios, répteis, etc.

A não ser que definido de outro modo, todos os termos técnicos e científicos têm o mesmo significado como comumente entendido por um de perícia vulgar na técnica à qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalente àqueles descritos aqui possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos em baixo. Em caso de conflito, a presente especificação, incluindo definições, prevalecerá. Adicionalmente, os materiais, métodos, e exemplos são ilustrativos somente e não se destinam a ser limitantes.

Vários aspetos da invenção são descritos em detalhe adicional nas seguintes subsecções.

Visão Global

O HCV causa patologias de hepatócitos fatais em humanos. Proporcionados aqui são métodos e composições para tratamento e prevenção de animais infetados pelo HCV, em particular, sujeitos humanos, mais particularmente. As composições incluem anticorpos que reconhecem a proteína E2 do HCV, ou sua porção. Em particular, são proporcionados anticorpos monoclonais completamente humanos recombinantes. Em certas formas de realização, estes anticorpos monoclonais humanos são produzidos em camundongos expressando segmentos de gene de imunoglobulina humana (descritos em baixo). Combinações de anticorpos anti-HCV são também proporcionados.

Os novos métodos incluem administração de anticorpos (e suas porções de ligação do antigénio) que se ligam ao HCV num sujeito para inibir doença mediada pelo HCV e inibir

infecção pelo HCV e suas sequelas, por exemplo, cirrose do fígado e/ou cancro do fígado. Noutros exemplos, combinações de anticorpos anti-HCV (p.ex., anticorpos monoclonais da proteína E2 anti-HCV) podem ser administradas para inibir doença mediada pelo HCV. Os anticorpos monoclonais humanos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outras terapias.

1. Produção de Anticorpos Humanos para HCV

A presente invenção engloba um anticorpo completamente humano que se liga ao HCV, p.ex., HCV humano. Um anticorpo monoclonal humano exemplar que se liga ao HCV é 83-128. Outros anticorpos monoclonais humanos que se ligam ao HCV incluem 95-2, 95-14, 95-38, e 073-1.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas conhecidas, tal como a técnica de hibridação de células somáticas padrão descrita por Kohler e Milstein, *Nature* 256: 495 (1975). Embora sejam preferenciais procedimentos de hibridação de células somáticas, em princípio, podem ser também empregues outras técnicas para produção de anticorpos monoclonais, p.ex., transformação viral ou oncogénica de linfócitos B, técnica de exibição de fagos usando bibliotecas de genes de anticorpos humanos.

O sistema animal preferencial para geração de hibridomas que produzem anticorpos monoclonais humanos da invenção é o sistema de murino. A produção de hibridoma no camundongo é bem conhecida na técnica, incluindo protocolos de imunização e técnicas para isolamento e fusão de esplenócitos imunizados.

Numa forma de realização, são gerados anticorpos monoclonais humanos direcionados contra HCV usando camundongos transgênicos carregando partes do sistema imune humano em vez do sistema de camundongo. Numa forma de realização, a invenção emprega camundongos transgênicos, referidos aqui como "camundongos HuMAb" que contêm um *miniloci* do gene da imunoglobulina humana que codifica sequências de imunoglobulina de cadeia pesada (μ e γ) e cadeia leve κ não arranjadas, em conjunto com mutações direcionadas que inativam os *loci* de cadeia μ e κ endógenos (Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Conformemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo, e em resposta à imunização, os transgenes da cadeia pesada e leve humana introduzidos sofrem troca de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais de IgG κ de elevada afinidade (Lonberg, N. et al. (1994), *supra*; revisto em Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49- 101; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, e Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad. Sci* 764:536-546). A preparação de camundongos HuMAb é descrita em detalhe na Secção II em baixo e em Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad Sci USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4: 117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Lonberg et al, (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; Lonberg, N. e Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93; Harding, F. e Lonberg, N. (1995) *Ann. NY. Acad Sci* 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:

845-851. Ver adicionalmente, Patentes dos E.U.A. Nos. 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; e 5,770,429; todos em nome de Lonberg e Kay, e GenPharm International; Patente dos E.U.A. No. 5,545,807 em nome de Surani *et al.*; Publicação Internacional Nos. WO 98/24884, publicada em 11 junho, 1998; WO 94/25585, publicada em 10 novembro, 1994; WO 93/1227, publicada em 24 junho, 1993; WO 92/22645, publicada em 23 dezembro, 1992; WO 92/03918, publicada em 19 março, 1992.

Imunizações

Para gerar anticorpos monoclonais completamente humanos para HCV, camundongos transgênicos contendo genes de imunoglobulina humana {p.ex., HCo12, HCo7} podem ser imunizados com uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno de HCV e/ou células expressando HCV, como descrito, por exemplo, por Lonberg *et al.* (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild *et al.* (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 e WO 98/24884. Como descrito aqui, camundongos HuMAb são imunizados ou com proteínas de HCV recombinantes ou linhas de células expressando HCV como imunogênicos. Alternativamente, os camundongos podem ser imunizados com ADN codificando HCV. Preferencialmente, os camundongos terão 6-16 semanas de idade aquando da primeira infusão. Por exemplo, uma preparação purificada ou enriquecida (10-100 µg) do antígeno de HCV recombinante pode ser usada para imunizar os camundongos HuMAb intraperitonealmente. No caso de as imunizações usando uma preparação purificada ou enriquecida do antígeno não resultarem em anticorpos, os camundongos podem ser também imunizados com células expressando proteínas de HCV, p.ex., uma linha de células, para promover respostas imunes.

Linhas de células exemplares incluem linhas de células de CHO e Raji estáveis sobre-expressando HCV.

A experiência cumulativa com vários antígenos mostrou que os camundongos transgênicos HuMAb respondem melhor quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) ou subcutaneamente (SC) com antígeno em adjuvante de Freund completo, seguido por imunizações JIVSC a cada duas semanas (até um total de 10) com antígeno em adjuvante de Freund incompleto. A resposta imune pode ser monitorizada ao longo do decurso do protocolo de imunização com amostras do plasma sendo obtidas por hemorragias retro-orbitais. O plasma pode ser rastreado por ELISA (como descrito em baixo), e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina humana anti-HCV podem ser usados para as fusões. Os camundongos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço.

Vacinas Baseadas em Antígeno e Seus Conjugados

Também divulgado é um epítipo não conformacional conservado da glicoproteína do envelope E2 do HCV, por exemplo, aminoácidos 412-464, 412-423, ou 413-420 da proteína E2 do HCV, para uso em imunização ativa contra infecção pelo HCV. Este epítipo pode ser usado sozinho ou ser modificado, p.ex., para intensificar uma resposta imune ao epítipo.

Conjugados de antígeno quimicamente construídos podem ser preparados usando uma variedade de reagentes reticulantes bem conhecidos e prontamente disponíveis. Estes reagentes reticulantes podem ser compostos homofuncionais ou heterofuncionais, tais como, p.ex., SPDP, SATA, SMCC, DTNB, que formam ligações covalentes com diferentes cadeias laterais de aminoácidos e carboidratos reativas no antígeno selecionado.

O transportador pode ser selecionado do grupo consistindo em OMPC (Complexo de Proteína da Membrana Exterior de *Neisseria meningitidis*), BSA (albumina de soro bovino), OVA (ovalbumina), THY (tiroglobulina bovina), KLH (hemocianina de lapa californiana), e TT (proteína toxoide do tétano). Outros transportadores que têm a capacidade de se automontarem em partículas do tipo vírus (VLP's) incluem HbSAg (proteína do antígeno de superfície) e HBcAg (proteína do antígeno do núcleo) de vírus da Hepatite B, proteínas da cápside do rotavírus, a proteína L1 do vírus do papiloma humano, partículas do vírus da Hepatite E, proteína do vírus do políoma e proteínas estruturais do vírus do papiloma bovino (ver *J. of Phar. Sciences* 95:70-79 (2005)).

A conjugação pode ser alcançada geneticamente ou quimicamente, por exemplo, usando um ou mais de acoplamento de maleimida/tiol, acoplamento de bromoacetamida/tiol, e reticulação seletiva quanto à histidina. A conjugação pode ser alcançada usando um reticulante selecionado do grupo consistindo em um ou mais de 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (SSMCC), éster de N-maleimidobenzoílo-N-hidroxissuccinimida (MBS), glutaraldeído, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDCI), Bis-diazobenzidina (BDB); tiolactona de homocisteína de N-acetilo (NAHT), e éster de N-[ε-maleimidocaproíloxi]sulfosuccinimida (SEMCS). Numa forma de realização, o reticulante é um éster de N-[ε-maleimidocaproíloxi]sulfosuccinimida (SEMCS).

Geração de Hibridomas Produzindo Anticorpos Monoclonais Humanos para HCV

Para gerar hibridomas produzindo anticorpos monoclonais humanos para HCV, esplenócitos e células de linfonodos de

camundongos imunizados podem ser isolados e fundidos com uma linha de células imortalizada apropriada, tal como uma linha de células de mieloma de camundongo. Os hibridomas resultantes podem ser depois rastreados quanto à produção de anticorpos específicos do antigénio. Por exemplo, suspensões de célula única de linfócitos esplénicos de camundongos imunizados podem ser fundidas com células de mieloma de camundongo não secretoras SP2/0-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com PEG a 50% (p/v). As células podem ser plaqueadas a aproximadamente 1×10^5 em placa de microtitulação de fundo plano, seguida por uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo para além dos reagentes usuais Soro de Clone fetal a 10%, e 1X HAT (Sigma). Após aproximadamente duas semanas, as células podem ser cultivadas em meio no qual o HAT é substituído por HT. Os poços individuais podem ser depois rastreados por ELISA quanto a anticorpos IgM e IgG monoclonais humanos anti-HCV, ou quanto à ligação à superfície de células expressando proteínas de HCV, *p.ex.*, uma linha de células CHO expressando HCV, por FLISA (ensaio imunoabsorvente ligado a fluorescência). Logo que ocorra crescimento extensivo de hibridoma, pode ser observado meio usualmente após 10-14 dias. Os hibridomas secretando anticorpo podem ser substituídos, rastreados novamente, e se ainda positivos quanto a IgG humana, os anticorpos monoclonais anti-HCV podem ser subclonados pelo menos duas vezes por diluição limitada. Os subclones estáveis podem ser depois cultivados *in vitro* para gerar anticorpo em meio de cultura de tecidos para caracterização.

Geração de Transfectomas Produzindo Anticorpos Monoclonais Humanos para HCV

Podem ser também produzidos anticorpos humanos num transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma

combinação de técnicas de ADN recombinante e métodos de transfecção de genes como é bem conhecido na técnica (Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202).

Por exemplo, numa forma de realização, o(s) gene(s) de interesse, *p.ex.*, genes de anticorpo humano, pode(m) ser ligado(s) num vetor de expressão tal como um plasmídeo de expressão eucariótica tal como usado por sistema de expressão de genes GS divulgado em WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338 841 ou outros sistemas de expressão bem conhecidos na técnica. O plasmídeo purificado com os genes de anticorpo clonados podem ser introduzidos em células hospedeiras eucarióticas tais como células de CHO ou células NSO ou alternativamente outras células eucarióticas como uma célula derivada de planta, células de fungos ou levedura. O método usado para introduzir estes genes pode ser métodos descritos na técnica tais como eletroporação, lipofectina, lipofectamina ou outro. Após introdução destes genes de anticorpo nas células hospedeiras, as células expressando o anticorpo podem ser identificadas e selecionadas. Estas células representam os transfectomas que podem ser depois amplificados quanto ao seu nível de expressão e aumentados quanto à escala para produzir anticorpos. Os anticorpos recombinantes podem ser isolados e purificados a partir destes sobrenadantes e/ou células de cultura.

Alternativamente, estes genes de anticorpo clonados podem ser expressos em outros sistemas de expressão tais como *E. coli* ou em organismos completos ou podem ser sinteticamente expressos.

Uso de Sequências de Anticorpo Parciais para Expressar Anticorpos Intactos

Os anticorpos interatuam com antígenos alvo predominantemente através de resíduos de aminoácidos que estão localizados nas seis regiões determinadoras da complementaridade (CDRs) da cadeia pesada e leve. Por esta razão, as sequências de aminoácidos dentro das CDRs são mais diversas entre anticorpos individuais do que sequências fora das CDRs. Porque as sequências de CDR são responsáveis pela maioria das interações anticorpo-antígeno, é possível expressar anticorpos recombinantes que mimetizam as propriedades de anticorpos que ocorrem naturalmente por construção de vetores de expressão que incluam sequências de CDR a partir do anticorpo que ocorre naturalmente específico enxertado em sequências *framework* de um anticorpo diferente com diferentes propriedades (ver, p.ex., Riechmann, L. *et al*, 1998, *Nature* 332:323-327; Jones, P. *et al*, 1986, *Nature* 321 :522-525; e Queen, C. *et al.*, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 10029-10033). Tais sequências *framework* podem ser obtidas de bases de dados de ADN que incluam sequências de gene de anticorpo da linha germinativa. Estas sequências da linha germinativa diferirão de sequências de gene de anticorpo maduras porque elas não incluirão genes variáveis completamente montados, que são formados por união V(D)J durante maturação de células B. As sequências de gene da linha germinativa diferirão também das sequências de um anticorpo de repertório secundário de elevada afinidade em individual uniformemente ao longo da região variável. Por exemplo, mutações somáticas são relativamente infrequentes na porção de terminal amino da região *framework* 1 e na porção de terminal carboxi da região *framework* 4. Além do mais, muitas mutações somáticas não alteram significativamente as propriedades de ligação do anticorpo. Por esta razão, não é

necessário obter a sequência de ADN inteira de um anticorpo particular de modo a recriar um anticorpo recombinante intacto tendo propriedades de ligação similar àsquelas do anticorpo original (ver PCT/US99/05535 depositada em 12 março, 1999). Sequência de cadeia pesada e leve parcial abrangendo as regiões CDR é tipicamente suficiente para este propósito. A sequência parcial é usada para determinar que segmentos de gene de união e variável da linha germinativa contribuíram para os genes variáveis de anticorpo recombinante. A sequência da linha germinativa é depois usada para preencher as porções em falta das regiões variáveis. Sequências líder de cadeia pesada e leve são clivadas durante maturação da proteína e não contribuem para as propriedades do anticorpo final. Para adicionar as sequências em falta, sequências de cADN clonadas podem ser combinadas com oligonucleótidos sintéticos por ligação ou amplificação por RCP. Alternativamente, a região variável inteira pode ser sintetizada como um conjunto de pequenos oligonucleótidos sobrepostos e combinada por amplificação por RCP para criar um clone da região variável inteiramente sintético. Este processo tem certas vantagens tais como eliminação ou inclusão ou locais de restrição particulares, ou otimização de códons particulares.

As sequências de nucleótidos de transcritos de cadeia pesada e leve de um hibridoma são usadas para desenhar um conjunto sobreposto de oligonucleótidos sintéticos para criar sequências V sintéticas com capacidades codificantes de aminoácidos idênticas às sequências naturais. As sequências de cadeia pesada e *kappa* sintéticas podem diferir das sequências naturais em três modos: cadeias de bases de nucleótidos repetidas são interrompidas para facilitar a síntese de oligonucleótidos e amplificação por RCP; locais de iniciação da tradução ótimos são incorporados de acordo com as regras de Kozak (Kozak, 1991,

J. Biol. Chem. 266: 19867-19870); e locais de HindIII são manipulados a montante dos locais de iniciação da tradução.

Para ambas as regiões variáveis da cadeia pesada e leve, as sequências de cadeia codificante, e não codificante correspondente, otimizadas são divididas em oligonucleótidos com 30 - 50 nucleótidos começando aproximadamente no ponto médio do correspondente oligonucleótido não codificante. Assim sendo, para cada cadeia, os oligonucleótidos podem ser montados em conjuntos de cadeia dupla sobrepostos que abrangem segmentos de 150 - 400 nucleótidos. Os conjuntos são depois usados como moldes para produzir produtos de amplificação por RCP de 150 - 400 nucleótidos. Tipicamente, um único conjunto de oligonucleótidos de região variável será dividido em dois conjuntos que são separadamente amplificados para gerar dois produtos de RCP sobrepostos. Estes produtos sobrepostos são depois combinados por amplificação por RCP para formar a região variável completa. Pode ser também desejável incluir um fragmento sobreposto da região constante da cadeia pesada ou leve (incluindo o local BbsI da cadeia leve *kappa*, ou o local AgeI da cadeia pesada *gamma*) na amplificação por RCP para gerar fragmentos que podem ser facilmente clonados nos constructos do vetor de expressão.

As regiões variáveis da cadeia pesada e leve reconstruídas são depois combinadas com promotor clonado, sequência líder, iniciação da tradução, sequência líder, região constante, 3' não traduzida, poliadenilação, e terminação da transcrição, sequências para formar constructos de vetor de expressão. Os constructos de expressão da cadeia pesada e leve podem ser combinados num único vetor, cotransfectado, transfectado em série, ou separadamente transfectados em células hospedeiras que são depois

fundidas para formar uma célula hospedeira expressando ambas as cadeias.

Os plasmídeos para uso na construção de vetores de expressão podem ser construídos tal que as sequências de cADN de cadeia pesada V e leve *kappa* V amplificadas por RCP possam ser usadas para reconstruir minigenes de cadeia pesada e leve completos. Estes plasmídeos podem ser usados para expressar anticorpos de IgG₁κ ou IgG₄κ completamente humanos. Anticorpos completamente humanos e quiméricos da presente invenção incluem também anticorpos de IgG2, IgG3, IgE, IgA, IgM, e IgD. Plasmídeos similares podem ser construídos para expressão de outros isotipos de cadeia pesada, ou para expressão de anticorpos compreendendo cadeias leves lambda.

Assim sendo, uma ou mais características estruturais de um anticorpo humano anti-HCV da invenção podem ser usadas para criar anticorpos humanos anti-HCV estruturalmente relacionados que retêm pelo menos uma propriedade funcional dos anticorpos da invenção, tal como, por exemplo, ligação a HCV ou neutralização de HCV. Uma ou mais regiões CDR de anticorpos da invenção podem ser combinadas recombinantemente com regiões *framework* e CDRs humanas conhecidas para criar anticorpos humanos anti-HCV, recombinantemente manipulados, adicionais. As regiões *framework* variáveis da cadeia pesada e leve podem ser derivadas das mesmas ou diferentes sequências de anticorpos humanos. As sequências de anticorpos humanos podem ser as sequências de anticorpos humanos que ocorrem naturalmente ou podem ser sequências de consenso de vários anticorpos humanos. Ver Kettleborough *et al*, *Protein Engineering* 4:773 (1991); Kolbinger *et al*, *Protein Engineering* 6:971 (1993) e Carter *et al*, WO 92/22653.

Conformemente, divulgado aqui é um método para preparação de um anticorpo humano anti-HCV incluindo: preparação de um anticorpo incluindo (1) regiões *framework* da cadeia pesada humana e CDRs da cadeia pesada humana, onde pelo menos uma das CDRs da cadeia pesada humana inclui uma sequência de aminoácidos selecionada das sequências de aminoácidos de CDR da cadeia pesada humana descritas aqui; e (2) regiões *framework* da cadeia leve humana e CDRs da cadeia leve humana, onde pelo menos uma das CDRs da cadeia pesada humana inclui uma sequência de aminoácidos selecionada das sequências de aminoácidos de CDR da cadeia leve humana descritas aqui, onde o anticorpo retém a capacidade para se ligar ao HCV. A capacidade do anticorpo para se ligar ao HCV pode ser determinada usando ensaios de ligação padrão, tais como aqueles apresentados nos Exemplos {p.ex., um ELISA ou um FLISA}.

É bem conhecido na técnica que os domínios de CDR3 da cadeia pesada e leve do anticorpo desempenham um papel particularmente importante na especificidade/afinidade de ligação de um anticorpo a um antígeno (ver, Hall *et al*, *J. Immunol*, 149:1605-1612 (1992); Polymenis *et al*, *J. Immunol*, 152:5318-5329 (1994); Jahn *et al*, *Immunobiol*, 193:400-419 (1995); Klimka *et al*, *Brit. J. Cancer*, 83:252-260 (2000); Beiboer *et al*, *J. Mol. Biol*, 296:833-849 (2000); Rader *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95:8910-8915 (1998); Barbas *et al*, *J. Am. Chem. Soc*, 116:2161-2162 (1994); Ditzel *et al*, *J. Immunol*, 157:739-749 (1996)). Os anticorpos recombinantes da invenção preparados como apresentado acima compreendem as CDR3s da cadeia pesada e leve do anticorpo 83-128. Os anticorpos compreendem adicionalmente as CDR2s do anticorpo 83-128. Os anticorpos compreendem adicionalmente as CDR1s do anticorpo 83-128. Outros anticorpos divulgados aqui compreendem qualquer combinação

das CDR3s, CDR2s e CDR1s da cadeia pesada e/ou leve de 83-128, 95-2, 95-14, 95-38 e 073-1.

Conformemente, noutra forma de realização, a invenção proporciona adicionalmente anticorpos anti-HCV compreendendo: (1) regiões *framework* da cadeia pesada, uma região CDR1 da cadeia pesada humana, uma região CDR2 da cadeia pesada humana, e uma região CDR3 da cadeia pesada humana, em que a região CDR3 da cadeia pesada humana é a CDR3 de 83-128; e (2) regiões *framework* da cadeia leve, uma região CDR1 da cadeia leve humana, uma região CDR2 da cadeia leve humana, e uma região CDR3 da cadeia leve humana, em que a região CDR3 da cadeia leve humana é a CDR3 de 83-128. O anticorpo compreende adicionalmente a CDR2 da cadeia pesada e a CDR2 da cadeia leve do anticorpo 83-128. O anticorpo compreende adicionalmente a CDR1 da cadeia pesada e a CDR1 da cadeia leve de 83-128.

As regiões CDR1, 2, e/ou 3 de um anticorpo manipulado descrito acima podem compreender a(s) sequência(s) de aminoácidos exata(s) como aquelas dos anticorpos 83-128, 95-2, 95-14, 95-38, e 073-1 divulgadas aqui. No entanto, o especialista ordinariamente perito apreciará que pode ser possível algum desvio das sequências de CDR exatas de 83-128, 95-2, 95-14, 95-38, e 073-1 mantendo ainda a capacidade do anticorpo de se ligar ao HCV eficazmente (p.ex., modificações de sequência conservativas). O anticorpo manipulado pode ser composto por uma ou mais CDRs que são, por exemplo, 90%, 95%, 98% ou 99,5% idênticas a uma ou mais CDRs dos anticorpos 83-128, 95-2, 95-14, 95-38, e 073-1.

