República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112020013094-0 A2

(22) Data do Depósito: 28/12/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 30/03/2021

(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL NEUTRALIZANTE TOTALMENTE HUMANO NATIVO CONTRA TOXINA TETÂNICA E SUAS APLICAÇÕES

(51) Int. Cl.: C07K 16/12; C12N 15/13; C12N 15/85; C12N 5/10; A61K 39/40; (...).

(30) Prioridade Unionista: 04/05/2018 CN 201810420730.5; 29/12/2017 CN 201711482969.7; 29/12/2017 CN 201711486693.X; 29/12/2017 CN 201711486732.6.

(71) Depositante(es): ZHUHAI TRINOMAB BIOTECHNOLOGY CO., LTD..

(72) Inventor(es): HUAXIN LIAO; YUEMING WANG; XIAOHUI YUAN; WEIHONG ZHENG.

(86) Pedido PCT: PCT CN2018124958 de 28/12/2018

(87) Publicação PCT: WO 2019/129214 de 04/07/2019

(85) Data da Fase Nacional: 26/06/2020

(57) Resumo: A presente invenção se refere a anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica. Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica desenvolvidos da invenção através de uma plataforma sistemática de alta produtividade que seja especializada para identificar e desenvolver anticorpo nativo humano. Os anticorpos monoclonais neutralizantes descritos na invenção podem ser usados na prevenção, tratamento e teste de infecção por Clostridium tetani. Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente homanos desenvolvidos na invenção têm uma alta afinidade com a toxina tetânica, bem como possuem altas atividades neutralizantes contra a toxina, seguros de uso com alta eficácia de prevenção de doença, livres de contaminação por vírus exógeno, e são amplamente aplicáveis a vários grupos humanos com fortes aplicações industriais.

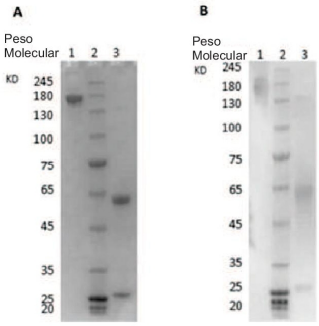


Fig .1

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **“ANTICORPO MONOCLONAL NEUTRALIZANTE TOTALMENTE HUMANO NATIVO CONTRA TOXINA TETÂNICA E SUAS APLICAÇÕES”.**

[001] Este requerimento solicita a data de prioridade dos seguintes requerimentos de patente chinesa: Requerimento No. 2017114867326, intitulado “*A fully native human neutralizing monoclonal antibody against tetanus toxin and its applications*” registrado em 29 de dezembro de 2017; Requerimento No. 201711486693X, intitulado “*Preparation of neutralizing antibody against tetanus toxin and its applications*” registrado em 29 de dezembro de 2017; Requerimento No. 2017114829697, intitulado “*An fully native human neutralizing antibody against tetanus toxin*” registrado em 29 de dezembro de 2017, e Requerimento No. 201810420730.5 intitulado “*A neutralizing antibody against tetanus toxin and its applications*” registrado em 04 de maio de 2018. Todos os requerimentos de patente chinesa acima são incorporados por meio de referência aqui, a este requerimento de patente.

CAMPO DA TECNOLOGIA

[002] Esta invenção pertence ao campo da Imunologia Celular e da Engenharia Genética, e se refere a um anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo contra toxina tetânica e suas aplicações.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[003] O tétano é uma doença aguda, caracterizada por espasmos musculares provocados por uma neurotoxina produzida pelo *Clostridium tetani* depois de sua invasão dentro de um corpo através de um ferimento e reprodução sob ambiente anaeróbico. Os pacientes graves podem morrer devido a espasmo da laringe ou a infecção pulmonar secundária grave. A taxa de mortalidade pode ser tão

elevada quanto 20 a 50% entre os recém-nascidos e os pacientes graves. A cada ano ocorrem cerca de um milhão de óbitos globalmente provocados pelo tétano, em sua maioria nos países e regiões não desenvolvidos. Clinicamente o tétano é categorizado em quatro tipos: tétano local, tétano cefálico, tétano generalizado e tétano neonatal.

[004] O *C. tetani* é bactéria estritamente anaeróbica, e seus esporos são extremamente resistentes e são resistentes à seca, ao calor e a anti-sépticos, porém são sensíveis a solução de iodo ou solução neutra de glutaraldeído, e podem ser destruídos por estes reagentes a curto prazo. O *C. tetani* pode produzir dois tipos de exotoxinas: a toxina hemolítica do tétano, a qual provoca hemólise, e a toxina espástica do tétano, a qual é a toxina tetânica comumente conhecida.