Como divulgado aqui, um ou mais resíduos de uma CDR podem ser alterados para modificar a ligação para alcançar uma taxa de associação de ligação mais favorecida, uma taxa de

dissociação de ligação mais favorecida, ou ambas, tal que seja alcançada uma constante de ligação idealizada. Usando esta estratégia, pode ser alcançado um anticorpo tendo afinidade de ligação ultra elevada de, por exemplo, uma K_D de 10^{-10} M ou menor. Técnicas de maturação da afinidade, bem conhecidas na técnica e aquelas descritas aqui, podem ser usadas para alterar a(s) região(ões) CDR seguidas por rastreio das moléculas ligantes resultantes para a mudança desejada na ligação. Conformemente, à medida que a(s) CDR(s) é(são) alterada(s), mudanças na afinidade de ligação bem como imunogenicidade podem ser monitorizadas e pontuadas tal que seja alcançado um anticorpo otimizado quanto à melhor ligação combinada e baixa imunogenicidade.

Adicionalmente a, ou em vez de, modificações dentro das CDRs, podem ser também feitas modificações dentro de uma ou mais regiões *framework*, FR1, FR2, FR3 e FR4, das regiões variáveis da cadeia pesada e/ou leve de um anticorpo humano, desde que estas modificações não eliminem a afinidade de ligação do anticorpo humano. Sabe-se que os aminoácidos em várias posições no *framework* são importantes para determinação da confirmação da CDR (*p.ex.*, capazes de interatuar com as CDRs) em muitos anticorpos (Chothia e Lesk, *supra*, Chothia *et al.*, *supra* e Tramontano *et al.*, *J. Mol. Biol.* 215:175 (1990), todos os quais são incorporados aqui por referência). Estes autores identificaram resíduos *framework* conservados importantes para conformação da CDR por análise das estruturas de vários anticorpos conhecidos. Os anticorpos analisados agruparam-se num número limitado de classes estruturais ou "canónicas" baseadas na conformação das CDRs. Resíduos *framework* conservados dentro de membros de uma classe canónica são referidos como resíduos "canónicos". Resíduos canónicos incluem os resíduos 2, 25, 29, 30, 33, 48, 64, 71, 90, 94 e 95 da

cadeia leve e os resíduos 24, 26, 29, 34, 54, 55, 71 e 94 da cadeia pesada. Resíduos adicionais (*p.ex.*, resíduos determinadores da estrutura da CDR) podem ser identificados de acordo com a metodologia de Martin e Thornton (1996) *J. Mol. Biol.* 263:800. Notavelmente, os aminoácidos nas posições 2, 48, 64 e 71 da cadeia leve e 26-30, 71 e 94 da cadeia pesada (numeração de acordo com Krabat) são conhecidos como sendo capazes de interatuar com as CDRs em muitos anticorpos. Os aminoácidos nas posições 35 na cadeia leve e 93 e 103 na cadeia pesada são também suscetíveis de interagirem com as CDRs. Resíduos adicionais que podem efetuar conformação das CDRs podem ser identificados de acordo com a metodologia de Foote e Winter (1992) *J. Mol. Biol.* 224:487. Tais resíduos são denominados resíduos "nónios" e são aqueles resíduos na região *framework* intimamente subjacentes (*i.e.*, formando uma "plataforma" sob) as CDRs.

Resíduos que "participam na interface V_L - V_H " ou "resíduo de empacotamento" incluem aqueles resíduos na interface entre V_L e V_H como definido, por exemplo, por Novotny e Haber, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4592-66 (1985) ou Chothia *et al*, *supra*.

Ocasionalmente, existe alguma ambiguidade sobre se um aminoácido particular se agrupa dentro de uma ou mais das categorias acima mencionadas. Em tais casos, são produzidos anticorpos variantes alternativos, um dos quais tem essa substituição particular, o outro dos quais não. Anticorpos variantes alternativos assim produzidos podem ser testados em qualquer um dos ensaios descritos aqui quanto à atividade desejada, e o anticorpo preferencial selecionado.

Candidatos adicionais para substituição dentro da região *framework* são aminoácidos que são incomuns ou "raros" para um anticorpo humano nessa posição. Estes aminoácidos podem ser substituídos por aminoácidos da posição equivalente da sequência da linha germinativa humana ou das posições equivalentes de anticorpos humanos mais típicos. Por exemplo, a substituição pode ser desejável quando o aminoácido numa região *framework* humana do anticorpo humano é raro para essa posição e o correspondente aminoácido na sequência da linha germinativa é comum para essa posição em sequências de imunoglobulina humana; ou quando o aminoácido no anticorpo humano é raro para essa posição e o correspondente aminoácido na sequência da linha germinativa é também raro, em relação a outras sequências humanas. É contemplado que por substituição de um aminoácido incomum por um aminoácido da sequência da linha germinativa que por acaso é típico para anticorpos humanos, o anticorpo humano pode ser tornado menos imunogénico.

O termo "raro", como usado aqui, indica um aminoácido que ocorre nessa posição em menos do que cerca de 20%, preferencialmente menos do que cerca de 10%, mais preferencialmente menos do que cerca de 5%, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 3%, ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 2% e ainda mais preferencialmente menos do que cerca de 1% de sequências numa amostra significativa de sequências, e o termo "comum", como usado aqui, indica um aminoácido que ocorre em mais do que cerca de 25% mas usualmente mais do que cerca de 50% de sequências numa amostra significativa. Por exemplo, todas as regiões variáveis da cadeia leve e pesada humanas são respetivamente agrupadas em "subgrupos" de sequências que são especialmente homólogas uma em relação à outra e têm os mesmos aminoácidos em certas posições críticas (Kabat *et al*, *supra*). Quando se decide se um

aminoácido numa sequência de anticorpo humano é "raro" ou "comum" entre sequências humanas, será frequentemente preferível considerar somente aquelas sequências humanas no mesmo subgrupo da sequência de anticorpo humano.

Em geral, as regiões *framework* de anticorpos humanos são usualmente substancialmente idênticas, e mais usualmente, idênticas às regiões *framework* das sequências da linha germinativa humana das quais elas foram derivadas. Obviamente, muitos dos aminoácidos na região *framework* têm pouca ou nenhuma contribuição direta para a especificidade ou afinidade de um anticorpo. Assim sendo, muitas substituições conservativas individuais de resíduo *framework* podem ser toleradas sem mudança apreciável da especificidade ou afinidade da imunoglobulina resultante. Assim sendo, numa forma de realização, a região *framework* variável do anticorpo humano partilha pelo menos 85% de identidade de sequência com uma sequência da região *framework* variável da linha germinativa humana ou consenso de tais sequências. Noutra forma de realização, a região *framework* variável do anticorpo humano partilha pelo menos 90%, 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% de identidade de sequência com uma sequência da região *framework* variável da linha germinativa humana ou consenso de tais sequências.

Adicionalmente à ligação simples de um epítopo linear de uma proteína E2 do HCV, um anticorpo monoclonal pode ser selecionado quanto à sua retenção de outras propriedades funcionais de anticorpos da invenção, tais como ligação a múltiplos genótipos de E2 de HCV e/ou ligação com uma afinidade ultra elevada tal como, por exemplo, um K_D de 10^{-9} M ou menor.

Caracterização de Anticorpos Monoclonais Humanos para HCV

Os anticorpos monoclonais humanos podem ser caracterizados quanto à ligação ao HCV usando uma variedade de técnicas conhecidas. Geralmente, os anticorpos são inicialmente caracterizados por ELISA. Brevemente, placas de microtitulação podem ser revestidas com HCV purificado em PBS, e depois bloqueadas com proteínas irrelevantes tais como albumina do soro bovino (BSA) diluída em PBS. Diluições de plasma de camundongos imunizados com HCV são adicionadas a cada poço e incubadas durante 1-2 horas a 37°C. As placas são lavadas com PBS/Tween 20 e depois incubadas com um reagente policlonal específico de Fc de IgG de cabra-anti-humano conjugado com fosfatase alcalina durante 1 hora a 37°C. Após lavagem, as placas são desenvolvidas com substrato ABTS, e analisadas a OD de 405. Preferencialmente, os camundongos que desenvolvem os títulos mais elevados serão usados para as fusões.

Um ensaio de ELISA como descrito acima pode ser usado para rastrear anticorpos e, assim, hibridomas que produzem anticorpos que mostram reatividade positiva com o imunogénio de HCV. Os hibridomas que se ligam, preferencialmente com elevada afinidade, ao HCV podem ser depois subclonados e adicionalmente caracterizados. Um clone de cada hibridoma, que retém a reatividade da célula progenitora (por ELISA), pode ser depois escolhido para fabrico de um banco de células, e para purificação de anticorpos.

Para purificar anticorpos humanos anti-HCV, hibridomas selecionados podem ser cultivados em garrafas rotativas, frascos rotativos de dois litros ou outros sistemas de cultura. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes de cromatografia de afinidade com proteína A-sefarose (Pharmacia, Piscataway, NJ) para

purificar a proteína. Após mudança de tampão para PBS, a concentração pode ser determinada por OD₂₈₀ usando coeficiente de extinção de 1,43 ou preferencialmente por análise nefelométrica. A IgG pode ser verificada por eletroforese em gel e por método específico do antigénio.

Para determinar se os anticorpos monoclonais humanos anti-HCV selecionados se ligam a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado usando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, EL). A ligação de MAb biotinilado pode ser detetada com uma sonda marcada com estreptavidina. Para determinar o isotipo de anticorpos purificados, podem ser realizadas ELISAs de isotipo usando técnicas reconhecidas pela técnica. Após bloqueio com BSA a 5%, as placas são feitas reagir com 10 µg/mL de anticorpos monoclonais ou controlos de isotipo purificados, à temperatura ambiente durante duas horas. Os poços podem ser depois feitos reagir com ou IgG1 humana ou outras sondas conjugadas específicas do isotipo humano. As placas são desenvolvidas e analisadas como descrito acima.

As IgGs humanas anti-HCV podem ser adicionalmente testadas quanto à reatividade com o antigénio de HCV por transferência de Western. Brevemente, extratos de células de células expressando HCV podem ser preparados e sujeitos a eletroforese em gel de acrilamida e dodecil sulfato de sódio. Após eletroforese, os antigénios separados serão transferidos para membranas de nitrocelulose, bloqueados com soro de camundongo a 20%, e sondados com os anticorpos monoclonais a ser testados. A ligação de IgG humana pode ser detetada usando fosfatase alcalina de IgG anti-humana e desenvolvida com comprimidos de substrato BCIP/NBT (Sigma Chem. Co., St. Louis, MO).

2. Produção de Animais Não Humanos Transgênicos Que Geram Anticorpos Monoclonais Humanos Anti-HCV

Também divulgados aqui são animais não humanos transgênicos, tais como camundongos transgênicos, que são capazes de expressar anticorpos monoclonais humanos que se ligam especificamente ao HCV. Em particular, divulgado aqui é um camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene da cadeia pesada humana, tal que o camundongo produza anticorpos humanos anti-HCV quando imunizado com antígeno de HCV e/ou células expressando HCV. O transgene da cadeia pesada humana pode ser integrado no ADN cromossomal do camundongo, como é o caso de camundongos transgênicos, p.ex., HuMAb, como descrito em detalhe aqui e exemplificado. Tais camundongos transgênicos são capazes de produzir múltiplos isotipos de anticorpos monoclonais humanos para HCV (p.ex., IgG) submetendo-se a recombinação de V-D-J e troca de isotipos. A troca de isotipos pode ocorrer por, p.ex., troca de isotipos clássica ou não clássica.

O desenho de um animal não humano transgênico que responda à estimulação de antígeno estranho com um repertório de anticorpos heterólogos requer que os transgenes de imunoglobulina heterólogos contidos dentro do animal transgênico funcionem corretamente ao longo da via do desenvolvimento de células B. Isto inclui, por exemplo, troca de isotipos do transgene da cadeia pesada heterólogo. Conformemente, são construídos transgenes de modo a produzir troca de isotipos e um ou mais dos seguintes anticorpos: (1) expressão de elevado nível e específica do tipo de células, (2) rearranjo de genes funcional, (3) ativação de e resposta a exclusão alélica, (4) expressão de um repertório primário suficiente, (5) transdução de sinal,

(6) hipermutação somática, e (7) dominação do locus do anticorpo de transgene durante a resposta imune.

Nem todos os critérios acima mencionados necessitam de ser cumpridos. Por exemplo, onde os *loci* de imunoglobulina endógenos do animal transgênico estão funcionalmente corrompidos, o transgene não necessita de ativar a exclusão alélica. Adicionalmente, onde o transgene compreende um gene de imunoglobulina da cadeia pesada e/ou leve funcionalmente rearranjado, o segundo critério de rearranjo de genes funcional é desnecessário, pelo menos para aquele transgene que já está rearranjado. Para informação sobre imunologia molecular, ver, *Fundamental Immunology*, 2ª edição (1989), Paul William E., ed Raven Press, N. I..

Os animais não humanos transgênicos usados para gerar os anticorpos monoclonais humanos da invenção contêm transgenes da cadeia pesada e leve da imunoglobulina heterólogos rearranjados, não rearranjados ou uma combinação de rearranjados e não rearranjados na linha germinativa do animal transgênico. Cada um dos transgenes da cadeia pesada compreende pelo menos um gene C_H . Adicionalmente, o transgene da cadeia pesada pode conter sequências de troca de isotipo funcionais, que são capazes de suportar troca de isotipos de um transgene heterólogo codificando múltiplos genes C_H nas células B do animal transgênico. Tais sequências de troca podem ser aquelas que ocorrem naturalmente no locus de imunoglobulina da linha germinativa da espécie que serve como a fonte dos genes do transgene de C_H , ou tais sequências de troca podem ser derivadas daquelas que ocorrem na espécie que receberá o constructo de transgene (o animal transgênico). Por exemplo, um constructo de transgene humano que é usado para produzir um camundongo transgênico pode produzir uma frequência mais elevada de eventos de troca de isotipos se

incorporar sequências de troca similar àquelas que ocorrem naturalmente no locus da cadeia pesada do camundongo, pois presumivelmente as sequências de troca do camundongo são otimizadas para funcionarem com o sistema de enzima recombinase de troca do camundongo, ao passo que as sequências de troca humanas não são. As sequências de troca podem ser isoladas e clonadas por métodos de clonagem convencionais, ou podem ser sintetizadas de novo a partir de oligonucleótidos sintéticos sobrepostos desenhados com base em informação de sequências publicada em relação a sequências de região de troca de imunoglobulinas (Mills *et al*, *Nucl. Acids Res.* 15:7305-7316 (1991); Sideras *et al.*, *Intl. Immunol.* 1 :631-642 (1989)). Para cada um dos animais transgênicos acima, transgenes da imunoglobulina da cadeia pesada e leve heterólogos funcionalmente rearranjados são encontrados numa fração significativa das células B do animal transgênico (pelo menos 10 por cento).

Os transgenes usados para gerar os animais transgênicos podem incluir um transgene da cadeia pesada compreendendo ADN codificando pelo menos um segmento de gene variável, um segmento de gene de diversidade, um segmento de gene de união e pelo menos um segmento de gene de região constante. O transgene da cadeia leve da imunoglobulina compreende ADN codificando pelo menos um segmento de gene variável, um segmento de gene de união e pelo menos um segmento de gene de região constante. Os segmentos de gene codificando os segmentos de gene da cadeia leve e pesada são heterólogos em relação ao animal não humano transgênico na medida em que eles são derivados de, ou correspondem a, ADN codificando segmentos de gene da cadeia pesada e leve da imunoglobulina de uma espécie não consistindo no animal não humano transgênico. O transgene pode ser construído tal que os segmentos de gene individuais estejam não rearranjados,

i.e., não rearranjados de modo a codificarem uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina funcional. Tais transgenes não rearranjados suportam a recombinação dos segmentos de gene V, D, e J (rearranjo funcional) e suportam preferencialmente a incorporação de todo um ou uma porção de um segmento de gene de região D na cadeia pesada da imunoglobulina rearranjada dentro do animal não humano transgênico quando exposto ao antigénio do HCV.

Os transgenes podem compreender um "mini-lócus" não rearranjado. Tais transgenes compreendem tipicamente uma porção substancial dos segmentos C, D, e J bem como um subconjunto dos segmentos de gene V. Em tais constructos de transgene, as várias sequências reguladoras, p.ex. promotores, intensificadores, regiões de troca de classes, sequências de dador de *splice* e aceitador de *splice* para processamento de ARN, sinais de recombinação e similares, compreendem sequências correspondentes derivadas do ADN heterólogo. Tais sequências reguladoras podem ser incorporadas no transgene da mesma espécie ou numa relacionada do animal não humano usado na invenção. Por exemplo, os segmentos de gene da imunoglobulina humana podem ser combinados num transgene com uma sequência intensificadora de imunoglobulina de roedor para uso num camundongo transgênico. Alternativamente, podem ser incorporadas sequências reguladoras sintéticas no transgene, em que tais sequências reguladoras sintéticas não são homólogas com uma sequência de ADN funcional que se sabe que ocorre naturalmente nos genomas de mamíferos. Sequências reguladoras sintéticas são desenhadas de acordo com regras de consenso, tais como, por exemplo, aquelas especificando as sequências permissíveis de um local aceitador de *splice* ou um motivo promotor/intensificador. Por exemplo, um minilócus compreende uma porção do lócus da imunoglobulina genómico tendo pelo menos uma deleção

interna (i.e., não num terminal da porção) de uma porção de ADN não essencial (p.ex., sequência interveniente; intrão ou sua porção) em comparação com o lócus da Ig da linha germinativa que ocorre naturalmente.

O animal transgênico usado para gerar anticorpos humanos para HCV contém preferencialmente pelo menos uma, tipicamente 2-10, e por vezes 25-50 ou mais cópias do transgene descrito no Exemplo 12 de WO 98/24884 (p.ex., pHCl ou pHCl2) cruzados com um animal contendo uma única cópia de um transgene da cadeia leve descrito nos Exemplos 5, 6, 8, ou 14 de WO 98/24884, e a descendência produzida com o animal com J_H eliminado descrita no Exemplo 10 de WO 98/24884. Os animais são cruzados até à homozigotia para cada um destes três traços. Tais animais têm o seguinte genótipo: uma única cópia (por conjunto haploide de cromossomas) de um mini-lócus não rearranjado da cadeia pesada humana (descrito no Exemplo 12 de WO 98/24884), uma única cópia (por conjunto haploide de cromossomas) de um constructo da cadeia leve K humana rearranjada (descrito no Exemplo 14 de WO 98/24884), e uma deleção em cada lócus da cadeia pesada de camundongo endógeno que remove todos os segmentos de J_H funcionais (descrita no Exemplo 10 de WO 98/24884). Tais animais são cruzados com camundongos que são homozigotos quanto à deleção dos segmentos de J_H (Exemplo 10 de WO 98/24884) para produzir descendência que seja homozigota quanto à deleção de J_H e hemizigota quanto aos constructos da cadeia pesada e leve humana. Os animais resultantes são injetados com antigénios e usados para produção de anticorpos monoclonais humanos contra estes antigénios.

As células B isoladas de um tal animal são monoespecíficas no que diz respeito às cadeias pesada e leve humanas porque contêm somente uma única cópia de cada gene. Além do mais,

elas serão monoespecíficas no que diz respeito a cadeias pesadas humanas ou de camundongo porque ambas as cópias de gene da cadeia pesada de camundongo endógeno são não funcionais em virtude da deleção abrangendo a região de J_H introduzida como descrito nos Exemplos 9 e 12 de WO 98/24884. Além do mais, uma fração substancial das células B será monoespecífica no que diz respeito às cadeias leves humanas ou de camundongo porque a expressão da única cópia do gene da cadeia leve K humana rearranjada irá alelicamente e isotipicamente excluir o rearranjo dos genes de cadeia K e lambda de camundongo endógenos numa fração significativa de células B.

Os camundongos transgênicos divulgados aqui exibem produção de imunoglobulinas com um repertório significativo, idealmente substancialmente similar àquele de um camundongo nativo. Assim sendo, por exemplo, em formas de realização onde os genes de Ig endógenos foram inativados, os níveis de imunoglobulina total variarão de cerca de 0,1 a 10 mg/mL de soro, preferencialmente 0,5 a 5 mg/mL, idealmente pelo menos cerca de 1,0 mg/mL. Quando um transgene capaz de efetuar uma troca para IgG a partir de IgM foi introduzido no camundongo transgênico, a razão no camundongo adulto de IgG em relação a IgM no soro é preferencialmente cerca de 10:1. A razão de IgG em relação a IgM será muito menor no camundongo imaturo. Em geral, mais do que cerca de 10%, preferencialmente 40 a 80% do baço e células B de linfonodos expressam exclusivamente proteína de IgG humana.

O repertório irá idealmente aproximar-se daquele mostrado num camundongo nativo, usualmente pelo menos cerca de 10% igualmente elevado, preferencialmente 25 a 50% ou mais. Geralmente, pelo menos cerca de mil imunoglobulinas (idealmente IgG) diferentes, preferencialmente 10^4 a 10^6 ou mais, serão produzidas, dependendo principalmente do número

de regiões V, J e D diferentes introduzidas no genoma do camundongo. Estas imunoglobulinas irão tipicamente reconhecer cerca de metade ou mais de proteínas altamente antigénicas, p.ex., proteína A de *staphylococcus*. Tipicamente, as imunoglobulinas exibirão uma afinidade (K_D) para antígenos pré-selecionados menor do que 10^{-7} M, tal como menor do que 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou mesmo menor.

Pode ser preferencial gerar camundongos com repertórios pré-determinados para limitar a seleção de genes V representados na resposta do anticorpo a um tipo de antígeno pré-determinado. Um transgene da cadeia pesada tendo um repertório pré-determinado pode compreender, por exemplo, genes V_H humanos que são preferencialmente usados em respostas de anticorpos ao tipo de antígeno pré-determinado em humanos. Alternativamente, alguns genes V_H podem ser excluídos de um repertório definido por várias razões (p.ex., têm uma baixa probabilidade de codificar regiões V de elevada afinidade para o antígeno pré-determinado; têm uma baixa propensão para sofrerem mutação somática e aguçamento da afinidade; ou são imunogénicos a certos humanos). Assim sendo, antes do rearranjo de um transgene contendo vários segmentos de gene da cadeia pesada ou leve, tais segmentos de gene podem ser prontamente identificados, p.ex. por hibridação ou sequenciação de ADN, como sendo de uma espécie de organismo sem ser o animal transgénico.

Os camundongos transgénicos como descritos acima podem ser imunizados com, por exemplo, uma preparação purificada ou enriquecida de antígeno de HCV e/ou células expressando proteínas de HCV. Alternativamente, os camundongos transgénicos podem ser imunizados com ADN codificando proteínas do HCV. Os camundongos irão então produzir células B que sofrem troca de classes através de

recombinação de troca intratransgenes (cis-troca) e expressam imunoglobulinas reativas com HCV. As imunoglobulinas podem ser anticorpos humanos (também referidos como "anticorpos de sequência humana"), em que os polipéptidos da cadeia pesada e leve são codificados por sequências de transgene humano, que podem incluir sequências derivadas por mutação somática e uniões recombinatoriais de região V, bem como sequências codificadas pela linha germinativa; estes anticorpos humanos podem ser referidos como sendo substancialmente idênticos a uma sequência de polipéptidos codificada por um segmento de gene V_L ou V_H humano e um segmento de J_L ou D_H e J_H humano, apesar de poderem estar presentes outras sequências não germinativas como um resultado de mutação somática e uniões recombinatoriais V-J e V-D-J diferenciais. As regiões variáveis de cada cadeia de anticorpo são tipicamente pelo menos 80 por cento codificadas por segmentos de gene V, J, e, no caso de cadeias pesadas, D, da linha germinativa humana; frequentemente pelo menos 85 por cento das regiões variáveis são codificadas por sequências da linha germinativa humana presentes no transgene; frequentemente 90 ou 95 por cento ou mais das sequências da região variável são codificadas por sequências da linha germinativa humana presentes no transgene. No entanto, uma vez que sequências não da linha germinativa são introduzidas por mutação somática e união VJ e VDJ, os anticorpos da sequência humana irão frequentemente ter algumas sequências da região variável (e menos frequentemente sequências da região constante) que não são tipicamente codificadas por segmentos de gene V, D, ou J humanos como encontrado no(s) transgenes(s) humano(s) na linha germinativa dos camundongos. Tipicamente, tais sequências não da linha germinativa (ou posições de nucleótidos individuais) irão aglomerar-se nas ou próximo

das CDRs, ou em regiões onde se sabe que mutações somáticas se agrupam.

Os anticorpos humanos que se ligam ao antígeno pré-determinado podem resultar de troca de isotipos, tal que anticorpos humanos compreendendo uma cadeia γ da sequência humana (tal como $\gamma 1$, $\gamma 2a$, $\gamma 2B$, ou $\gamma 3$) e uma cadeia leve da sequência humana (tal como κ) sejam produzidos. Tais anticorpos humanos com troca de isotipos contêm frequentemente uma ou mais mutações somáticas, tipicamente na região variável e frequentemente em ou dentro de cerca de 10 resíduos de uma CDR como um resultado de maturação de afinidade e seleção de células B por antígeno, particularmente subsequente a desafio de antígeno secundário (ou subsequente). Estes anticorpos humanos de elevada afinidade podem ter afinidades de ligação (K_D) menores do que 10^{-7} M, tal como menores do que 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou mesmo menor.

Também divulgadas são células B derivadas de camundongos transgênicos como descrito aqui. As células B podem ser usadas para gerar hibridomas expressando anticorpos monoclonais humanos que se ligam com elevada afinidade (p.ex., K_D menor do que 10^{-7} M) a HCV humano. Assim sendo, divulgado aqui é um hibridoma que produz um anticorpo humano tendo uma afinidade (K_D) menor do que 10^{-7} M, tal como menor do que 10^{-8} M, 10^{-9} M ou 10^{-10} M ou mesmo menor quando determinada por tecnologia de ressonância de plasmão de superfície (SPR) num instrumento BIAcore 3000 usando HCV recombinante humano, em que o anticorpo compreende:

uma cadeia leve da sequência humana composta por (1) uma região variável da cadeia leve tendo uma sequência de polipéptidos que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipéptidos codificada por um segmento de

gene V_L humano e um segmento de J_L humano, e (2) uma região constante da cadeia leve tendo uma sequência de polipéptidos que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipéptidos codificada por um segmento de gene C_L humano; e

uma cadeia pesada da sequência humana composta por (1) uma região variável da cadeia pesada tendo uma sequência de polipéptidos que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipéptidos codificada por um segmento de gene V_H humano e um segmento de JH humano, e (2) uma região constante da cadeia pesada tendo uma sequência de polipéptidos que é substancialmente idêntica a uma sequência de polipéptidos codificada por um segmento de gene C_H humano.

O desenvolvimento de anticorpos monoclonais humanos de elevada afinidade contra HCV pode ser facilitado por um método para expansão do repertório de segmentos de gene da região variável humana num camundongo transgênico tendo um genoma compreendendo um transgene da imunoglobulina humana integrado, compreendendo o referido método introdução no genoma de um transgene de gene V compreendendo segmentos de gene da região V que não estão presentes no referido transgene da imunoglobulina humana integrado. Frequentemente, o transgene de região V é um cromossoma artificial de levedura compreendendo uma porção de uma rede de segmentos de gene V_H ou V_L (V_K) humano, como pode ocorrer naturalmente num genoma humano ou como pode ser *spliced* em conjunto separadamente por métodos recombinantes, que podem incluir segmentos de gene V fora-de-ordem ou omitidos. Frequentemente, pelo menos cinco ou mais segmentos de gene V funcionais estão contidos no YAC. Nesta variação, é possível preparar um camundongo transgênico produzido pelo método da expansão do repertório de V, em que o camundongo expressa uma cadeia de imunoglobulina compreendendo uma

sequência da região variável codificada por um segmento de gene da região V presente no transgene da região V e uma região C codificada no transgene de Ig humano. Por meio do método da expansão do repertório de V, podem ser gerados camundongos transgênicos tendo pelo menos 5 genes V distintos; como o podem camundongos contendo pelo menos cerca de 24 genes V ou mais. Alguns segmentos de gene V podem ser não funcionais (p.ex., pseudogenes e similares); estes segmentos podem ser retidos ou podem ser seletivamente eliminados por métodos recombinantes disponíveis do especialista perito, se desejado.

Logo que a linha germinativa tenha sido manipulada para conter um YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido, substancialmente não presente no transgene de Ig humana contendo os segmentos de gene J e C, o traço pode ser propagado e cruzado em outros fundos genéticos, incluindo fundos onde o YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido é cruzado numa linha germinativa tendo um transgene de Ig humana diferente. Múltiplos YACs funcionais tendo um repertório de segmento V expandido podem ser cruzados numa linha germinativa para trabalhar com um transgene de Ig humana (ou múltiplos transgenes de Ig humana). Embora referidos aqui como transgenes de YAC, a tais transgenes quando integrados no genoma podem substancialmente faltar sequências de levedura, tais como sequências requeridas por replicação autônoma em levedura; tais sequências podem ser opcionalmente removidas por manipulação genética (p.ex., digestão por restrição e eletroforese por gel em campo pulsado ou outro método adequado) após a replicação em levedura já não ser necessária (i.e., antes da introdução numa célula ES de camundongo ou prozigoto de camundongo). Métodos de propagação do traço da expressão da imunoglobulina de sequência humana incluem cruzamento de um camundongo

transgênico tendo o(s) transgene(s) de Ig humana, e opcionalmente tendo também um YAC funcional tendo um repertório de segmento V expandido. Ambos os segmentos de gene V_H e V_L podem estar presentes no YAC. O camundongo transgênico pode ser cruzado em qualquer fundo desejado pelo especialista, incluindo fundos alojando outros transgenes humanos, incluindo transgenes de Ig humana e/ou transgenes codificando outras proteínas de linfócitos humanos. A invenção proporciona também uma imunoglobulina de sequência humana de elevada afinidade produzida por um camundongo transgênico tendo um transgene de YAC de repertório de região V expandido. Embora o acima mencionado descreva um animal transgênico preferencial, são contemplados outros que foram classificados em quatro categorias:

- I. Animais transgênicos contendo um transgene de imunoglobulina pesada não rearranjada e leve rearranjada;
- II. Animais transgênicos contendo um transgene de imunoglobulina pesada não rearranjada e leve não rearranjada;
- III. Animal transgênico contendo transgene de imunoglobulina pesada rearranjada e leve não rearranjada;
- e
- IV. Animais transgênicos contendo transgenes de imunoglobulina pesada rearranjada e leve rearranjada.

Destas categorias de animal transgênico, a ordem preferencial de preferência é como se segue $II > I > III > IV$ onde os genes da cadeia leve endógenos (ou pelo menos o gene K) foram desligados por recombinação homóloga (ou outro método) e $I > II > in > IV$ onde os genes da cadeia leve endógenos não foram desligados e têm de ser dominados por exclusão alélica.

III. Conjugados de Anticorpo/Imunotoxinas

Também divulgado aqui é um anticorpo monoclonal humano anti-HCV conjugado com uma fração terapêutica, tal como uma citotoxina, um fármaco (p.ex., um imunossupressor) ou um radioisótopo. Quando conjugados com uma citotoxina, estes conjugados de anticorpo são referidos como "imunotoxinas". Uma citotoxina ou agente citotóxico inclui qualquer agente que seja prejudicial a (p.ex., mate) células. Exemplos incluem taxol, citochalasin B, gramicidina D, brometo de etídio, emetina, mitomicina, etoposida, tenoposida, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, diidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, e puomicina e seus análogos ou homólogos. Agentes terapêuticos incluem, mas não estão limitados a, antimetabolitos (p.ex., metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tio guanina, citarabina, decarbazina de 5-fluorouracilo), agentes alquilantes (p.ex., mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalano, carmustina (BSNU) e lomustina (CCNU), ciclofosfamida, bussulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, e cis-diclorodiamina platina (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (p.ex., daunorubicina (anteriormente daunomicina) e doxorubicina), antibióticos (p.ex., dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, e antramicina (AMC)), e agentes anti-mitóticos (p.ex., vincristina e vinblastina). Um anticorpo da presente invenção pode ser conjugado com um radioisótopo, p.ex., iodo radioativo, para gerar radiofarmacêuticos citotóxicos para tratamento de um distúrbio relacionado com o HCV, tal como um cancro.

Os conjugados de anticorpo podem ser usados para modificar uma dada resposta biológica. A fração terapêutica não é

para ser interpretada como limitada a agentes terapêuticos químicos clássicos. Por exemplo, a fração de fármaco pode ser uma proteína ou polipéptido possuindo uma atividade biológica desejada. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa, ou seu fragmento ativo, tal como abrina, ricina A, exotoxina de *pseudomonas*, ou toxina de difteria; uma proteína tal como fator de necrose tumoral ou interferão γ ; ou, modificadores da resposta biológica tais como, por exemplo, linfocinas, interleucina 1 ("IL-1"), interleucina 2 ("IL-2"), interleucina 6 ("IL-6"), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos ("GM-CSF"), fator estimulador de colônias de granulócitos ("G-CSF"), ou outras citocinas ou fatores de crescimento.

Técnicas para conjugação de tal fração terapêutica a anticorpos são bem conhecidas, ver, *p.ex.*, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", em *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", em *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", em *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), e Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *ImmunoL Rev.*, 62:119-58 (1982).

IV. Composições Farmacêuticas

Noutro aspeto, a presente invenção proporciona uma composição, p.ex., uma composição farmacêutica, contendo um ou uma combinação de anticorpos monoclonais humanos, ou sua(s) porção(ões) de ligação do antigénio, da presente invenção, formulados em conjunto com um transportador farmacêuticamente aceitável. Numa forma de realização preferencial, as composições incluem uma combinação de múltiplos (p.ex., dois ou mais) anticorpos humanos isolados da invenção. Preferencialmente, cada um dos anticorpos da composição liga-se a um epítipo pré-selecionado, distinto, do HCV.

As composições farmacêuticas da invenção podem ser também administradas em terapia de combinação, i.e., combinadas com outros agentes. Por exemplo, a terapia de combinação pode incluir uma composição da presente invenção com pelo menos um ou mais agentes terapêuticos adicionais, tais como agentes anti-inflamatórios, DMARDs (fármacos antirreumáticos modificadores da doença), agentes imunossuppressores, quimioterapêuticos, e agentes contra a psoríase. As composições farmacêuticas da invenção podem ser também administradas em conjunto com terapia de radiação. A coadministração com outros anticorpos, tais como anticorpos específicos de CD4 e anticorpos específicos de IL-2, é também englobada pela invenção. Tais combinações com anticorpos específicos de CD4 e anticorpos específicos de IL-2 são consideradas particularmente úteis para tratamento de doenças autoimunes e rejeições de transplante.

Como usado aqui, "transportador farmacêuticamente aceitável" inclui qualquer um e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e

antifúngicos, agentes isotónicos e que atrasam a absorção, e similares que sejam fisiologicamente compatíveis. Preferencialmente, o transportador é adequado para administração intravenosa, intramuscular, subcutânea, parenteral, espinhal ou epidérmica (*p.ex.*, por injeção ou infusão). Dependendo da rota de administração, o composto ativo, *i.e.*, anticorpo, molécula biespecífica e multiespecífica, pode ser revestido num material para proteger o composto da ação de ácidos e outras condições naturais que possam inativar o composto.

Um "sal farmacêuticamente aceitável" refere-se a um sal que retém a atividade biológica desejada do presente composto e não confere quaisquer efeitos toxicológicos indesejados (ver *p.ex.*, Berge, S.M., *et al.* (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Exemplos de tais sais incluem sais de adição ácida e sais de adição básica. Sais de adição ácida incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos não tóxicos, tais como clorídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromídrico, iodídrico, fosforoso e similares, bem como de ácidos orgânicos não tóxicos tais como ácidos mono- e dicarboxílicos, ácidos alcanoicos substituídos em fenilo, ácidos hidroxí alcanoicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos e aromáticos e similares. Sais de adição básica incluem aqueles derivados de metais alcalinoterrosos, tais como sódio, potássio, magnésio, cálcio e similares, bem como de aminas orgânicas não tóxicas, tais como N,N'-dibenziletilenodiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilenodiamina, procaína e similares.

Uma composição da presente invenção pode ser administrada por uma variedade de métodos conhecidos na técnica. Como será apreciado pelo especialista perito, a rota e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados

desejados. Os compostos ativos podem ser preparados com transportadores que protegerão o composto contra libertação rápida, tal como uma formulação de libertação controlada, incluindo implantes, pensos transdérmicos, e sistemas de distribuição microencapsulados. Podem ser usados polímeros biocompatíveis, biodegradáveis, tais como acetato de etileno de vinilo, polianidridos, ácido poliglicólico, colagénio, poliortoésteres, e ácido poliláctico. Muitos métodos para a preparação de tais formulações estão patenteados ou são geralmente conhecidos daqueles peritos na técnica. Ver, *p.ex.*, *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque, 1978.

Para administrar um composto da invenção por certas rotas de administração, pode ser necessário revestir o composto com, ou coadministrar o composto com, um material para prevenir a sua inativação. Por exemplo, o composto pode ser administrado a um sujeito num transportador apropriado, por exemplo, lipossomas, ou um diluente. Diluentes farmacêuticamente aceitáveis incluem salino e soluções de tampão aquosas. Lipossomas incluem emulsões CGF água-em-óleo-em-água bem como lipossomas convencionais (Strejan *et al.* (1984) *J. Neuroimmunol.* 7:27).

Transportadores farmacêuticamente aceitáveis incluem soluções ou dispersões aquosas estéreis e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente aceitáveis é conhecido na técnica. Exceto na medida em que qualquer meio ou agente convencional seja incompatível com o composto ativo, o seu uso nas composições farmacêuticas da invenção está

contemplado. Compostos ativos suplementares podem ser também incorporados nas composições.

Composições terapêuticas têm tipicamente de ser estéreis e estáveis sob as condições de fabrico e armazenamento. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, lipossoma, ou outra estrutura ordenada adequada para elevada concentração de fármaco. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares), e suas misturas adequadas. A fluidez conveniente pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partículas requerido, por exemplo, açúcares, poliálcoois tais como manitol, sorbitol, ou cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada por inclusão na composição de um agente que atrase a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas por incorporação do composto ativo na quantidade requerida num solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes numerados acima, como requerido, seguida por microfiltração por esterilização. Geralmente, são preparadas dispersões por incorporação do composto ativo num veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso do pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos preferenciais de preparação são secagem a vácuo e criodessecação (liofilização) que originam um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente desejado adicional de uma sua solução filtrada em meio estéril.

OS regimes de dosagem são ajustados para proporcionar a resposta desejada ótima (p.ex., uma resposta terapêutica). Por exemplo, pode ser administrado um único bólus, podem ser administradas várias doses divididas ao longo do tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. Por exemplo, os anticorpos humanos da invenção podem ser administrados uma vez ou duas vezes semanalmente por injeção subcutânea ou uma vez ou duas vezes mensalmente por injeção subcutânea.

É especialmente vantajoso formular composições parenterais em forma de dosagem unitária para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. Forma de dosagem unitária como usada aqui refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para os sujeitos a ser tratados; cada unidade contém uma quantidade pré-determinada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o transportador farmacêutico requerido. A especificação para as formas de dosagem unitária é ditada pelas e diretamente dependente das (a) características únicas do composto ativo e o efeito terapêutico particular a ser alcançado, e (b) limitações inerentes na técnica de compostagem de um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

Exemplos de antioxidantes farmacêuticamente aceitáveis incluem: (1) antioxidantes solúveis em água, tais como ácido ascórbico, hidrocloreto de cisteína, bissulfato de sódio, metabissulfito de sódio, sulfito de sódio e similares; (2) antioxidantes solúveis em óleo, tais como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, e similares; e (3) agentes quelantes de

metal, tais como ácido cítrico, ácido tetraacético de etilenodiamina (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, e similares.

Para as composições terapêuticas, formulações da presente invenção incluem aquelas adequadas para administração oral, nasal, tópica (incluindo bucal e sublingual), retal, vaginal e/ou parenteral. As formulações podem ser convenientemente apresentadas em forma de dosagem unitária e podem ser preparadas por quaisquer métodos conhecidos na técnica de farmácia. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material transportador para produzir uma única forma de dosagem variará dependendo do sujeito sendo tratado, e do modo de administração particular. A quantidade de ingrediente ativo que pode ser combinada com um material transportador para produzir uma única forma de dosagem irá geralmente ser aquela quantidade da composição que produz um efeito terapêutico. Geralmente, de cem por cento, esta quantidade variará de cerca de 0,001 por cento a cerca de noventa por cento de ingrediente ativo, preferencialmente de cerca de 0,005 por cento a cerca de 70 por cento, o mais preferencialmente de cerca de 0,01 por cento a cerca de 30 por cento.

Formulações da presente invenção que são adequadas para administração vaginal incluem também pessários, tampões, cremes, géis, pastas, espumas ou formulações de pulverização contendo tais transportadores como são conhecidas na técnica como sendo apropriadas. Formas de dosagem para a administração tópica ou transdérmica de composições desta invenção incluem pós, pulverizadores, pomadas, pastas, cremes, loções, géis, soluções, pensos e inalantes. O composto ativo pode ser misturado sob condições estéreis com um transportador farmacêuticamente

aceitável, e com quaisquer conservantes, tampões, ou propulsores que possam ser requeridos.

As frases "administração parenteral" e "administradas parenteralmente" como usadas aqui significam modos de administração sem ser administração enteral e tópica, usualmente por injeção, e incluem, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intra-arterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intra-articular, subcapsular, subaracnoide, intraespinhal, epidural e intrasternal.

Exemplos de transportadores aquosos e não aquosos adequados que podem ser empregues nas composições farmacêuticas da invenção incluem água, etanol, polióis (tal como glicerol, propileno glicol, polietileno glicol, e similares), e suas misturas adequadas, óleos vegetais, tais como azeite, e ésteres orgânicos injetáveis, tais como oleato de etilo. A fluidez conveniente pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de materiais de revestimento, tais como lecitina, pela manutenção do tamanho de partículas requerido no caso de dispersões, e pelo uso de tensioativos.

Estas composições podem conter também adjuvantes tais como conservantes, agentes molhantes, agentes emulsificantes e agentes dispersantes. A prevenção da presença de microrganismos pode ser assegurada por procedimentos de esterilização, *supra*, e pela inclusão de vários agentes antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, e similares. Pode ser também desejável incluir agentes isotônicos, tais como açúcares, cloreto de sódio, e similares nas composições. Adicionalmente, a absorção prolongada da forma injetável pode ser provocada por inclusão na composição de agentes

que atrasam a absorção tal como monoestearato de alumínio e gelatina.

Quando os compostos da presente invenção são administrados como farmacêuticos a humanos e animais, eles podem ser dados sozinhos ou como uma composição farmacêutica contendo, por exemplo, 0,001 a 90% (mais preferencialmente, 0,05 a 70%, tal como 0,01 a 30%) de ingrediente ativo em combinação com um transportador farmacêuticamente aceitável.

Independentemente da rota de administração selecionada, os compostos da presente invenção, que podem ser usados numa forma hidratada adequada, e/ou as composições farmacêuticas da presente invenção, são formulados em formas de dosagem farmacêuticamente aceitáveis por métodos convencionais conhecidos daqueles de perícia na técnica.

Os níveis de dosagem reais dos ingredientes ativos nas composições farmacêuticas da presente invenção podem ser variados de modo a obter uma quantidade do ingrediente ativo que seja eficaz para alcançar a resposta terapêutica desejada para um paciente, composição, e modo de administração particulares, sem ser tóxico para o paciente. O nível de dosagem selecionado dependerá de uma variedade de fatores farmacocinéticos incluindo a atividade das composições particulares da presente invenção empregues, ou do seu éster, sal ou amida, a rota de administração, o tempo de administração, a taxa de secreção do composto particular sendo empregue, a duração do tratamento, outros fármacos, compostos e/ou materiais usados em combinação com as composições particulares empregues, a idade, sexo, peso, condição, saúde geral e história médica anterior do paciente sendo tratado, e fatores similares bem conhecidos nas técnicas médicas. Um médico ou veterinário tendo

perícia vulgar na técnica pode prontamente determinar e prescrever a quantidade eficaz da composição farmacêutica requerida. Por exemplo, o médico ou veterinário pode iniciar doses dos compostos da invenção empregues na composição farmacêutica a níveis mais baixos do que aqueles requeridos de modo a alcançar o efeito terapêutico desejado e aumentar gradualmente a dosagem até ser alcançado o efeito desejado. Em geral, uma dose diária adequada de uma composição da invenção será aquela quantidade do composto que é a dose mais baixa eficaz para produzir um efeito terapêutico. Uma tal dose eficaz dependerá geralmente de fatores descritos acima. É preferencial que a administração sejam intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, ou subcutânea, preferencialmente administrada próxima do local do alvo. Se desejado, a dose diária eficaz de uma composição terapêutica pode ser administrada como duas, três, quatro, cinco, seis ou mais subdoses administradas separadamente a intervalos apropriados ao longo do dia, opcionalmente, em formas de dosagem unitária. Embora seja possível que um composto da presente invenção seja administrado sozinho, é preferencial administrar o composto como uma formulação farmacêutica (composição).

As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica. Por exemplo, numa forma de realização preferencial, uma composição terapêutica da invenção pode ser administrada com um dispositivo de injeção hipodérmica sem agulha, tais como os dispositivos divulgados nas Patentes dos E.U.A. Nos. 5,399,163, 5,383,851, 5,312,335, 5,064,413, 4,941,880, 4,790,824, ou 4,596,556. Exemplos de implantes e módulos bem conhecidos úteis na presente invenção incluem: Patente dos E.U.A. No. 4,487,603, que divulga uma bomba de microinfusão implantável para dispensa de medicação a uma taxa controlada; Patente dos E.U.A. No. 4,486,194, que

divulga um dispositivo terapêutico para administração de medicamentos através da pele; Patente dos E.U.A. No. 4,447,233, que divulga uma bomba de infusão de medicação para distribuição de medicação a uma taxa de infusão precisa; Patente dos E.U.A. No. 4,447,224, que divulga um aparelho de infusão implantável de fluxo variável para distribuição contínua de fármaco; Patente dos E.U.A. No. 4,439,196, que divulga um sistema de distribuição de fármacos osmóticos tendo compartimentos multicâmaras; e Patente dos E.U.A. No. 4,475,196, que divulga um sistema de distribuição de fármacos osmóticos. Muitos outros tais implantes, sistemas de distribuição, e módulos são conhecidos daqueles peritos na técnica.

Em certas formas de realização, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser formulados para assegurar distribuição conveniente *in vivo*. Por exemplo, a barreira sangue-cérebro (BBB) exclui muitos compostos altamente hidrofílicos. Para assegurar que os compostos terapêuticos da invenção atravessam a BBB (se desejado), eles podem ser formulados, por exemplo, em lipossomas. Para métodos de fabrico de lipossomas, ver, *p.ex.*, Patentes dos E.U.A. 4,522,811; 5,374,548; e 5,399,331. Os lipossomas podem compreender uma ou mais frações que são seletivamente transportadas em células ou órgãos específicos, intensificando assim a distribuição de fármacos direcionada (ver, *p.ex.*, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685). Frações direcionadas exemplares incluem folato ou biotina (ver, *p.ex.*, Patente dos E.U.A. 5,416,016 em nome de Low *et al.*); manosídeos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038); anticorpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357:140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180); recetor da proteína A de tensioativo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.*

1233:134), diferentes espécies das quais podem compreender as formulações das invenções, bem como componentes das moléculas inventadas; p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090); ver também K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBSLett.* 346:123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273. Numa forma de realização da invenção, os compostos terapêuticos da invenção são formulados em lipossomas; numa forma de realização mais preferencial, os lipossomas incluem uma fração direcionada. Numa forma de realização o mais preferencial, os compostos terapêuticos nos lipossomas são distribuídos por injeção de bólus a um local próximo do tumor ou infeção. A composição tem de ser fluida na medida em que exista seringabilidade fácil. Tem de ser estável sob as condições de fabrico e armazenamento e tem de ser conservada contra a ação contaminante de microrganismos tais como bactérias ou fungos.

Uma “dose terapeuticamente eficaz” para a artrite reumatoide resultará numa Definição Preliminar de Melhoria ACR20 nos pacientes, mais preferencial numa Definição Preliminar de Melhoria ACR50 e ainda mais preferencial numa Definição Preliminar de Melhoria ARCD70.

A Definição Preliminar de Melhoria ACR20 é definida como:

≥ 20% de melhoria em: Contagem de Articulações Sensíveis (TCJ) e Contagem de Articulações Inchadas (SWJ)
e ≥ 20% de melhoria em 3 das seguintes 5 avaliações:
Avaliação da Dor pelo Paciente (VAS), avaliação Global pelo Paciente (VAS), Avaliação Global pelo Médico (VAS), Incapacidade Autoavaliada Patente (HAQ), Reagente de Fase Aguda (CRP ou ESR).

ACR50 e ACR70 são definidas no mesmo modo com $\geq 50\%$ e $\geq 70\%$ de melhorias, respetivamente. Para detalhes adicionais, ver Felson *et al.* em *American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism* (1995) 38: 727-735.

A capacidade de um composto de inibir o cancro pode ser avaliada num sistema de modelo animal preditivo da eficácia em tumores humanos. Alternativamente, esta propriedade de uma composição pode ser avaliada por exame da capacidade do composto de inibir, tal Inibição *in vitro* por ensaios conhecidos do especialista perito. Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto terapêutico pode diminuir o tamanho do tumor, ou de outro modo melhorar os sintomas num sujeito. Um de perícia vulgar na técnica seria capaz de determinar tais quantidades com base em tais fatores como o tamanho do sujeito, a gravidade dos sintomas do sujeito, e a composição ou rota de administração particular seleccionada.

A capacidade dos anticorpos de tratar ou prevenir a cirrose pode ser também avaliada de acordo com métodos bem conhecidos na técnica.

A composição tem de ser estéril e fluida na medida em que a composição seja distribuível por seringa. Adicionalmente à água, o transportador pode ser uma solução salina tamponada isotónica, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares), e suas misturas adequadas. A fluidez conveniente pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partículas requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensioativos. Em muitos casos, é preferencial incluir agentes isotónicos, por exemplo,

açúcares, polialcoois tais como manitol ou sorbitol, e cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada por inclusão na composição de um agente que atrasa a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

Quando o composto ativo está adequadamente protegido, como descrito acima, o composto pode ser oralmente administrado, por exemplo, com um diluente inerte ou um transportador comestível assimilável.

V. Usos e Métodos da Invenção

Os anticorpos anti-HCV humanos para HCV da presente invenção (incluindo derivados e conjugados dos anticorpos) e composições contendo os anticorpos podem ser usados numa variedade de aplicações de diagnóstico e terapêuticas *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser usados para tratar distúrbios mediados pelos HCV, incluindo mas não se limitando a distúrbios do fígado, tais como cirrose, carcinoma hepatocelular, e hepatocarcinogénese.

Conformemente, ainda noutra forma de realização, a presente invenção proporciona um método para tratamento ou prevenção de um distúrbio mediado pelo HCV (p.ex., um distúrbio do fígado), por administração a um sujeito de um anticorpo humano da invenção numa quantidade eficaz para tratar ou prevenir o distúrbio. O anticorpo pode ser administrado sozinho ou em conjunto com outro agente terapêutico, tal como alfa-IFN ou uma citotoxina que atua em conjunto com ou sinergisticamente com o anticorpo para tratar ou prevenir a doença mediada pelo HCV. Outros distúrbios adequados para tratamento usando os anticorpos da invenção incluem patologias de hepatócitos mediadas pelo HCV, cirrose do

fígado mediada pelo HCV, e/ou cancro do fígado mediado pelo HCV.

Adicionalmente, os anticorpos da invenção podem ser usados *in vitro* ou *in vivo* para diagnosticar uma variedade de doenças mediadas pelo HCV. Especificamente, os anticorpos podem ser usados para detetar níveis de HCV, ou níveis de células que contêm HCV. Alternativamente, os anticorpos podem ser usados para inibir ou neutralizar a função do HCV a qual, por seu turno, pode prevenir ou melhorar os sintomas da doença causados pela função do HCV.

Também dentro do âmbito da presente invenção estão conjuntos compreendendo anticorpos humanos anti-HCV da invenção e, opcionalmente, instruções para uso. O conjunto pode adicionalmente conter um ou mais reagentes adicionais, tais como alfa-IFN ou um ou mais anticorpos humanos adicionais da invenção (p.ex., um anticorpo humano tendo uma atividade complementar que se liga a um epítopo de um antígeno de HCV distinto do primeiro anticorpo humano).

Conformemente, aos pacientes tratados com anticorpos da invenção pode ser adicionalmente administrado (antes da, simultaneamente com a, ou após administração de um anticorpo humano da invenção) outro agente terapêutico que intensifique ou aumente o efeito terapêutico dos anticorpos humanos.

Outras formas de realização da presente invenção são descritas nos seguintes Exemplos.

Exemplos

A invenção é adicionalmente descrita nos seguintes exemplos, que não limitam o âmbito da invenção descrito nas reivindicações.

Materiais e Métodos

Ao longo dos exemplos, os seguintes materiais e métodos foram usados a não ser que indicado de outro modo.

Em geral, a prática da presente invenção emprega, a não ser que indicado que outro modo, técnicas convencionais de química, biologia molecular, tecnologia de ADN recombinante, imunologia (especialmente, p.ex., tecnologia de anticorpos), e técnicas padrão em preparação de polipéptidos. Ver, p.ex., Sambrook, Fritsch e Maniatis, *Molecular Cloning*: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, 510, Paul, S., Humana Pr (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow et al, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); e *Current Protocols in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al, John Wiley & Sons (1992). Sistemas de modelo *in vitro* e *in vivo* para avaliação da biologia do HCV são descritos, por exemplo, em *Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C*, Lab. Anim. (NI).; 34(2): 39-47 (2005) e em *The chimpanzee model of hepatitis C virus infections*, ILAR J.;42(2): 117-26 (2001).

Montagem de constructo de expressão de E1/E2 de genótipo 1a do HCV otimizado quanto ao codão

Brevemente, uma sequência de ácido nucleico codificando uma sequência de proteína E2 de genótipo 1a, estirpe H77 (sequência 1a protótipo) (número do acesso do Genbank NC004102) foi construída e introduzida em vetor pCDNA. A sequência de nucleótidos foi alterada para uso de codão otimizado para expressão em mamíferos melhorada. A sequência foi montada usando RCP de sobreposição com

oligonucleótidos comprados da DDT e clonada no vetor de expressão pCDNA3.1-myc-his com HindIII e XbaI em grelha com o myc C-terminal e marcador de 6 histidinas. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto.

O codão de E1/E2 otimizou a sequência 1a de H77 com extremidades adicionadas contendo locais de restrição (minúscula em negrito), saliências adicionais para assegurar corte de enzima de restrição (minúscula sublinhada), e sequência de consenso de Kozak (minúscula a negrito sublinhada) com codão de iniciação ATG (maiúscula a negrito sublinhada) (ver SEQ ID NO: 27 e Figura 13).

Montagem de constructo de expressão de E2-661 de genótipo 1a do HCV otimizada quanto ao codão para expressar proteína E2 solúvel (pCDNA-1a-CO-E2-661)

A porção dos aminoácidos 364 a 661 codificando a proteína E2 foi amplificada por RCP usando pCDNA-1a-CO-E1/E2 como molde e clonada em vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal. O vetor foi sequenciado para confirmar que o constructo estava correto.

Expressão e purificação de E2-661 de genótipo 1a do HCV otimizada quanto ao codão

Células de cultura de tecido humano 293T foram transientemente transfectadas usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen). O sobrenadante das células contendo proteínas secretadas foi recolhido e E2-661 de 1a foi purificada do sobrenadante usando cromatografia de afinidade com níquel. A concentração de proteína foi determinada com base em OD 280 nm e adicionalmente avaliada por SDS-PAGE corada com Coomassie e transferência de Western com anticorpo de

camundongo E2 comercialmente disponível da Biodesign International

Montagem de vetor de expressão de E1/E2 de genótipo 1a do HCV do tipo selvagem (pCDNA-1a-E1/E2)

A E1/E2 da sequência codificante de H77 de HCV1a (aminoácidos 165-746) foi amplificada por RCP com iniciadores para introduzir locais de clonagem de HindIII e XbaI, uma sequência de consenso de Kozak e um codão de iniciação, e foi depois clonada no vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal. O vetor foi sequenciado para confirmar que o constructo estava correto.

Montagem de vetor de expressão de E2-660 de genótipo 1a do HCV do tipo selvagem (pCDNA-1a-E2-660)

A porção dos aminoácidos 364 a 660 codificando a proteína E2 foi amplificada por RCP usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde e clonada no vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal. O vetor foi sequenciado para confirmar que o constructo estava correto.

Montagem dos vetores de expressão de E1/E2 de genótipo 1b, 2b, 3a e 4a do HCV (pCDNA-E1/E2)

Soro de pacientes positivos quanto ao HCV de genótipo 1b, 2b, 3a e 4a de elevado título foi obtido e ARN foi isolado do soro. Foi realizada RT-RCP no ARN isolado com iniciadores específicos do genótipo complementares com a extremidade do gene do núcleo e para o gene p7 que flanqueia os genes E1/E2. Foi usada RCP para amplificar a sequência codificante de E1/E2 (aminoácidos 165-746) usando iniciadores para introduzir locais de clonagem de HindIII e XbaI, uma sequência de consenso de Kozak e um codão de

iniciação. A sequência foi clonada em vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal e depois sequenciada. Uma pesquisa blast confirmou que as sequências eram o genótipo esperado, mas as sequências não tiveram correspondência exata na base de dados.

Montagem de vetor de expressão de E2-661 de genótipo 1b do HCV (pCDNA-1b-E2-661)

Foi usada RCP para amplificar a porção dos aminoácidos 364 a 661 codificando a proteína E2 usando pCDNA-1b-E1/E2 como molde. A sequência foi depois clonada no vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto. A expressão e a purificação foram levadas a cabo essencialmente como descrito acima para E2-661 de 1a.

Montagem de vetor de expressão de deleção de HVR1 de E2 de genótipo 1a do HCV

De modo a gerar um constructo codificando E1/E2 com uma deleção dos nucleótidos codificando a região hipervariável 1 (HVR1) de E2, E1 foi amplificada por RCP usando um iniciador 3' contendo uma saliência para uma região de E2 começando com aminoácidos 411 (saltando os aminoácidos 384 a 410 de HVR1) usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde. Numa reação separada, a região de E2 codificando os aminoácidos 411-746 foi amplificada por RCP usando um iniciador 5' contendo uma saliência para a extremidade 3' de E1 usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde. Os produtos de RCP de E1 e E2 que continham saliências complementares na junção E1-E2 sem a região codificando a HVR1 para E2 foram misturados, e depois amplificados por RCP usando um iniciador específico para a extremidade 5' de E1 com um local HindIII e

extremidade 3' de E2 com um local XbaI. A sequência foi clonada em vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto.

Montagem de vetores de expressão de truncação de E2 de genótipo 1a do HCV otimizada por codão

Foram manipuladas trunicações para expressão em mamíferos nas quais aminoácidos do C-terminal de E2 foram removidos. A porção dos aminoácidos desejados codificando a proteína E2 foi amplificada por RCP usando pCDNA-1a-CO-E1/E2 como molde e clonada em vetor de expressão pCDNA3.1-his com HindIII e XbaI em grelha com o marcador de 6 histidinas C-terminal. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto. Os seguintes constructos foram preparados:

- pCDNA-1a-CO-E2-624 (aminoácidos 384 a 624 de E2)
- pCDNA-1a-CO-E2-584 (aminoácidos 384 a 584 de E2)
- pCDNA-1a-CO-E2-544 (aminoácidos 384 a 544 de E2)
- pCDNA-1a-CO-E2-504 (aminoácidos 384 a 504 de E2)
- pCDNA-1a-CO-E2-464 (aminoácidos 384 a 464 de E2)

A expressão e a purificação de cada constructo foram levadas a cabo essencialmente como descrito acima para E2-661 de 1a.

ELISA de Lectina

ELISA de captura da lectina foi levada a cabo com as trunicações de E2 para determinar a reatividade do anticorpo. Brevemente, placas de 96 poços foram revestidas com lectina de *Galanthus nivalis* (GNA). Trunicações de E2 dos sobrenadantes de células 293 transientemente

transfectadas foram adicionadas às placas de 96 poços revestidas com lectina de GNA de modo a capturar a proteína. Sobrenadante de hibridoma foi depois adicionado às placas de 96 poços para determinar a reatividade da proteína. O anticorpo ligado foi detetado com anticorpo secundário anti-humano em fosfatase alcalina e substrato PNPP.

Montagem de constructos de expressão bacteriana abrangendo aminoácidos 384 a 464 de glicoproteína E2 de genótipo 1a do HCV

Depois, foram construídas proteínas de fusão com fusão da triorredoxina N-terminal para expressão bacteriana de modo a permitir produção de pequenas porções de E2.

Para o primeiro conjunto de proteínas, a porção dos aminoácidos desejados codificando a proteína E2 foi amplificada por RCP usando pCDNA-1a-E1/E2 como molde e clonada em vetor de expressão com EcoRI e HindIII em grelha com o myc C-terminal e marcador de 6 histidinas. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto. Os seguintes constructos foram preparados:

- pET32-E2-A (aminoácidos 384 a 463)
- pET32-E2-B (aminoácidos 411 a 463)
- pET32-E2-C (aminoácidos 432 a 463)
- pET32-E2-D (aminoácidos 436 a 463)
- pET32-E2-E (aminoácidos 384 a 431)

Os vetores foram transformados em bactérias BL21-DE3 de *E. coli* (Invitrogen) e a expressão foi induzida com IPTG. As bactérias foram lisadas e as proteínas de interesse foram purificadas com cromatografia de afinidade com níquel. A concentração de proteína foi determinada com base em OD 250

nm e adicionalmente avaliada por SDS-PAGE corada com Coomassie e transferência de Western usando anticorpo de camundongo específico para myc e marcadores de histidina.

Para um segundo conjunto de proteínas, foram preparados oligonucleótidos fosforilados complementares que, quando emparelhados, teriam saliências de EcoRI e HindIII e codificariam os aminoácidos desejados. O ADN foi clonado em vetor de expressão pET32 com EcoRI e HindIII em grelha com o myc C-terminal e marcador de 6 histidinas. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto. Os seguintes constructos foram preparados:

- pET32-E2-G (aminoácidos 412 a 423)
- pET32-E2-H (aminoácidos 432 a 443)
- pET32-E2-I (aminoácidos 436 a 447)

A expressão e a purificação foram levadas a cabo essencialmente como descrito acima para o primeiro conjunto de proteínas.

Geração de mutantes de rastreio da alanina de epítipo 412-423 de E2 do HCV

Cada aminoácido no epítipo 412-423 foi separadamente mutado para uma alanina no constructo de expressão bacteriana para determinar os contactos de aminoácidos importantes para os anticorpos. Foram preparados oligonucleótidos fosforilados complementares que, quando emparelhados, teriam saliências de EcoRI e HindIII e codificariam a região 412-423 de E2 com as mudanças desejadas. O ADN foi clonado em vetor de expressão pET32 com EcoRI e HindIII em grelha com o myc C-terminal e marcador de 6 histidinas. O vetor foi depois sequenciado para confirmar que o constructo estava correto.

Os seguintes constructos foram preparados:

- pET32-E2-G-Q412A (aminoácido 412 de uma Q para uma A)
- pET32-E2-G-L413A
- pET32-E2-G-I414A
- pET32-E2-G-N415A
- pET32-E2-G-T416A
- pET32-E2-G-N417A
- pET32-E2-G-G418A
- pET32-E2-G-S419A
- pET32-E2-G-W420A
- pET32-E2-G-H421A
- pET32-E2-G-1422A
- pET32-E2-G-N423A

A expressão e a purificação foram levadas a cabo essencialmente como descrito acima para as outras proteínas bacterianas.

Geração de pseudovírus e ensaio de neutralização

Foi gerado um pseudovírus tendo uma estrutura principal de HIV que continha uma mutação para prevenir a expressão da glicoproteína do envelope do HIV e um gene de luciferase para direccionar a expressão de luciferase em células alvo (pNL4-3.Luc.R-E-). Glicoproteínas E1/E2 do HCV foram proporcionadas em trans por cotransfecção de células 293 com pcADN de E1/E2 derivado dos vários genótipos (1a, 1b, 2b, 3a e 4a) com pNL4-3.Luc.R-E-. O sobrenadante contendo partículas de vírus secretadas foi recolhido de células de 48 a 72 hrs pós-transfecção e concentrado usando concentradores Centricon 70 e/ou ultracentrifugação. O pseudovírus foi depois usado para infetar células Hep3B (ATCC) na presença ou ausência de anticorpo. O pseudovírus

foi pré-incubado com anticorpo durante 1 hr à temperatura ambiente antes da adição a células Hep3B. Após incubação durante 72 hrs, a infecção foi quantificada por detecção de luciferase com ensaio de luciferase BrightGlo (Promega) e lida num leitor de placas Victor3 (Perkin Elmer)

Determinação da afinidade por Biacore

IgG (Fc) de cabra-anti-humana foi acoplada por amida a um *chip* sensor CM5 da Biacore em célula de fluxo 1 e 2. Anticorpo humano (95-2 ou 83-128) foi capturado na célula de fluxo 2 usando somente tampão HBS-P (Biacore). E2-G fluiu sobre a célula de fluxo 1 (para fundo) e célula de fluxo 2 (para interação específica com anticorpo humano) a 125, 62,5, 31,3, e 15,6 nM em tampão HBS-P a 50 µL/min durante 200 seg. Após a injeção ter sido parada, o tampão fluiu sobre ambas as células de fluxo para recolher os dados de dissociação. Os dados foram avaliados e as curvas ajustadas para determinar a constante de afinidade usando o *software* BIAevaluation

Imunizações de camundongos

Os camundongos transgênicos quanto a genes de IgG humana (camundongos HuMab) da Medarex foram imunizados com proteína E2 solúvel para gerar uma resposta imune. O camundongo 85083 foi imunizado com E2-661 de 1a com adjuvante de Freund para 1 injeção e adjuvante MPL + TDM (Sigma) para 14 injeções. O camundongo 97895 foi imunizado com E2-661 de 1a com adjuvante MPL + TDM + CWS (Sigma) para 1 injeção e adjuvante MPL + TDM para 5 injeções.

Fusões esplênicas e seleção de hibridoma

Os baços do camundongo foram removidos e as células do baço foram isoladas. As células do baço foram fundidas com células do mieloma do camundongo seguindo um protocolo de

fusão de PEG padrão para gerar hibridomas. Os sobrenadantes do hibridoma foram depois rastreados quanto à produção de anticorpo reativo com E2-661 de 1a por ELISA e as células positivas foram avançadas para caracterização adicional.

Isolamento e sequenciação de genes de anticorpo do hibridoma

ARN foi isolado de células do hibridoma usando um conjunto RNeasy da Qiagen. Foi realizada RT-RCP para a região variável da cadeia pesada com iniciadores específicos do gene contendo locais de restrição, a sequência resultante foi clonada e o constructo foi sequenciado. Foi realizado RACE para a região variável da cadeia leve com iniciadores específicos do gene. A sequência foi clonada no vetor TOPO e o vetor foi sequenciado. Iniciadores específicos do gene foram desenhados e usados para amplificar por RCP e adicionar locais de restrição.

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Monoclonais Anti-HCV

Imunizações de camundongo, produção e seleção de hibridoma

Camundongos transgênicos compreendendo genes de imunoglobulina humana gerados como descrito acima na secção intitulada "Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos em Camundongos HuMab" e fornecidos pela Medarex, Milpitas, CA, foram imunizados com uma versão solúvel da glicoproteína do envelope E2 de genótipo 1a do HCV. O antígeno foi administrado em combinação com adjuvante de Freund completo ou RIBI. As respostas dos soros de camundongo foram monitorizadas por ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) de proteína E2 solúvel (E2-661 de 1a). Células B esplênicas foram isoladas do animal imunizado e fundidas com células do mieloma de camundongo (P3X-AG8.653) usando métodos de fusão de células do baço padrão. Hibridomas

clonais foram gerados e rastreados usando ELISA para produção de anticorpo reativo com E2-661. Os hibridomas positivos foram testados quanto à reatividade equivalente com E2-661 de genótipo 1a e genótipo 1b do HCV por ELISA com quantidades decrescentes de sobrenadante de hibridoma. Os hibridomas que exibiram reatividade equivalente aos genótipos 1a de E2-661 e 1b de E2-661 foram testados quanto à capacidade de neutralizarem a infectividade do pseudovírus do HCV de células Hep3B. Este processo de seleção originou 20 hibridomas que neutralizaram o pseudovírus do HCV e tinham reatividade equivalente a proteína solúvel E2 de 1a e 1b por ELISA. Especificamente, dezanove (19) hibridomas eram do camundongo #97895 e produziram anticorpo IgGI como se segue: 95-2; 95-14; 95-15; 95-18; 95-20; 95-21; 95-25; 95-26; 95-30; 95-38; 95-39; 95-42; 95-43; 95-48; 95-49; 95-52; 95-54; 95-58; e 95-62. Um (1) hibridoma, 83-128, que neutralizou pseudovírus do HCV e teve reatividade equivalente a proteína solúvel E2 de 1a e 1b por ELISA foi também identificado a partir do camundongo #85083 e produziu anticorpo IgG3. Um (1) hibridoma, 073-1, que neutralizou pseudovírus do HCV e teve reatividade equivalente a proteína solúvel E2 de 1a e 1b por ELISA foi também identificado a partir do camundongo #113073 e produziu anticorpo IgG3. Estes vinte e um (21) hibridomas foram adicionalmente caracterizados.

Sequenciação e clonagem de anticorpos

As sequências variáveis da cadeia pesada e leve dos anticorpos humanos 83-128 (do hibridoma do camundongo #85083) e 073-1 (do hibridoma do camundongo #113073) foram sequenciadas e clonadas em vetores contendo as regiões constantes da cadeia pesada e leve do anticorpo de IgGI/kappa humano. Isto mudou os anticorpos humanos 83-128 e 073-1 de um anticorpo de IgG3 para um anticorpo de IgGI.

As sequências variáveis da cadeia pesada dos anticorpos humanos dos dezanove (19) hibridomas do camundongo #97895 foram sequenciadas e comparadas. Descobriu-se que todos os dezanove (19) anticorpos partilhavam identidade de sequência substancial (*i.e.*, >96% idênticas). Três (3) hibridomas, 95-2, 95-14, e 95-38, foram escolhidos com base nos dados de ensaio de neutralização e as suas sequências variáveis da cadeia leve foram determinadas. As sequências das regiões variáveis da cadeia pesada e leve dos anticorpos humanos 95-2, 95-14, e 95-38 foram clonadas em vetores contendo as regiões constantes da cadeia pesada e leve para anticorpo de IgG1/kappa humano. O anticorpo foi expresso por transfecção transiente, purificado, e diretamente comparado num ensaio de neutralização de pseudovírus do HCV. O anticorpo humano 95-2 do camundongo #97895 foi selecionado para ser adicionalmente caracterizado.

As sequências de aminoácidos da região variável da cadeia pesada de anticorpos produzidos pelos clones 95-14, 95-49, 95-62, 95-42, 95-58, 95-25, 95-43, 95-54, 95-2, 95-38, 83-128, 073-1 são apresentadas em SEQ ID NOs:32, 37, 40, 35, 39, 34, 36, 38, 3, 33, 1 e 5 respetivamente. As sequências de aminoácidos da região variável da cadeia leve de anticorpos produzidos pelos clones 95-2, 95-14, 95-38, 073-1 e 83-128 são apresentadas em SEQ ID NOs:4, 44, 53, 6 e 2, respetivamente.

As sequências de nucleótidos codificando a região variável da cadeia pesada de anticorpos produzidos pelos clones 95-2, 95-14, 95-38, 073-1 e 83-128 são apresentadas em SEQ ID NOs:27, 48, 57, 29 e 25, respetivamente; e as sequências de nucleótidos codificando a região variável da cadeia leve de anticorpos produzidos pelos clones 95-2, 95-14, 95-38, 073-

1 e 83-128 são apresentadas em SEQ ID NOs:28, 49, 58, 30 e 26, respetivamente.

Exemplo 2: Caracterização de Anticorpos

ELISA de E2 solúvel - genótipo 1a e 1b do HCV

A reatividade do anticorpo humano 95-2 (Figura 1A) e do anticorpo 83-128 (Figura 1B) para E2-660 de genótipo 1a de HCV solúvel (triângulos) e E2-661 de genótipo 1b de HCV solúvel (quadrados) foi comparada. Placas de ELISA foram revestidas com 2 µg/mL de antigénio e sondadas com anticorpo em diluições de duas vezes. O anticorpo ligado foi detetado com anticorpo secundário de cabra-anti-humano conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP. Descobriu-se que ambos os anticorpos humanos, 95-2 e 83-128, reagiram equivalentemente com ambos os genótipos (ver Figura 1). Estas experiências foram também realizadas com os anticorpos 95-14, 95-38 e 073-1 e todos os três reconheceram o genótipo 1a e 1b equivalentemente (dados não mostrados).

Neutralização de pseudovírus do HCV de múltiplos genótipos

A capacidade dos anticorpos humanos 95-2 e 83-128 de neutralizarem os múltiplos genótipos de pseudovírus do HCV foi determinada usando células Hep3B. Diluições de cinco vezes de anticorpo foram incubadas com pseudovírus de HCV durante uma hora à temperatura ambiente. A mistura vírus-anticorpo foi adicionada a células Hep3B seguida por incubação a 37°C durante 72 horas. A infeção foi quantificada com ensaio de luciferase Brightlo e lida num leitor de placas Victor3 quanto a saída da luz. Um anticorpo humano irrelevante correspondido com isotipo foi usado como um controlo negativo. Descobriu-se que ambos os anticorpos humanos, 95-2 e 83-128, neutralizarem os

genótipos 1a, 1b, 2b, 3a e 4a do pseudovírus do HCV (ver Figuras 2A, 2B, 2C, 2D e 2E, respectivamente). Descobriu-se também que o anticorpo 073-1 neutralizou todos os pseudovírus listados acima (dados não mostrados).

Transferências de Western redutoras e não redutoras da proteína E2 de genótipo 1a e 1b solúvel

A reatividade de anticorpos humanos 95-2 e 83-128 com a proteína E2 solúvel (E2-661) do genótipo 1a e 1b do HCV sujeitos a SDS-PAGE redutora ou não redutora foi analisada. Foram realizadas transferências de Western com 83-128 e 95-2 monoclonais (his) anti-marcador de his, usando IgG anti-camundongo (his) ou IgG anti-humana (95-2 e 83-128) conjugada com HRP com reagente de detecção de quimioluminescência intensificado. Descobriu-se que ambos os anticorpos humanos 95-2 e 83-128 reconheceram a E2-661 sujeita a desnaturação, gel redutor seguido por transferência para membrana de PVDF (ver Figura 3).

Afinidade de ligação de anticorpos humanos 95-2 e 83-128 para epítipo 412-423 de E2 expresso como uma proteína de fusão bacteriana

A afinidade de ligação de anticorpos humanos 95-2 e 83-128 para epítipo 412-423 de E2 expresso como uma proteína de fusão bacteriana foi determinada e resumida na Figura 4. Fc de IgG de cabra anti-humana foi acoplada por amida ao *chip* da Biacore. Os anticorpos humanos 95-2 e 83-128 foram separadamente capturados no *chip* e a proteína expressa em bactérias E2-G contendo aminoácidos 412-423 de E2 fluiu a concentrações variáveis. O software BIAevaluation™ foi usado para ajustar as curvas e calcular as constantes de afinidade.

Exemplo 3: Determinação de epítopo

Determinação de qual a região da proteína E2 que os anticorpos humanos 83-128 e 95-2 reconhecem

Para determinar qual a região da proteína E2 que os anticorpos humanos 83-128 e 95-2 reconhecem, trunicações com terminal carboxi da proteína E2 expressa em mamíferos foram capturadas por ELISA de lectina e sondadas com 83-128 e 95-2 (ver Figura 5 para mapa de constructos e Figura 6 para dados de ELISA). Com base nos dados, o epítopo para estes anticorpos está dentro dos aminoácidos 412-464 de E2. Como esperado, todos os anticorpos (95-14, 95-49, 95-62, 95-42, 95-58, 95-25, 95-43, 95-54, 95-2, 95-38, e 073-1) também se situaram nesta região da proteína E2.

Para definir adicionalmente o epítopo, foi usada proteína de fusão expressa em bactérias porque os pedaços mais pequenos de E2 não se expressaram bem no sistema de mamífero. As proteínas purificadas foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com anticorpos humanos 83-128 e 95-2 (ver Figura 7 para mapa de constructos e Figura 8 para dados de ELISA). Ambos os anticorpos humanos 83-128 e 95-2 reconhecerem todos os constructos contendo aminoácidos 412-423 de E2, logo, identificando os aminoácidos 412-423 como o epítopo. Esta experiência foi também realizada usando o anticorpo 073-1 e também reconheceu o epítopo de 412-423 (dados não mostrados).

Para determinar os contactos importantes dentro do epítopo 412-423, foi usada mutagénese de rastreio da alanina para mudar individualmente cada aminoácido no epítopo 412-423 para uma alanina na proteína de fusão bacteriana E2-G. As proteínas purificadas foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com ambos os anticorpos humanos (83-128 e 95-2).

Um anticorpo monoclonal anti-his específico do marcador de epítipo (His)₆ nas proteínas de fusão foi usado para controlar o revestimento da placa (ver Figura 9). Com base nos dados, descobriu-se que os resíduos 413 e 420 eram críticos para ligação para o anticorpo humano 95-2; descobriu-se que os resíduos 413, 418 e 420 eram críticos para ligação para o anticorpo humano 83-128.

Para determinar a frequência das mudanças que ocorrem naturalmente dentro do epítipo 412-423, esta região da E2 foi analisada quanto a sequências relatadas na base de dados das sequências do HCV de Los Alamos que foram condensadas por otimização manual com sequências completas somente e sequências similares reduzidas a uma sequência. Com base do alinhamento (Figura 10), 77,7% das sequências na base de dados condensada são idênticas às sequências nesta região das proteínas E2 de 1a e 1b expressas usadas nos presentes exemplos. Conformemente, os anticorpos humanos 95-2 e 83-128 devem reconhecer estas proteínas.

Para determinar se algumas das diferenças entre sequências relatadas nesta região afetarão o reconhecimento do anticorpo humano 95-2 e 83-128, foram efetuadas mudanças de sequência na proteína de fusão expressa em bactérias E2-G contendo o epítipo 412-423 (Figura 11). Foi incluída uma sequência de uma estirpe de genótipo 5 relatada por Tarr *et al.* (2006) *Hepatology* (número de acesso do genbank AY785283) que não estava na base de dados. As proteínas purificadas foram revestidas numa placa de ELISA que foi sondada com ambos os anticorpos (83-128 e 95-2). Um anticorpo monoclonal anti-his específico para este marcador de his nas proteínas de fusão foi usado para controlar o revestimento da placa (Figura 12). O anticorpo humano 95-2 reconheceu todos os constructos, com a exceção do genótipo 6a, com uma redução de 10 vezes desta sequência de genótipo

5 específica. O anticorpo humano 83-128 reconheceu todos os constructos, exceto aqueles derivados da sequência de genótipo 5 e 6a específica, e teve fraco reconhecimento de 5a.

Exemplo 4: Modelo In Vitro

Anticorpos humanos da presente invenção são testados em modelos *in vitro* quanto à atividade antiviral e quanto à capacidade de inibir a infecção pelo HCV. Numerosos modelos *in vitro* para infecção pelo HCV são conhecidos na técnica e são usados para testar os anticorpos humanos da presente invenção, incluindo, p.ex., (i) infecção de hepatócitos primários com HCV; (ii) transfecção estável de linhas de células de hepatócitos; e (iii) transfecção com replicões de comprimento completo ou genômicos, como descrito, p.ex., em C. Guha *et al.* ("*Cell culture models and animal models of viral hepatitis. Part II: hepatitis C*" *Lab Animal* (NY) 2005, 34(2):39-47). Células cultivadas nestes modelos *in vitro* são expostas a anticorpos humanos da presente invenção, ou a anticorpos de controlo apropriados, e o efeito dos anticorpos na infecção pelo HCV e atividade viral é monitorizado por uso de técnicas padrão conhecidas na técnica, p.ex., por deteção de ARN viral de HCV, p.ex., transcrição reversa em tempo real/reação em cadeia da polimerase (RT/RCP).

Exemplo 5: Modelo Animal In Vivo

Anticorpos humanos da presente invenção são testados num modelo *in vivo* à capacidade de inibir infecção viral pela hepatite C. Em particular, os anticorpos humanos da presente invenção são testados num modelo animal de chimpanzé como descrito em R. E. Lanford *et al.* (*ILAR J.* 2001;42(2):117-26). Como descrito em Lanford *et al.*, o chimpanzé (trogloeditas Pan) é o único animal experimental

suscetível a infeção com vírus da hepatite C (HCV) e foi fundamental nos estudos iniciais de hepatite não A, não B, incluindo observações sobre o decurso clínico da infeção, determinação das propriedades físicas do vírus, e clonagem eventual do ácido nucleico do HCV. O modelo de chimpanzé tem sido crítico na análise de eventos iniciais na infeção pelo HCV porque representa uma população para a qual estão disponíveis amostras a partir do momento de exposição e todos os animais expostos são examinados. Por esta razão, o chimpanzé representa uma população verdadeiramente não selecionada. Em contraste, coortes humanas são frequentemente selecionadas quanto ao estado da doença ou reatividade de anticorpo e incluem tipicamente indivíduos que foram infetados durante décadas. O modelo de chimpanzé é essencial para um entendimento melhorado dos fatores envolvidos na eliminação viral, análise da resposta imune à infeção, e no desenvolvimento de vacinas. O desenvolvimento de clones de cADN infecciosos do HCV foi dependente do uso de chimpanzés, e eles continuarão a ser necessários no uso de genética reversa para avaliar sequências críticas para replicação viral. Adicionalmente, foram usados chimpanzés em conjunto com tecnologia de microrrede de ADN para sondar o espectro inteiro de mudanças na expressão do gene do fígado durante o decurso da infeção pelo HCV. O chimpanzé continuará a proporcionar um aspeto crítico ao entendimento da doença do HCV e ao desenvolvimento de modalidades terapêuticas.

Conformemente, os chimpanzés são inoculados com HCV e é-lhes adicionalmente administrado um anticorpo humano da presente invenção. Animais de controlo são inoculados com HCV e ou é-lhes administrado um anticorpo humano da presente invenção ou é-lhes administrado um anticorpo de controlo apropriado. Os anticorpos humanos da invenção são administrados aos chimpanzés ou antes da inoculação do HCV,

aquando da inoculação do HCV ou subsequente à inoculação do HCV. Os efeitos do anticorpo humano na infecção, progresso e eliminação de HCV são depois monitorizados por uso de ensaios padrão na técnica. Por exemplo, a infecção e/ou eliminação do HCV pode ser monitorizada por: (i) medição de aumentos nos níveis de alanina amino transferase (ALT) no soro, indicando dano no fígado; (ii) detecção de ARN viral do HCV no soro por, p.ex., transcrição reversa em tempo real, quantitativa/reação em cadeia da polimerase (RT/RCP); e (iii) avaliação da resposta de anticorpo anti-HCV, p.ex., por ensaios imunoabsorvente ligado a enzima e de imunotransferência recombinante. Estes ensaios são conhecidos daqueles de perícia vulgar na técnica e são levados a cabo, por exemplo, como descrito em Lanford *et al.*. Adicionalmente, em experiências similares àquelas descritas acima, os efeitos dos anticorpos da invenção na resposta às proteínas E1 e/ou E2 do HCV são avaliados, p.ex., como descrito em Lanford *et al.*. A modulação por baixo da infecção pelo HCV, uma diminuição no progresso do HCV ou um aumento na eliminação do HCV nos animais expostos a um anticorpo humano da invenção, em comparação com animais de controlo, é indicativo da eficácia do anticorpo para prevenir ou tratar a infecção pelo HCV.

Adicionalmente, são usadas microrredes de ADN para monitorizar os efeitos dos anticorpos humanos da invenção nas mudanças progressivas na infecção pelo HCV no chimpanzé por monitorização de mudanças na expressão de genes no fígado de animais infetados em múltiplos pontos de tempo durante a fase aguda de infecção e através de eliminação viral. A análise de microrredes de ADN é conduzida em tecido do fígado obtido antes da infecção e em múltiplos pontos de tempo ao longo da infecção e eliminação, p.ex., até à semana 16 após infecção, em animais expostos ao anticorpo e em animais de controlo não expostos ao

anticorpo. Estes estudos podem ser conduzidos, por exemplo, com a microrrede de ADN Human FL da Affymetrix, que contém oligonucleótidos representativos de aproximadamente 6800 genes, essencialmente como descrito em Lanford *et al.*.

Exemplo 5: Produção de anticorpos anti-HCV para administração em humanos

Anticorpos humanos da presente invenção podem ser clonados e recombinantemente expressos para facilitar ou aumentar a sua produção usando técnicas conhecidas.

Sequências de ácido nucleico codificando a cadeia pesada variável e as cadeias leves de um clone de anticorpo da invenção podem ser clonados num vetor pIE-Ugamma1F usando metodologia de ADN recombinante padrão. O vetor é amplificado em *E. coli*, purificado, e transfectado em células de CHO. As células transfectadas são plaqueadas a 4×10^5 células por poço num prato de 96 poços e selecionadas quanto à transfecção do vetor com G418. Os clones resistentes selecionados por resistência a G418 são depois avaliados em conjunto com outros transfectomas quanto à produção de IgG. A expressão de um anticorpo pode ser amplificada por crescimento na presença de concentrações crescentes de metotrexato. Uma cultura capaz de crescimento em metotrexato a 175 nM é escolhida para clonagem de células únicas para desenvolvimento adicional. O plaqueamento da cultura em placas de 96 poços a baixa densidade permitiu geração de culturas tendo origem de uma única célula ou clones. As culturas são rastreadas quanto à produção de IgG. A expressão de um anticorpo pode ser amplificada por crescimento na presença de concentrações crescentes de metotrexato. Uma cultura capaz de crescimento em metotrexato a 175 nM é escolhida para clonagem de células únicas para desenvolvimento adicional. O

plaqueamento da cultura em placas de 96 poços a baixa densidade permitiu geração de culturas tendo origem de uma única célula ou clones. As culturas são rastreadas quanto à produção de IgG humana, e a célula que produz o nível mais elevado de IgG é tipicamente selecionada para uso adicional. O clone amplificado por metotrexato é expandido para produzir um banco de células incluindo múltiplos frascos congelados de células. Alternativamente, podem ser usados vetores de glutamina sintetase (GS) com seleção de células alcançada usando, p.ex., metionina sulfoximina (ver, p.ex., Patentes dos E.U.A. Nos. 5,827,739; 5,122,464; 5,879,936; e 5,891,693).

Para preparar anticorpos a partir de células transfectadas, células de um clone isolado nos passos prévios são cultivadas e expandidas como inóculo para um biorreator. O biorreator contém tipicamente um volume de meio de cultura de 500 litros. As células são cultivadas no biorreator até a viabilidade celular cair, o que indica que uma concentração de anticorpos máxima foi produzida na cultura. As células são removidas por filtração. O filtrado é aplicado a uma coluna de proteína A. Os anticorpos ligam-se à coluna, e são eluídos com uma lavagem de pH baixo. De seguida, os anticorpos são aplicados a uma coluna de Q-Sepharose para remover contaminantes residuais, tais como proteínas das células de CHO, ADN, e outros contaminantes (p.ex., contaminantes virais, se presentes). Os anticorpos são eluídos da coluna de Q-Sepharose, nanofiltrados, concentrados, e lavados num tampão tal como PBS. São preparadas alíquotas aseticamente a partir da preparação em frascos para administração.

SUMÁRIO DA LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

SEQ ID NO.	Tipo	Descrição da Sequência
1	AA	VH de clone 83-128
2	AA	VL de clone 83-128
3	AA	VH de clone 95-2
4	AA	VL de clone 95-2
5	AA	VH de clone 073-1
6	AA	VL de clone 073-1
7	AA	CDR1 de VH de clone 83-128
8	AA	CDR2 de VH de clone 83-128
9	AA	CDR3 de VH de clone 83-128
10	AA	CDR1 de VH de clone 95-2
11	AA	CDR2 de VH de clone 95-2
12	AA	CDR3 de VH de clone 95-2
13	AA	CDR1 de VH de clone 073-1
14	AA	CDR3 de VH de clone 073-1
15	AA	CDR3 de VH de clone 073-1
16	AA	CDR1 de VL de clone 83-128
17	AA	CDR2 de VL de clone 83-128
18	AA	CDR3 de VL de clone 83-128
19	AA	CDR1 de VL de clone 95-2
20	AA	CDR2 de VL de clone 95-2
21	AA	CDR3 de VL de clone 95-2
22	AA	CDR1 de VL de clone 073-1
23	AA	CDR2 de VL de clone 073-1
24	AA	CDR3 de VL de clone 073-1
25	NA	VH de clone 83-128
26	NA	VL de clone 83-128
27	NA	VH de clone 95-2
28	NA	VL de clone 95-2
29	NA	VH de clone 073-1
30	NA	VL de clone 073-1
31	NA	H77 de E1/E2 de 1a (Figura 13)
32	AA	VH de clone 95-14 (Figura 14)
33	AA	VH de clone 95-38 (Figura 14)

SEQ ID NO.	Tipo	Descrição da Sequência
34	AA	VH de clone 95-25 (Figura 14)
35	AA	VH de clone 95-42 (Figura 14)
36	AA	VH de clone 95-43 (Figura 14)
37	AA	VH de clone 95-49 (Figura 14)
38	AA	VH de clone 95-54 (Figura 14)
39	AA	VH de clone 95-58 (Figura 14)
40	AA	VH de clone 95-62 (Figura 14)
41	AA	CDR1 de VH de clone 95-14
42	AA	CDR2 de VH de clone 95-14
43	AA	CDR3 de VH de clone 95-14
44	AA	VL de clone 95-14
45	AA	CDR1 de VL de clone 95-14
46	AA	CDR2 de VL de clone 95-14
47	AA	CDR3 de VL de clone 95-14
48	NA	VH de clone 95-14
49	NA	VL de clone 95-14
50	AA	CDR1 de VH de clone 95-38
51	AA	CDR2 de VH de clone 95-38
52	AA	CDR3 de VH de clone 95-38
53	AA	VL de clone 95-38
54	AA	CDR1 de VL de clone 95-38
55	AA	CDR2 de VL de clone 95-38
56	AA	CDR3 de VL de clone 95-38
57	NA	VH de clone 95-38
58	NA	VL de clone 95-38
59	AA	412-423 de E2 (1a) QLINTNGSWHIN (Figura 10)
60	AA	(1b) QLVNTNGSWHIN (Figura 10)
61	AA	QLVNSNGSWHIN (Figura 10)
62	AA	QLINSNGSWHIN (Figura 10)
63	AA	HLINTNGSWHIN (Figura 10)
64	AA	QLIKTNGSWHIN (Figura 10)
65	AA	QLVNTNGSWHVN (Figura 10)
66	AA	QFVNTNGSWHIN (Figura 10)
67	AA	QLIKNGSSWHIN (Figura 10)

SEQ ID NO.	Tipo	Descrição da Sequência
68	AA	QLVKTNGSWHIN (Figura 10)
69	AA	HLVNTNGSWHIN (Figura 10)
70	AA	HLVNSNGSWHIN (Figura 10)
71	AA	QLIHTNGSWHIN (Figura 10)
72	AA	QLVKTEGNWHIN (Figura 10)
73	AA	NLIKTNGSWHIN (Figura 10)
74	AA	QLIYTNGSWHIN (Figura 10)
75	AA	QLINTNGSWHLN (Figura 10)
76	AA	YLINTNGSWHIN (Figura 10)
77	AA	SLINTNGSWHIN (Figura 10)
78	AA	NLINTNGSWHIN (Figura 10)
79	AA	HLVNSNGSWHIN genótipo 2b (Figura 11)
80	AA	QLVNSSGSWHIN genótipo 3a (Figura 11)
81	AA	QLINSNGSWHIN genótipo 4a (Figura 11)
82	AA	QLIQNGSSWHIN genótipo 5 (Figura 11)
83	AA	QFVNTNGSWHIN genótipo 5a (Figura 11)
84	AA	QLIKNGSSWHIN genótipo 6a (Figura 11)
85	AA	QLIKTNGSWHIN genótipo 6g (Figura 11)
86	AA	QLINSNGSWHVN genótipo 6k (Figura 11)
87	AA	Sequência de consenso de CDR1 de VH
88	AA	Sequência de consenso de CDR2 de VH
89	AA	Sequência de consenso de CDR3 de VH
90	AA	Sequência de consenso de CDR1 de VL
91	AA	Sequência de consenso de CDR2 de VL
92	AA	Sequência de consenso de CDR3 de VL

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> UNIVERSIDADE DE MASSACHUSETTS

<120> ANTICORPOS HUMANOS CONTRA VÍRUS DA HEPATITE C (HCV)
E SEUS USOS

<130> MJI-005PC

<140> Concurrentemente Com este

<141> Concurrentemente Com este

<150> 60/902,432

<151> 2007-02-21

<160> 92

<170> PatentIn versão 3.3

<210> 1

<211> 123

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 1

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr
20           25           30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35           40           45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Glu Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Arg Asp Ile Ser Leu Val Arg Asp Ala Phe Ile Tyr Phe Asp Phe
100          105          110

Trp Gly Leu Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 2

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 2

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1           5           10           15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20           25           30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35           40           45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50           55           60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65           70           75           80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr
85           90           95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100          105

```

<210> 3

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 3

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

 $\langle 210 \rangle$ 5

<211> 126

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

```
<223>  Descrição de Sequência Artificial: Constructo
sintético
```

 $\langle 400 \rangle$ 5

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Tyr Ser Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Pro Thr Asn Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Tyr
 100 105 110

Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 6

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 6

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Thr Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 7

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 8

Val Ile Trp Phe Asp Glu Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 9

Ala Arg Asp Ile Ser Leu Val Arg Asp Ala Phe Ile Tyr Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 10

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 11

Val Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 12

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Val Arg Gly Phe Phe Ile Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 13

Asn Tyr Gly Met His
1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 14

Val Ile Trp Tyr Asp Glu Asn Asn Arg Tyr Ser Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15

<211> 19

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 15

Ala Arg Asp Pro Thr Asn Tyr His Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Ile Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Tyr

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 16

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 17

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 18

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 18

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Ile Thr
1 5

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 19

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 20

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 21

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 21

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 23

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 24

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5

<210> 25

<211> 369

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 25

```

caggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggagatc cctgagactc      60
tcctgtacag cgtctggatt caccttcaat aactatggca tgcactgggt ccgccagact      120
ccaggcaagg ggctggagtg gctggcagtt atatggtttg atgaaaataa taagtactat      180
gcagactccg tgagggggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt      240
ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaagac acggctatgt attattgtgc gagagatatt      300
tctctggttc gggatgcttt tatctacttt gacttctggg gcctgggaac cctggtcacc      360
gtctcctca                                     369

```

<210> 26

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 26

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtcg gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120
ggccaggtc cagggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggatcacctt cggccaaggg      300
acacgactgg agatcaaa                                     318

```

<210> 27

<211> 372

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 27

```

caggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc    60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct    120
ccaggcaagg ggctggaatg ggtggcagtt atatggtttg atggaaataa tcaatactat    180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat    240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacatc    300
tttactgtgg ttcggggatt ttttatctac ttgactact ggggccaggg aaccctggtc    360
accgtctcct ca                                                                372

```

<210> 28

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 28

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc    60
ctctcctgca gggccagtc gagtggtggc agctacttag cctggtacca acagaaacct    120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc    180
aggttcagtg gcagtggttc tgggacagac ttactctca ccatcagcag cctagagcct    240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cgccaaggg    300
acacgactgg agatcaaa                                                                318

```

<210> 29

<211> 378

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 29

```

caggtgcagc tggaggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatggca tgcactgggt ccgccaggct      120
ccaggcaagg ggctggagtg gatggcagtt atctggtatg atgaaaataa tagatactct      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagatcct      300
acgaattacc atggttcggg gagttattat atctactttg actactgggg ccagggaacc      360
ctggtcaccc tctcctca                                     378

```

<210> 30

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 30

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtcg gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcac cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cggccaaggg      300
acacgactgg agatcaaa                                     318

```

<210> 31

<211> 1785

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 31

```

cgctatagaa gcttgccgcc accatggcca ccggcaacct gcccggtgc tccttctcca      60
tcttcctgct ggccctgctg tcctgcctga ccgtgcccgc ctccgcctac caggtgcgca      120
actcctccgg cctgtaccac gtgaccaacg actgccctaa ctccctccatc gtgtacgagg      180
ccgccgacgc catcctgcac actcctggct gcgtgccctg cgtgcgcgag ggcaacgcct      240
cccgtgctg ggtggccgtg actcctaccg tggccaccgc cgacggcaag ctgcccacca      300
cccagctgcg ccgccacatc gacctgctgg tgggtccgc caccctgtgc tccgccctgt      360
acgtgggcga cctgtgcggc tcctgtgtcc tgggtgggca gctgttcacc ttctctctc      420
gccgccactg gaccaccag gactgcaact gctccatcta ccctggccac atcacggcc      480
accgcatggc ctgggacatg atgatgaact ggtctccac cgcgcacctg gtggtggccc      540
agctgctgcg catccctcag gccatcatgg acatgatcgc cggcgccca tggggcgtcc      600
tggccggcat cgcctacttc tccatggtgg gcaactgggc caaggtgctg gtggtgctgc      660
tgctgttcgc cggcgtggac gccgagacc acgtgacggg cggctccgc ggccgcacca      720
ccgccggcct ggtgggcctg ctgacaccgc gcgccaagca gaacatccag ctgatcaaca      780
ccaacggctc ctggcacatc aactccaccg cctgaactg caacgagtcc ctgaacaccg      840
gctggctggc cggcctgttc taccagcaca agttcaactc ctccggctgt cccgagcgcc      900
tggcctcctg ccgccgcctg accgacttcg cccagggctg gggccctatc tcctacgcca      960
acggctccgg cctggacgag cggccctact gctggcacta ccctcctcgc cctgcgga      1020
tcgtgcccgc caagtccgtg tgccgccctg tgtactgctt cactccctct cccgtggtgg      1080
tgggcaccac cgaccgctcc ggcgtccca cctactcctg gggcgccaac gacaccgacg      1140
tgttcgtgct gaacaacacc cgcctcctc tgggcaactg gttcggtgc acctggatga      1200
actccaccgg cttaccaag gtgtgcggcg cgcctcctg cgtgatcggc ggcgtgggca      1260
acaacaccct gctgtgccct accgactgct tccgcaagca tcccgaggcc acctactccc      1320
gctgcggctc cgggccctgg atcactcctc gctgcatggt ggactatccc taccgcctgt      1380
ggcactatcc ctgcaccatc aactacacca tcttcaaggc gcgcatgtac gtggcgggcg      1440
tggagcaccg cctggaggcg gcgtgcaact ggacccgcgg cgagcgctgc gacctggagg      1500
accgcgaccg ctccgagctg tctcctctgc tgctgtccac caccagtggt caggtgctgc      1560
cctgctcctt caccaccctg ccgcgcgtgt ccaccggcct gatccacctg caccagaaca      1620
tcgtggacgt gcagtacctg tacggcgtgg gtcctccat cgcgtcctgg gcgatcaagt      1680
gggagtacgt ggtgctgctg ttcctgctgc tggcggacgc gcgcgtgtgc tcctgcctgt      1740
ggatgatgct gctgatctcc caggcggagg cgtctagagg agtca      1785

```

<210> 32

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 32

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Leu Ser Ser Tyr
20           25           30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100          105          110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 33

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 33

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1          5          10          15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20          25          30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35          40          45

Ala Val Ile Trp Leu Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
          50          55          60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
65          70          75          80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Ala Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe Asp
          100          105          110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115          120

```

<210> 34

 $\langle 211 \rangle$ 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 34

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
20           25           30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35           40           45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50           55           60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85           90           95

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Asp Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
100          105          110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115          120

```

<210> 35

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 35

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

<210> 37

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 37

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

<210> 38

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
 100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 39

<211> 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 39

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

115

120

<210> 40

 $\langle 211 \rangle$ 124

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

 $\langle 220 \rangle$

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

 $\langle 400 \rangle \quad 40$

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

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 41

Ser Tyr Gly Met His
 1 5

<210> 42

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 42

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 43

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 43

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Met Val Arg Gly Val Phe Ile Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 44

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 44

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 45

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 46

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 47

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 47

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5

<210> 48

<211> 372

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 48

cagggtgcagc tgggtggagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cgtctggatt catcctcagt agctatggca tgcactgggt ccgccaggct	120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggtatg atggaaataa taaatactat	180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagacatc	300
tttactatgg ttcggggagt ttttatctac ttgactact ggggccaggg aaccctggtc	360
accgtctcct ca	372

<210> 49

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 49

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc    60
ctctcctgca gggccagtc gagtgttggc agctacttag cctggtagca acagaaacct    120
ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc    180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct    240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cggccaaggg    300
acacgactgg agatcaaa                                     318

```

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 50

```

Ser Tyr Gly Met His
1           5

```

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 51

```

Val Ile Trp Leu Asp Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1           5           10           15

```

Gly

<210> 52

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 52

Ala Arg Asp Ile Phe Thr Val Ala Arg Gly Val Ile Ile Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Tyr

<210> 53

<211> 106

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 53

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 54
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 54

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 55
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 55

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 56
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 56

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Val Thr
1 5

<210> 57

<211> 372

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 57

```

caggtgcaac tggtggagtc tgggggaggc gtggtcagc ctgggaggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt agctatggca tgcactgggt ccgcccaggt      120
ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atatggcttg atggaagtaa cacatactat      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatt tctagagaca attccaagaa cacgctgttt      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggotgtgt attactgtgc gagagacatc      300
tttactgtgg ctcggggagt tattatctac tttgactact ggggccaggg aaccctggtc      360
accgtctcct ca                                     372

```

<210> 58

<211> 318

<212> DNA

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Constructo sintético

<400> 58

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtccttgt ctccagggga aagagccacc      60
ctctcctgca gggccagtc gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct      120
ggccaggtc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggcactgg catccagcc      180
aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct      240
gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact gggtcacctt cggccaaggg      300
acacgactgg agatcaaa                               318

```

<210> 59

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 59

Gln	Leu	Ile	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn
1				5					10		

<210> 60

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 60

Gln	Leu	Val	Asn	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn
1				5					10		

<210> 61

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 61

Gln	Leu	Val	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn
1				5					10		

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 62

Gln	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn
1				5					10		

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 63

His Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 64

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 64

Gln Leu Ile Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 65

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 65

Gln Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Val Asn
1 5 10

<210> 66

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 66

Gln Phe Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 67

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 67

Gln Leu Ile Lys Asn Gly Ser Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 68

Gln Leu Val Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 69
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 69

His Leu Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 70
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 70

His Leu Val Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 71
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 71

Gln Leu Ile His Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 72
 <211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 72

Gln Leu Val Lys Thr Glu Gly Asn Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 73

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 73

Asn Leu Ile Lys Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 74

Gln Leu Ile Tyr Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 75

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 75

Gln Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Leu Asn
1 5 10

<210> 76

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 76

Tyr Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 77

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 77

Ser Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 78

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 78

Asn Leu Ile Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 79

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 79

His Leu Val Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 80

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 80

Gln Leu Val Asn Ser Ser Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 81
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 81

Gln Leu Ile Asn Ser Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 82
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 82

Gln Leu Ile Gln Asn Gly Ser Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 83
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 83

Gln Phe Val Asn Thr Asn Gly Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 84
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Vírus da hepatite C
 <400> 84

Gln Leu Ile Lys Asn Gly Ser Ser Trp His Ile Asn
1 5 10

<210> 85
 <211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 85

Gln	Leu	Ile	Lys	Thr	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Ile	Asn
1				5					10		

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> Vírus da hepatite C

<400> 86

Gln	Leu	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Ser	Trp	His	Val	Asn
1				5					10		

<210> 87

<211> 5

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1) .. (1)

<223> aminoácido variável polar pequeno

<400> 87

Xaa	Tyr	Gly	Met	His
1			5	

<210> 88

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (4)..(4)

<223> aminoácido variável

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> aminoácido variável

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> aminoácido variável polar pequeno

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> aminoácido variável

<220>

<221> MOD_RES

<222> (15)..(15)

<223> aminoácido variável hidrofóbico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (16)..(16)

<223> aminoácido variável polar positivamente carregado

<400> 88

Val Ile Trp Xaa Asp Xaa Xaa Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Xaa Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 89

<211> 17

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (5)..(5)

<223> Phe ou não presente

<220>

<221> MOD_RES

<222> (6)..(6)

<223> Ser ou Thr

<220>

<221> MOD RES

<222> (7)..(7)

<223> aminoácido variável hidrofóbico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (8)..(8)

<223> aminoácido variável

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> aminoácido variável pequeno

<220>

<221> MOD_RES

<222> (11)..(11)

<223> aminoácido variável

<220>

<221> MOD_RES

<222> (12)..(12)

<223> aminoácido hidrofóbico variável

<220>

<221> MOD_RES

<222> (17)..(17)

<223> aminoácido aromático variável

<400> 89

Ala	Arg	Asp	Ile	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Ile	Tyr	Phe	Asp
1				5					10					15	

Xaa

<210> 90

<211> 11

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> aminoácido variável

<400> 90

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Xaa	Ser	Tyr	Leu	Ala
1				5					10	

<210> 91

<211> 7

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<400> 91

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 92

<211> 8

<212> PRT

<213> Sequência Artificial

<220>

<223> Descrição de Sequência Artificial: Péptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

<222> (7)..(7)

<223> aminoácido pequeno hidrofóbico variável

<400> 92

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Xaa Thr
1 5

Lisboa, 08 de Abril de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um anticorpo monoclonal humano isolado, ou sua porção de ligação do antígeno, em que o anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, compreende:
 - (a) regiões variáveis da cadeia pesada e leve compreendendo SEQ ID NOs:1 e 2; ou
 - (b) uma sequência da CDR3 da região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:9, uma sequência da CDR3 da região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:18, uma sequência da CDR2 da região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:8, uma sequência da CDR2 da região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:17, uma sequência da CDR1 da região variável da cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO:7 e uma sequência da CDR1 da região variável da cadeia leve compreendendo SEQ ID NO:16.
2. O anticorpo da reivindicação 1, em que o anticorpo é um anticorpo de comprimento total.
3. O anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, da reivindicação 1 que:
 - compreende um domínio Fc; ou
 - é um anticorpo de cadeia única; ou
 - é um fragmento Fab.
4. Um polipéptido isolado compreendendo a porção de ligação do antígeno de um anticorpo de qualquer uma das reivindicações precedentes.

5. Uma composição compreendendo o anticorpo ou sua de ligação do antigénio de qualquer uma das reivindicações precedentes e um transportador farmacêuticamente aceitável.
6. Um ácido nucleico isolado codificando uma região variável de um anticorpo que se liga ao HCV, compreendendo o referido ácido nucleico SEQ ID NO:25 e SEQ ID NO:26.
7. Um vetor de expressão ou uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico da reivindicação 6.
8. Um conjunto compreendendo um ou mais anticorpos monoclonais isolados, ou suas porções de ligação do antigénio, como recitado em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e instruções para uso no tratamento de uma doença mediada pelo HCV.
9. Um anticorpo monoclonal isolado, ou sua porção de ligação do antigénio, de qualquer uma das reivindicações 1 a 3 para uso num método de tratamento de uma infeção pelo HCV num sujeito.
10. Um anticorpo, ou sua porção de ligação do antigénio, de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para uso num método de tratamento de uma infeção pelo HCV de acordo com a reivindicação 9 em que:
 - (a) o sujeito é humano; ou
 - (b) o anticorpo, ou sua porção de ligação do antigénio, é para administração intravenosa, intramuscular ou subcutânea.

11. Um anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para uso num método de tratamento de uma infeção pelo HCV de acordo com a reivindicação 9 em que o método compreende administração do referido anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, em combinação com um segundo agente terapêutico que é selecionado de:

- (i) um segundo anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno;
- (ii) um agente antiviral; ou
- (iii) uma vacina contra o HCV, que é opcionalmente uma proteína E2 do HCV ou seu fragmento.

12. Uma composição para uso num método de tratamento de uma doença ou distúrbio mediado pelo HCV num mamífero, em que a referida composição compreende o anticorpo, ou sua porção de ligação do antígeno, de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, num transportador farmacologicamente aceitável.

13. Uma composição da reivindicação 12 para uso num método de tratamento de uma doença ou distúrbio mediado pelo HCV de acordo com a reivindicação 12, em que a referida composição compreende adicionalmente um segundo anticorpo que se liga ao HCV.

14. Um método de deteção de uma infeção pelo HCV num mamífero compreendendo contacto de um fluido corporal obtido de um mamífero com um anticorpo de qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou sua porção de ligação do antígeno, e determinação se ocorre ligação, sendo a referida ligação indicativa da presença de uma infeção pelo HCV.

Lisboa, 08 de Abril de 2014

Figura 1A: 95-2

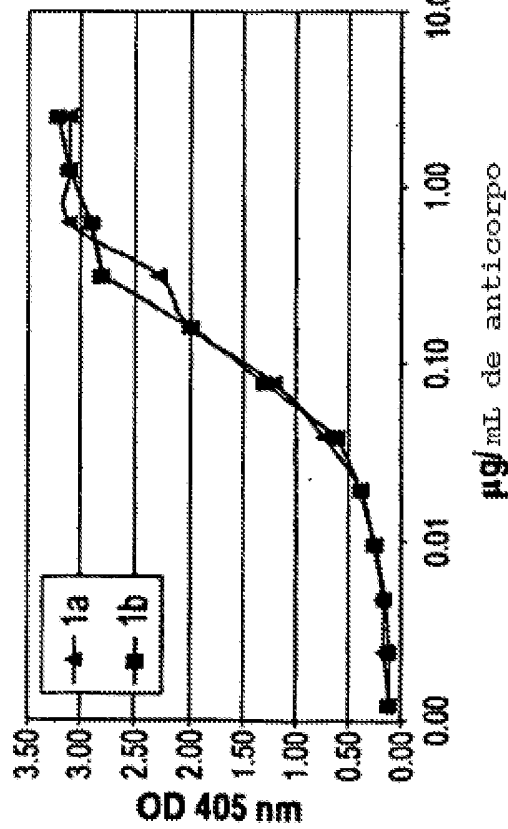
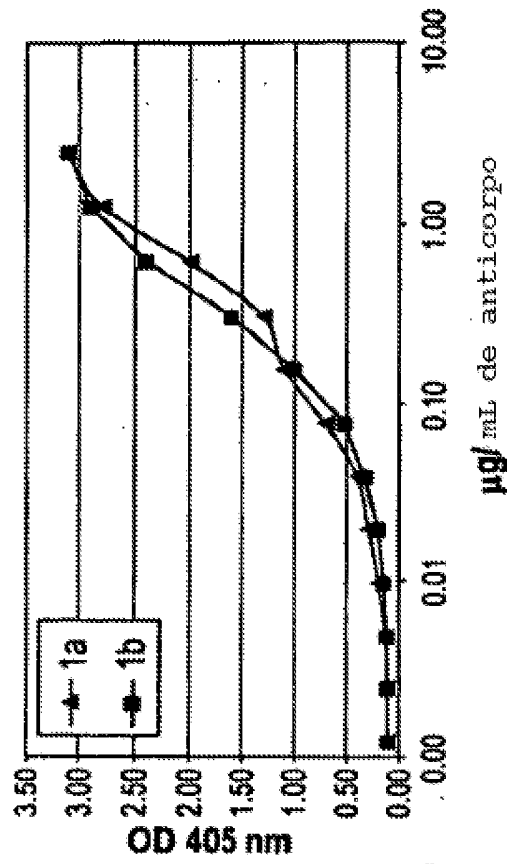


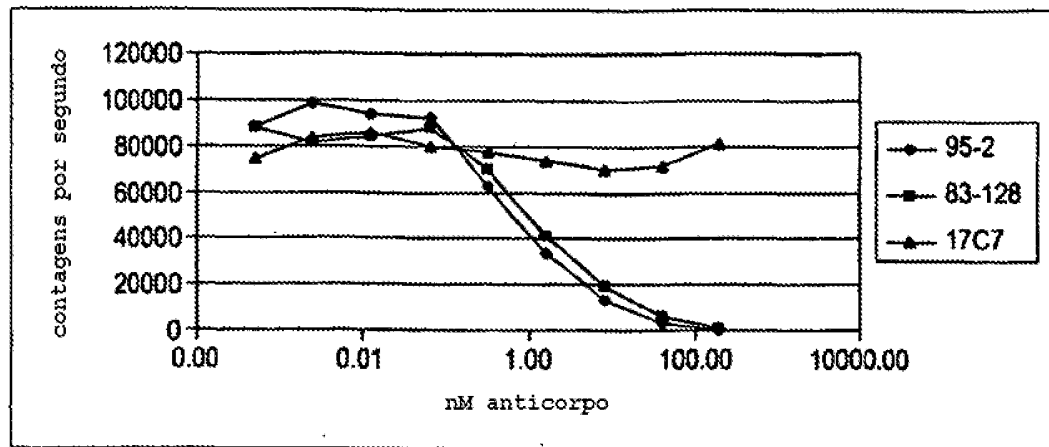
Figura 1B: 83-128



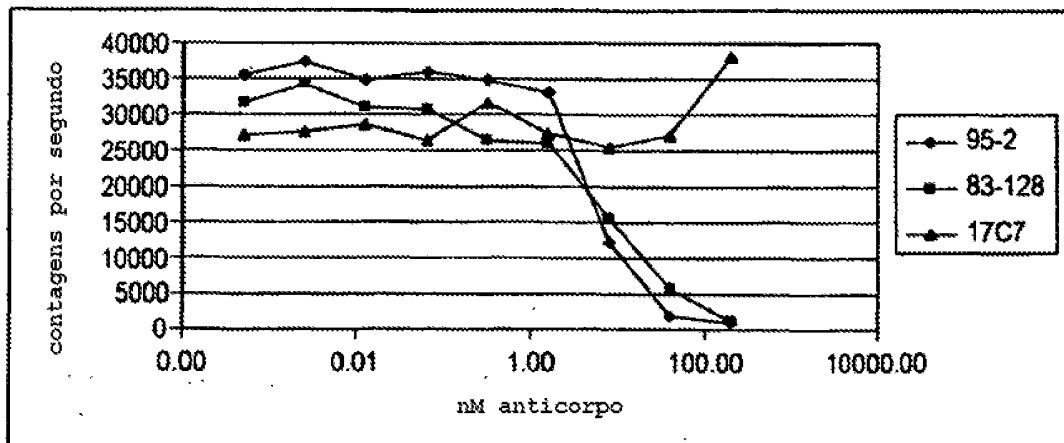
ELISA de E2 de genótipo 1 solúvel. As placas de ELISA foram revestidas com 2 µg/mL de E2-660 1a (triângulos) e E2-661 1 b (quadrados) e sondadas com HumAbs 95-2 e 83-128 em diluições de duas vezes. O anticorpo ligado foi detectado com anticorpo secundário de cabra-anti-humano conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 1

pseudovirus 1a

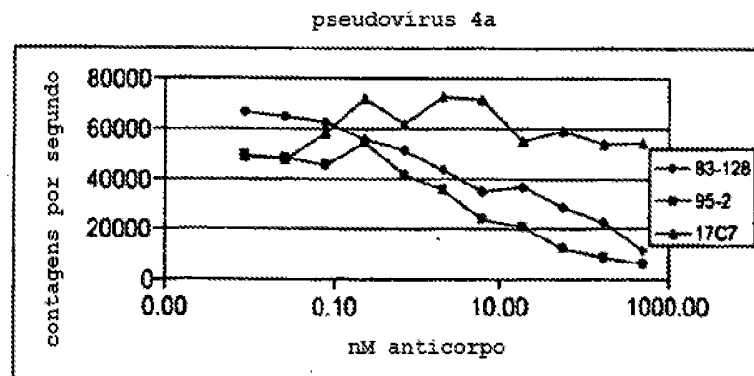
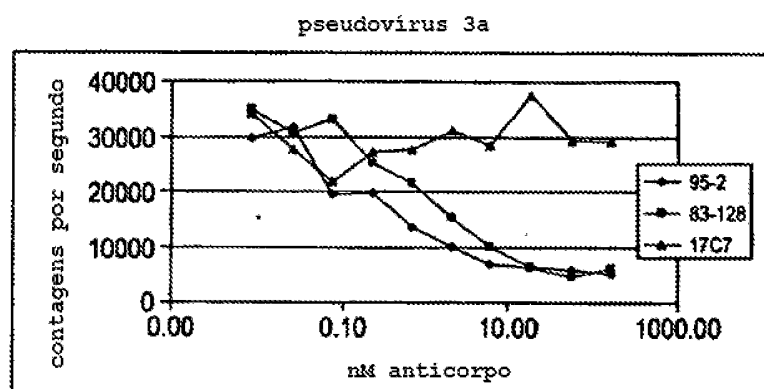
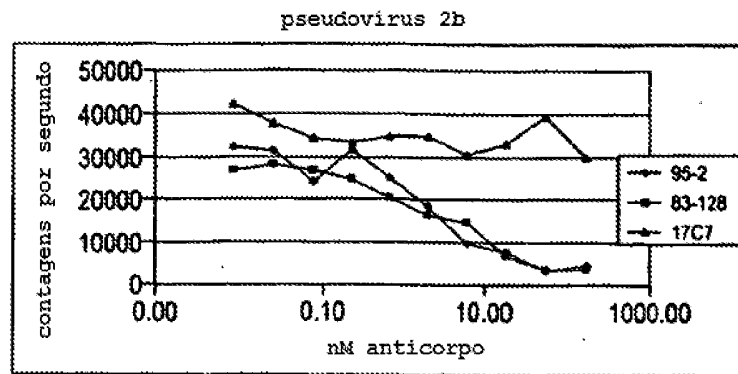


pseudovirus 1b



Neutralização de pseudovirus de genótipo 1a e 1b de HCV. Diluições de cinco vezes de HuMabs 95-2, 83-128, e 17C7 (HuMab contra a raiva, controlo negativo) foram incubadas com pseudovirus do HCV durante 1 hr à temperatura ambiente. A mistura virus-anticorpo foi adicionada a células Hep3B seguida por incubação a 37°C durante 72 hrs. A infecção foi quantificada com ensaio de luciferase Brightglo e lida num leitor de placas Victor3 quanto a saída de luz.

Fig. 2A



Neutralização de pseudovírus de genótipo 2b, 3a e 4a do HCV. Diluições de cinco vezes de HuMabs 95-2, 93-128, e 17C7 (HuMab contra a raiva, controle negativo) foram incubadas com pseudovírus do HCV durante uma hr à temperatura ambiente. A mistura vírus-anticorpo foi adicionada a células Hep3B seguida por incubação a 37°C durante 72 hrs. A infecção foi quantificada com ensaio de luciferase Brightglo e lida num leitor de placas Victor3 quanto a saída de luz.

Fig. 2B

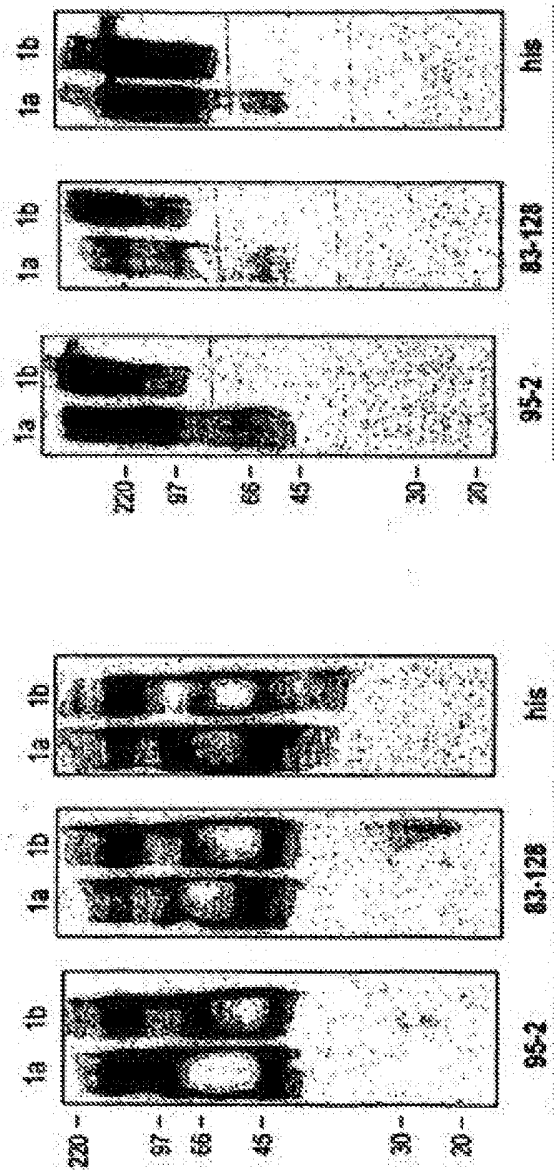


Figura 3A: Redutora

Figura 3B: Não Redutora

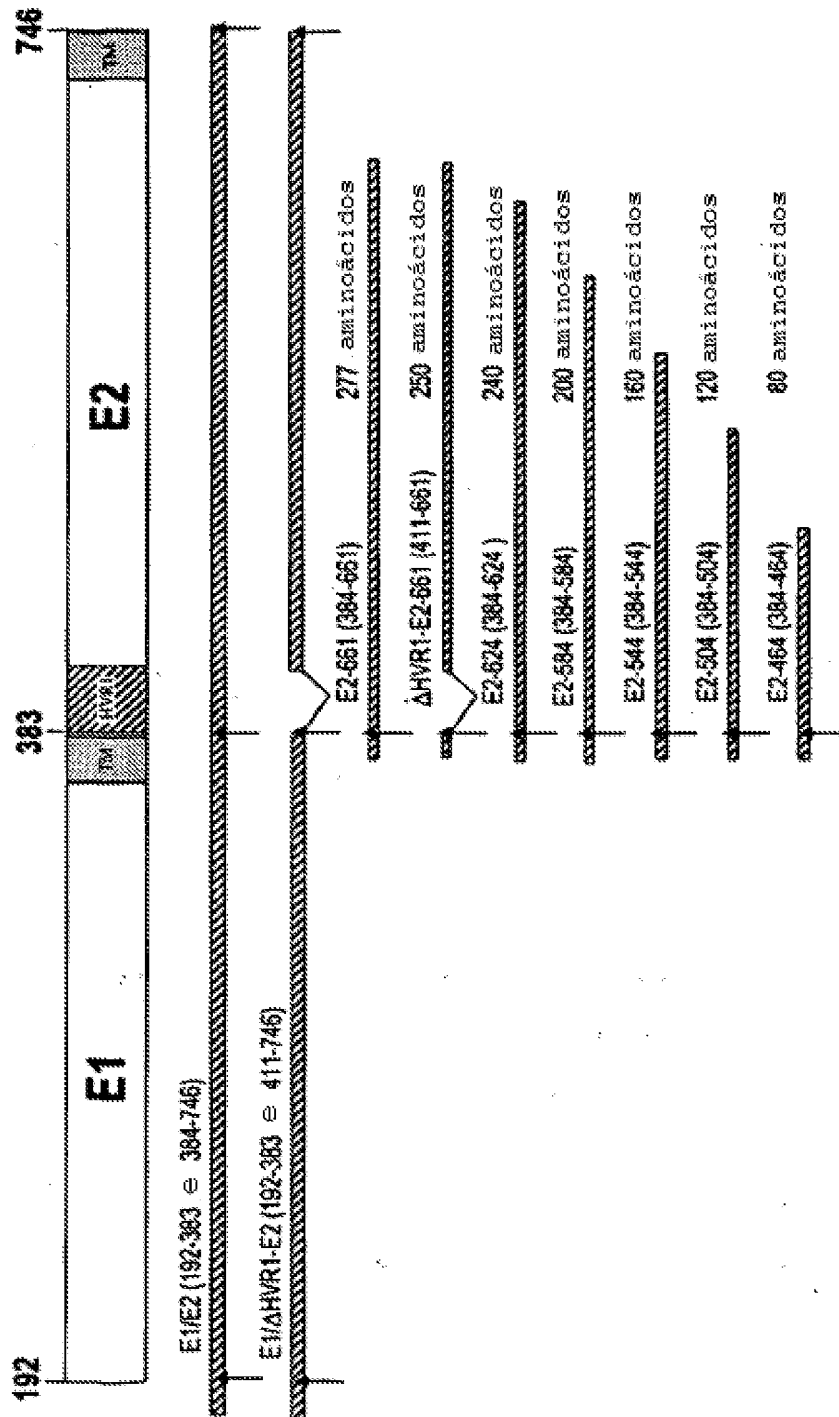
Transferências de Western redutoras e não redutoras de proteína X2 de genótipo 1a e 1b solúvel. Proteína X2 expressa em células solúvel purificada (X2-661) de genótipo 1a e 1b foi sujeita a SDS-PAGE redutora ou não redutora seguida por transferência para membrana de PVDF. As transferências de Western foram realizadas com marcador monoclonal (his) anti-his, 83-128 e 95-2 usando IgG anti-camundongo (his) ou IgG anti-humana (95-2 e 83-128) conjugada com HRP com reagente de detecção quimioluminescente intensificada. O genótipo da X2 solúvel está indicado acima das transferências. O antígeno primário usado para detecção está listado em baixo das transferências. Os marcadores de peso molecular estão listados à esquerda de cada conjunto de transferências.

Fig. 3

	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
95-2	1.6e5	3.0e-4	1.9e-9
83-128	1.9e5	7.3e-4	3.8e-9

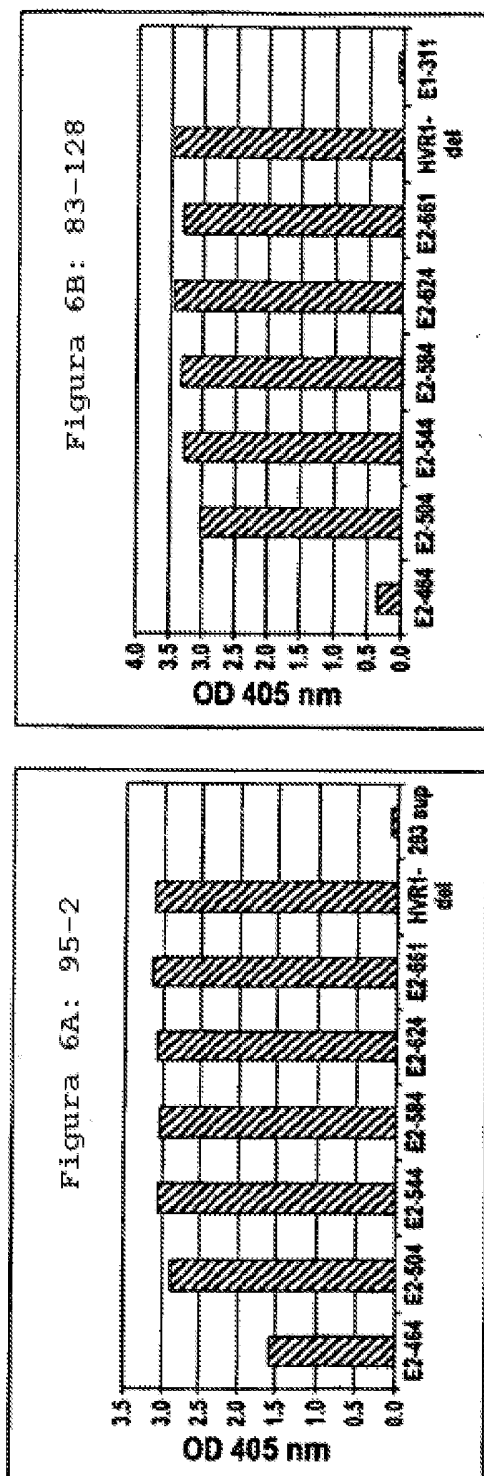
Determinação da afinidade de 95-2 e 83-128 ao epítipo 412-423 de E2 expresso como uma proteína de fusão bacteriana. Fc de IgG anti-humana de cabra foi acoplada por amida ao chip da Biacore. 95-2 e 83-128 foram separadamente capturados no chip e a proteína expressa em bactérias E2-G contendo aminoácidos 412-423 de E2 fluiu a concentrações variáveis. O software BIAevaluation foi usado para ajustar as curvas e calcular as constantes de afinidade.

Fig. 4



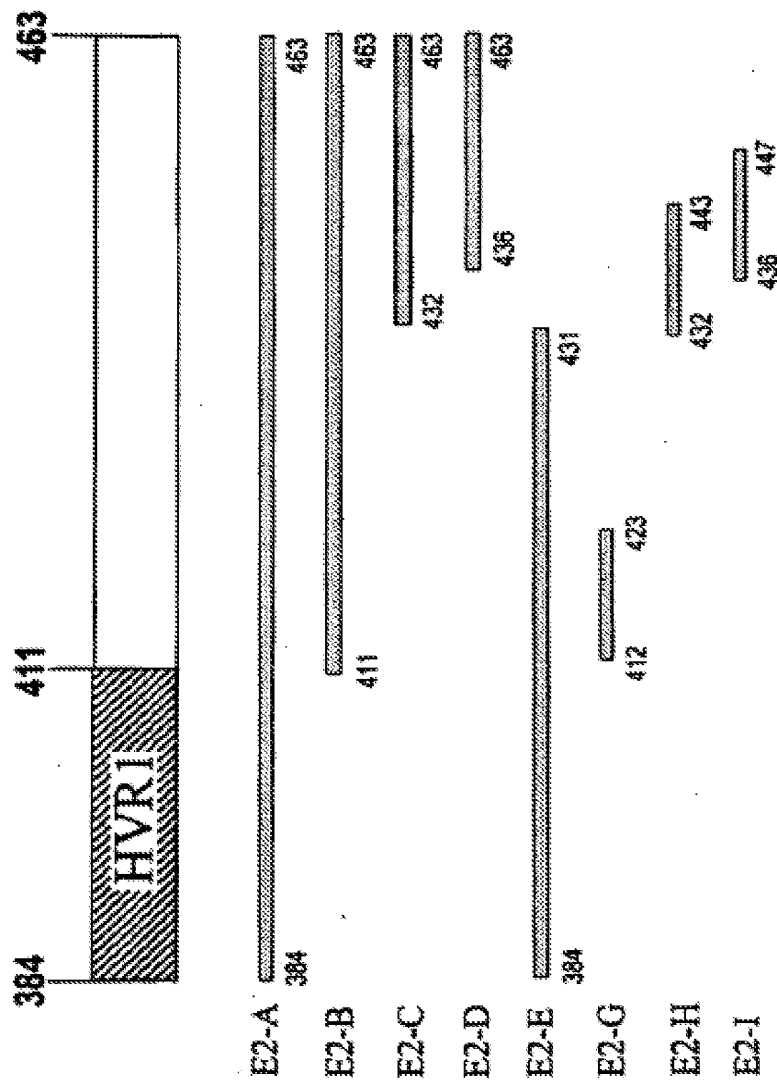
Proteínas expressas em mamíferos E1 e E2. A poliproteína E1 e E2 está indicada no topo por uma caixa branca longa com números de aminoácido notados em cima. Os domínios transmembranares (TM) estão indicados por caixas cinzento-claras e o domínio hipervariável 1 (HVR1) de E2 está indicado por uma caixa cinzento-escura. As proteínas de mamífero expressas a partir de construtos manipulados estão listadas em baixo como barras cinzento-escuras. Os locais de clivagem de peptidase sinal estão indicados por setas. O nome de cada proteína é seguido pelos aminoácidos codificados em parêntesis e aminoácidos totais na proteína expressa

Fig. 5



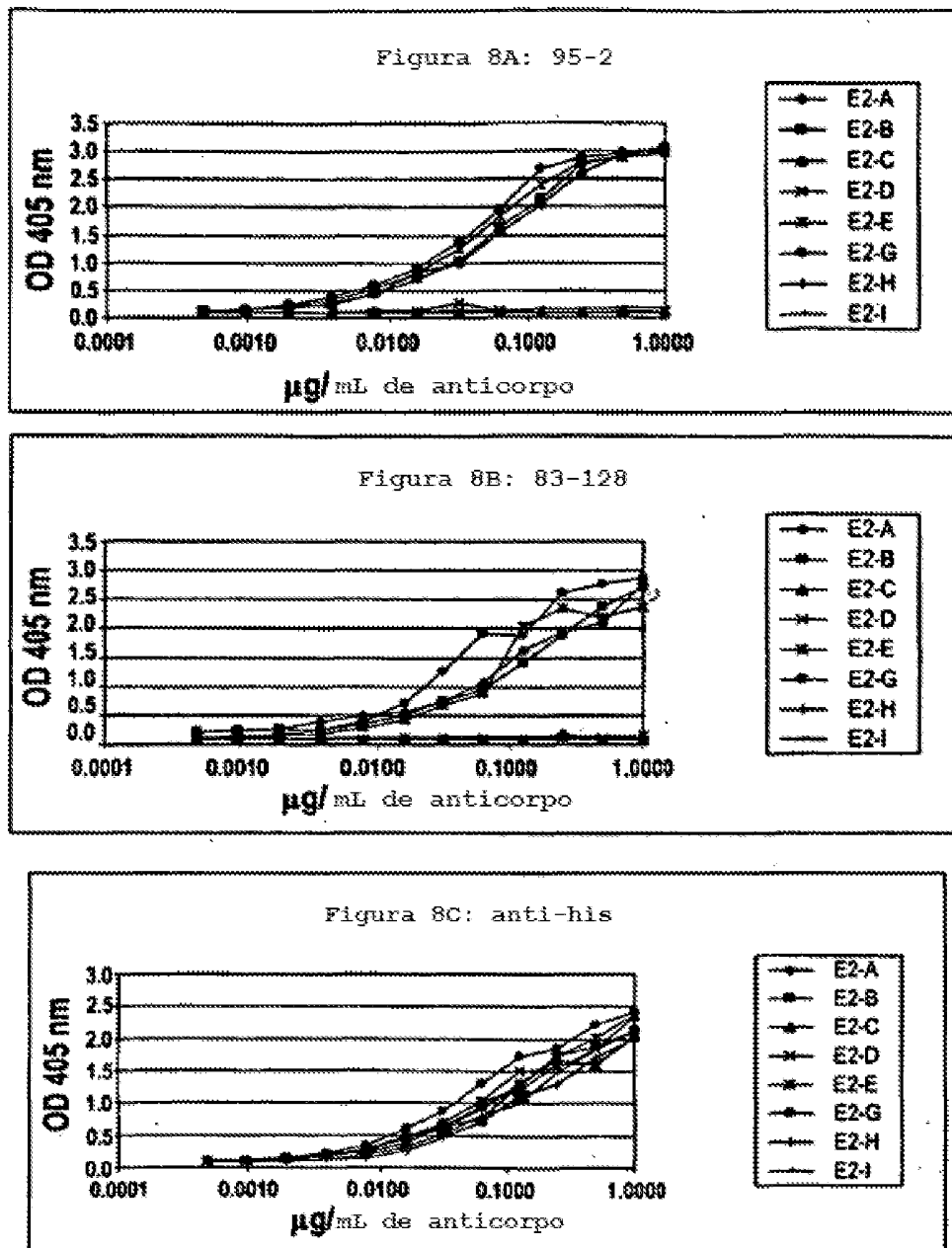
ELISA de captura da lectina de truncações C-terminais expressas em mamíferos de E2. Sobrenadantes de cultura de células contendo truncações C-terminais expressas em mamíferos de proteína de fusão E2 contendo aminoácidos de E2 indicados na figura 7 foram revestidos numa placa de ELISA e sondados com diluições de duas vezes de HuMabs 95-2 e 83-128 e antígeno com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detectados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 6



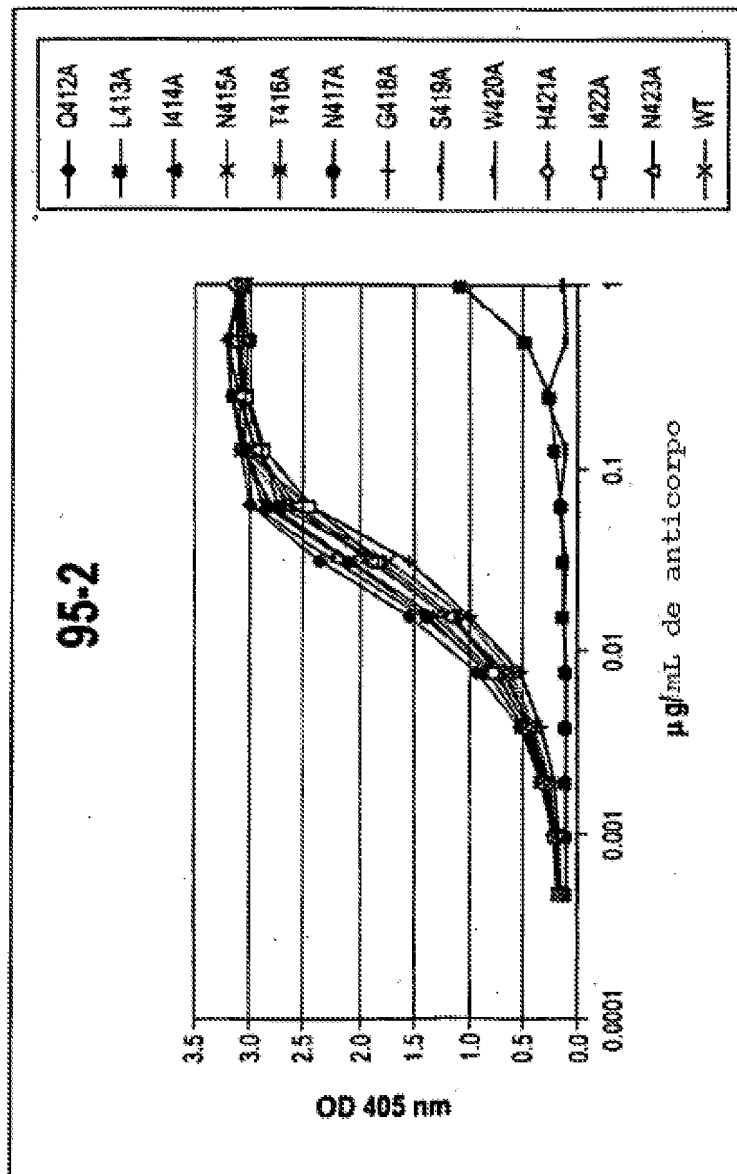
Proteínas expressas em bactérias abrangendo os 80 aminoácidos com amino-terminais de E2. Os primeiros 80 aminoácidos da proteína E2 estão representados no topo por uma caixa branca com os números de aminoácido notados em cima. A região hipervariável 1 (HVRI) com 27 aminoácidos no amino-terminal está indicada por uma caixa cinzento-escura. As proteínas expressas a partir de constructos manipulados estão indicadas por barras cinzento-claras com nomes à esquerda da barra e números de aminoácido para o início e fim da proteína listados em baixo da barra.

Fig. 7



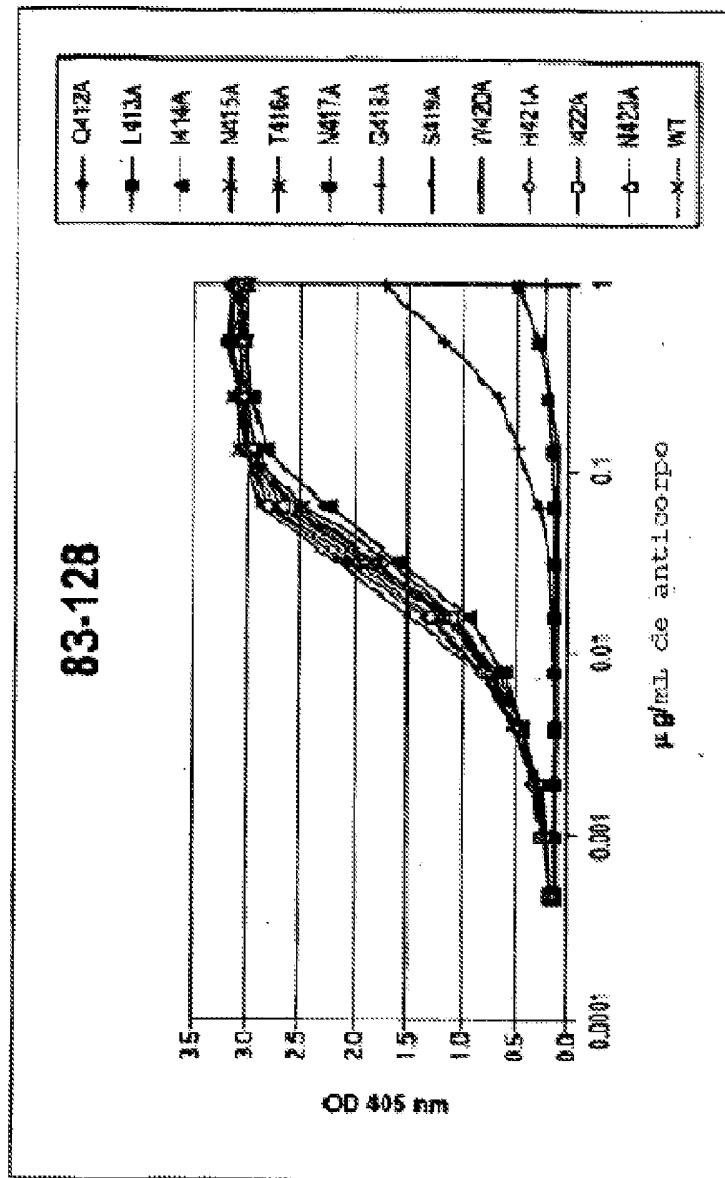
ELISA de pedaços expressos em bactérias dos primeiros 80 aminoácidos de E2. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos de E2 indicadas na figura 7 foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de HuMab 95-2 e 83-128 e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 8



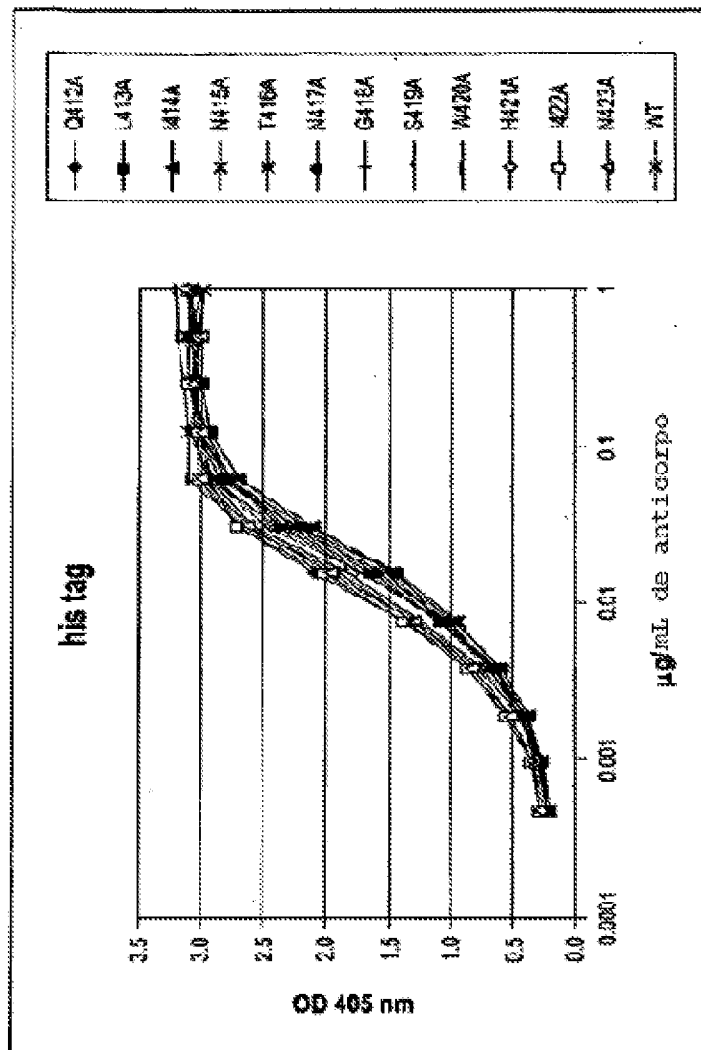
ELISA de mutantes de rastreio da alanina de 412-423 de E2. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com os aminoácidos indicados mutados para uma alanina ou não contendo nenhuma mutações (WT) foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de HuMabs 95-2 e 83-128 e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 9A



ELISA de mutantes de rastreio da alanina de 412-423 de E2. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com os aminoácidos indicados mutados para uma alanina ou não contendo nenhuma mutações (WT) foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de HuMabs 95-2 e 83-128 e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 9B



ELISA de mutantes de rastreo da alanina de 412-423 de E2. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com os aminoácidos indicados mutados para uma alanina ou não contendo nenhuma mutações (WT) foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de HuMabs 95-2 e 83-128 e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 9C

Fig. 10

Percentagem de Contagens

QLINTGSHIN (1a)	(32Q 1D NO:59)	78	48.1
--V-----	(32Q 1D NO:60)	48	29.6
--V-S-----	(32Q 1D NO:61)	8	4.9
-----S-----	(32Q 1D NO:62)	5	3.1
H-----	(32Q 1D NO:63)	4	2.5
---K-----	(32Q 1D NO:64)	3	1.9
---V-----	(32Q 1D NO:65)	1	0.6
-FV-----	(32Q 1D NO:66)	1	0.6
---KNGS-----	(32Q 1D NO:67)	1	0.6
--VK-----	(32Q 1D NO:68)	1	0.6
H-V-----	(32Q 1D NO:69)	1	0.6
H-V-S-----	(32Q 1D NO:70)	1	0.6
---H-----	(32Q 1D NO:71)	1	0.6
--VK-E-N-----	(32Q 1D NO:72)	1	0.6
N---K-----	(32Q 1D NO:73)	1	0.6
---Y-----	(32Q 1D NO:74)	1	0.6
-----L-----	(32Q 1D NO:75)	1	0.6
Y-----	(32Q 1D NO:76)	1	0.6
S-----	(32Q 1D NO:77)	1	0.6
N-----	(32Q 1D NO:78)	1	0.6

Sequências totais = 160
Número de variantes = 20

Alinhamentos dos aminoácidos 412-423 de E2 da Base de Dados de Sequências do HCV de Los Alamos apoiada pelo NIH. O código de aminoácido de uma letra para a sequência de genótipo la protótipo para os aminoácidos 412-423 está listado na parte superior esquerda do gráfico (1a). Quaisquer aminoácidos que sejam idênticos à sequência la estão indicados com um traço e o aminoácido listado para qualquer posição que seja diferente da sequência de genótipo la protótipo. O número de vezes que esta sequência de 12 aminoácidos é encontrada na base de dados condensada está listado sob contagem e a percentagem do total está listada sob percentagem. As sequências das nossas proteínas E2 la e lb solúveis estão a vermelho.

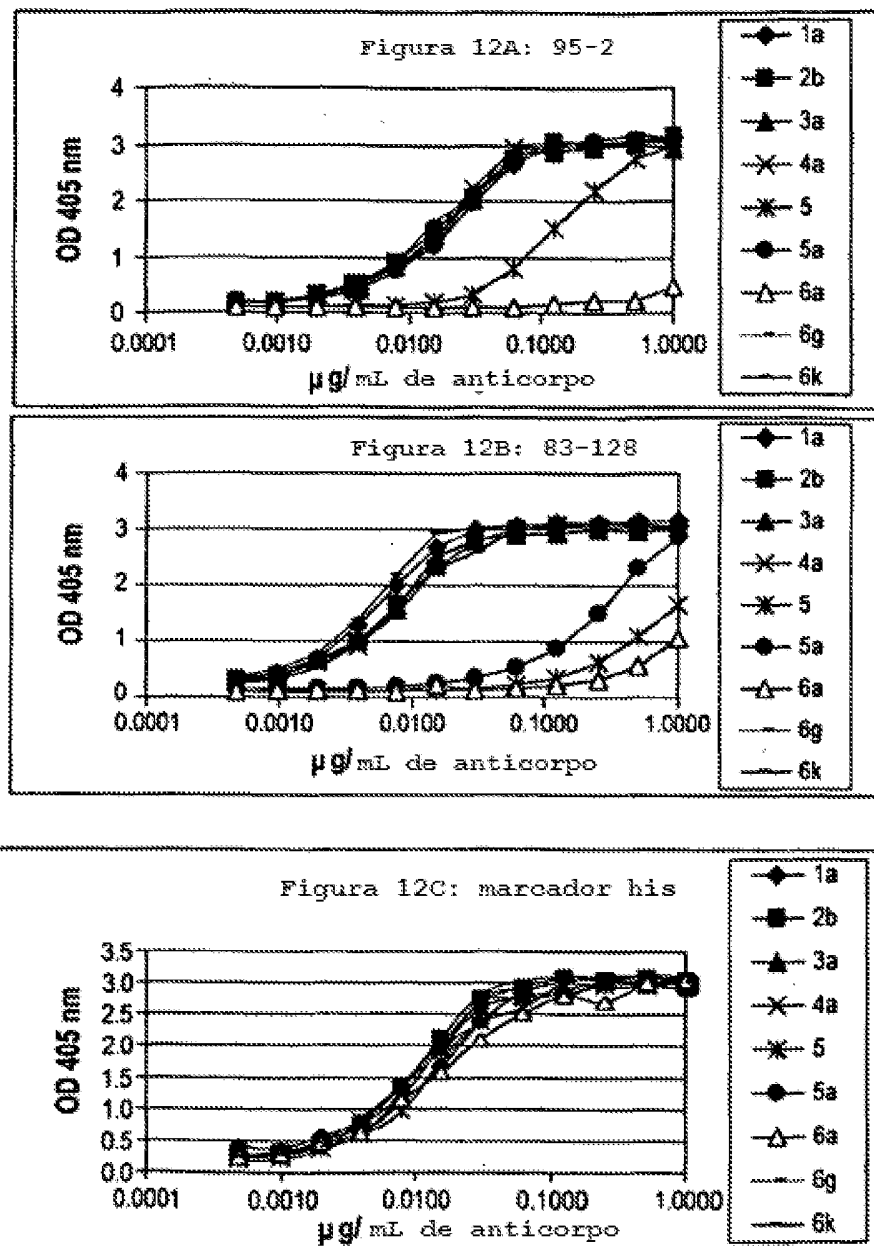
SEQ ID NO:59	Q <u>L</u> I <u>N</u> T <u>N</u> G <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	1a	(AF009606)
SEQ ID NO:79	H <u>L</u> V <u>N</u> S <u>N</u> G <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	2b	(AY232748)
SEQ ID NO:80	Q <u>L</u> V <u>N</u> S <u>S</u> G <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	3a	(AY957988)
SEQ ID NO:81	Q <u>L</u> I <u>N</u> S <u>N</u> G <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	4a	(Y11604)
SEQ ID NO:82	Q <u>L</u> I <u>Q</u> N <u>G</u> S <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	5	(AY785283)
SEQ ID NO:83	Q <u>E</u> V <u>N</u> T <u>N</u> G <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	5a	(Y13184)
SEQ ID NO:84	Q <u>L</u> I <u>K</u> N <u>G</u> S <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	6a	(AY859526)
SEQ ID NO:85	Q <u>L</u> I <u>K</u> T <u>N</u> G <u>S</u> W <u>H</u> I <u>N</u>	6g	(D84264)
SEQ ID NO:86	Q <u>L</u> I <u>N</u> S <u>N</u> G <u>S</u> W <u>H</u> V <u>N</u>	6k	(AY878650)

 = crítico para 95-2 e 83-128

 = crítico para 83-128

Aminoácidos 412-423 de E2 de outros genótipos. O código de aminoácido de uma letra para os aminoácidos 412-423 está listado para isolados que continham mudanças (sublinhado vermelho) em relação à sequência de genótipo 1a protótipo. O nome de genótipo está listado à direita seguido pelo número de acesso do genbank em parêntesis.

Fig. 11



ELISA de aminoácidos 412-423 de E2 de outros genótipos. As proteínas de fusão expressas em bactérias contendo aminoácidos 412-423 de E2 com a sequência do genótipo indicado foram revestidas numa placa de ELISA e sondadas com diluições de duas vezes de HuMabs 95-2 e 83-128 e anticorpo com marcador de seis histidinas de camundongo (marcador his). Os anticorpos ligados foram detetados com cabra-anti-humano (95-2 e 83-128) ou cabra-anti-camundongo (marcador his) conjugado com fosfatase alcalina e substrato de PNPP.

Fig. 12

Sequência H77 1a otimizada quanto ao codão de E1/E2 com extremidades adicionadas contendo locais de restrições (minúsculas a **negrito**), saliências adicionais para assegurar corte da enzima de restrição (minúscula sublinhada), e sequência de consenso de Kozak (minúscula a **negrito** sublinhada) com codão de iniciação ATG (maiúscula a **negrito** sublinhada) (SEQ ID NO:31)

cqctatagaagcttgcgcgcacac**ATG**^{*}GCCACCGGCAACCTGCCCGGCTGCTCCTTC
TCCATCTTCCTGCTGGCCCTGCTGTCTGCTGACCGTGCCCGCTCCGCCTACCAGGTGC
GCAACTCCTCCGGCCTGTACCACGTGACCAACGACTGCCCTAACTCCTCCATCGTGTACGA
GGCCGCCGACGCCATCCTGCACACTCCTGGCTGCGTGCCCTGCGTGCGCGAGGGCAACGCC
TCCCGCTGCTGGGTGGCCGTGACTCCTACCGTGGCCACCCGCGACGGCAAGCTGCCACCA
CCCAGCTGCGCCGCCACATCGACCTGCTGGTGGGCTCCGCCACCCTGTGCTCCGCCCTGTA
CGTGGGCGACCTGTGCGGCTCCGTGTTCTGCTGGGCCAGCTGTTACCTTCTCTCCTCGC
CGCCACTGGACCACCCAGGACTGCAACTGCTCCATCTACCCCTGGCCACATCACCGGCCACC
GCATGGCCTGGGACATGATGATGAACTGGTCTCCACCGCCGCCCTGGTGGTGGCCAGCT
GCTGCGCATCCCTCAGGCCATCATGGACATGATCGCCGGCGCCCACTGGGGCGTCTCTGGCC
GGCATCGCCTACTTCTCCATGGTGGGCAACTGGGCCAAGGTGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
TCGCCGGCGTGACGCCGAGACCCACGTGACGGGCGGCTCCGCCGGCCGACACCACGCGCG
CCTGGTGGGCTGCTGACACCCGGCGCCCAAGCAGAACATCCAGCTGATCAACACCAACGGC
TCCTGGCACATCAACTCCACCGCCCTGAACTGCAACGAGTCCCTGAACACCGGCTGGCTGG
CCGGCCTGTCTACACGACAAAGTTCAACTCCTCCGGCTGTCCCGAGCGCCTGGCCTCCTG
CCGCCGCCTGACCGACTTCGCCACGGGCTGGGGCCCTATCTCCTACGCCAACGGCTCCGGC
CTGGACGAGCGGCCCTACTGCTGGCACTACCCTCCTCGCCCTTGGGGCATCGTGCCCGCCA
AGTCCGTGTGCGGCCCTGTGTACTGCTTCACTCCCTCTCCCGTGGTGGTGGGCACCACCGA
CCGCTCCGGCGCTCCACCTACTCCTGGGGCGCCAACGACACCGACGCTGTTCTGTGCTGAAC
AACACCCGCCCTCCTCTGGGCAACTGGTTCGGCTGCACCTGGATGAACCTCCACCGGCTTCA
CCAAGGTGTGCGGCGGCCCTCCCTGCGTGATCGGCGGCGTGGGCAACAACACCTGTGTG
CCCTACCGACTGCTTCCGCAAGCATCCCGAGGCCACCTACTCCCGCTGCGGCTCCGGGCCC
TGGATCACTCCTCGCTGCATGGTGGACTATCCCTACCGCCTGTGGCACTATCCCTGCACCA
TCAACTACACCATCTTCAAGGTGCGCATGTACGTGGGCGGCGTGGAGCACCGCCTGGAGGC
GGCGTGCAACTGGACCCGCGGCGAGCGCTGCGACCTGGAGGACCGCGACCGCTCCGAGCTG
TCTCCTCTGCTGCTGTCCACCACCCAGTGGCAGGTGCTGCCCTGCTCCTTCACCACCCTGC
CCGCGCTGTCCACCGGCCCTGATCCACCTGCACCAGAACATCGTGGACGTGCAGTACCTGTA
CGGCGTGGGCTCCTCCATCGCGTCTGGGCGATCAAGTGGGAGTACGTGGTGGTGGTGGTGGT
CTGCTGCTGGCGACGCGCGCGTGTGCTCCTGCCTGTGGATGATGCTGCTGATCTCCAGG
CGGAGGCGtctagaggagtca

Fig. 13

ALINHAMENTO E SEQUÊNCIA DE CONSENSO DE ANTICORPOS
MONOCLONAIS REATIVOS CONTRA EPÍTOPO 412-423 DE Linha
germinativa de GLICOPROTEÍNA E2-660 DO HCV: VH3-33, D3-10,
JH4; Vk-L56, Jk5

Alinhamento de Aminoácidos da Cadeia Pesada

95-43 (SEQ ID NO:36)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-54 (38)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-25 (34)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-14 (32)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-49 (37)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-62 (40)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-42 (35)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-58 (39)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-2 (3)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
95-38 (33)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSTGQHWVRQAPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
83-128 (1)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFNNTGHWVRQTPGKGLEWVAVIWFQGHNKTY
	*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
95-43	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-54	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-25	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-14	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-49	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-62	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-42	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-58	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-2	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
95-38	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDIFTHVRGVFIYFDYWGQGT
83-128	ADSVNGRFTISRNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDI-SLVRDAFIYFDYWGQGT
	;**;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****;*****
95-43	LVTVSS
95-54	LVTVSS
95-25	LVTVSS
95-14	LVTVSS
95-49	LVTVSS
95-62	LVTVSS
95-42	LVTVSS
95-58	LVTVSS
95-2	LVTVSS
95-38	LVTVSS
83-128	LVTVSS

Fig. 14

Alinhamentos de Aminoácidos da Cadeia Leve

073-1	(SEQ ID NO: 6)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPA
95-38	(53)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPA
95-2	(4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPA
95-14	(44)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPA
83-128	(2)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRRATGIPA
		*****.*****
		RFSGSGSGTDFTLTISLTLEPEDFAVYQCQRSNWVTFEGQGRLEIK
073-1		RFSGSGSGTDFTLTISLTLEPEDFAVYQCQRSNWVTFEGQGRLEIK
95-38		RFSGSGSGTDFTLTISLTLEPEDFAVYQCQRSNWVTFEGQGRLEIK
95-2		RFSGSGSGTDFTLTISLTLEPEDFAVYQCQRSNWVTFEGQGRLEIK
95-14		RFSGSGSGTDFTLTISLTLEPEDFAVYQCQRSNWVTFEGQGRLEIK
83-128		RFSGSGSGTDFTLTISLTLEPEDFAVYQCQRSNWVTFEGQGRLEIK
		*****;*****;*****

Fig. 15