[005] A toxina tetânica é uma proteína produzida e secretada por *C. tetani,* consistindo em 1315 aminoácidos e com um peso molecular de 150.700 Da. A dose letal estimada para toxina tetânica é de cerca de 0,25 ng/kg. A toxina tetânica é expressa como uma proteína de cadeia única dentro da célula da bactéria, e em seguida é clivada por enzimas de proteína em uma cadeia leve e uma cadeia pesada acopladas juntas por uma ligação de dissulfeto. De acordo com suas funções *in vivo*, a molécula da toxina tetânica é dividida em três regiões A, B e C: o fragmento de cadeia leve é fragmento A, a metade N-terminal da cadeia pesada é o fragmento B, e a outra metade da cadeia pesada é o fragmento C.

[006] De modo geral, o mecanismo pode ser dividido em três etapas: ligação, transporte e ação. Pesquisas mostraram que o fragmento C da toxina tetânica pode se ligar ao receptor de toxina, o qual se acredita de modo geral que seja como um gangliosídeo. O fragmento C tem a função de transporte axonal retrógrado para o

sistema nervoso central, e tem sido usado para desenvolver vacinas de subunidades. O fragmento B pode formar um canal de íons através de bicada de fosfolipídeos artificiais, transportando o fragmento ativo de toxina para uma célula. O Fragmento A é uma protease de Zn, com atividade de proteólise, e pode decompor proteínas da membrana envolvendo o transporte proteico-vesicular de neurotransmissores. Isto inibe a liberação de neurotransmissores e causa a transmissão contínua de impulso excitatório, resultando em sintoma clínico de violenta paralisia espástica. No entanto, o isolamento direto e a purificação do fragmento C de toxina tetânica têm muitas deficiências: alta toxicidade da toxina tetânica, possível transmissão por esporos, processos complexos para cultura e isolamento, baixa taxa de recuperação e um certo grau de risco.

[007] Inicialmente, o toxoide tetânico era usado para prevenção e tratamento do tétano como imunorreagentes, mas com bastantes reações adversas, tais como alta sensibilização. Nos anos sessenta do século XX, os países desenvolvidos na Europa e na América desenvolveram a imunoglobina tetânica humana (HTIG). A produção de HTIG na China se iniciou nos anos oitenta, e a produção atual de HTIG ainda não pode satisfazer as demandas do mercado, essencialmente TAT (AntiToxina Tetânica) de soro de cavalo ocupa a maioria da participação do mercado. A HTIG humanizada superou as reações adversas, tais como reação de sensibilização causada pelo uso clínico de TAT de soro de cavalo, e aprimorou significativamente a prevenção e i tratamento do tétano. Mas como o sangue humano é uma fonte escassa com alto custo, e também com o risco de contaminação por vírus exógeno, a produção industrial e o uso clínico de HTIG tem sido largamente limitado.

[008] Atualmente, existem relatórios sobre a transformação de anticorpo monoclonal de camundongo para produzir toxina tetânica

manipulada geneticamente e humanizada, mas esses ainda estão no estágio de experimentação laboratorial. Recentemente, devido ao rápido desenvolvimento da tecnologia de engenharia genética, se tornou possível produzir anticorpo humanizado / humano usando tecnologia de engenharia genética. O anticorpo humanizado / humano produzido através de engenharia genética pode reduzir ou eliminar a reação de sensibilização causada por soro xenogênico. Também pode resolver os problemas de fonte insuficiente de sangue humano para a produção de imunoglobulina humana ou a potencial contaminação por vírus. Isto se tornou o foco de pesquisa atual.

Descrição da Invenção

[009] De modo a melhorar a escassez de tecnologia atual, o principal propósito desta invenção é proporcionar um anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo contra toxina tetânica e seu fragmento de ligação ao antígeno sem imunogenicidade ou contaminação por vírus exógeno, mas com alta afinidade, alta especificidade e alta eficiência, também proporcionar sequências de codificação para o anticorpo, linhagens celulares para produção do anticorpo, e métodos e aplicações para uso do anticorpo para diagnóstico, prevenção ou terapia.

[010] Em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo contra toxina tetânica e um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que o anticorpo monoclonal neutralizante compreende no mínimo um domínio variável de cadeia pesada (VH) com três CDRs e no mínimo um domínio variável de cadeia leve (VL) com três CDRs:

[011] em que as CDR1, CDR2 ou CDR3 do VH compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 27, 28, ou 29, ou com substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da

mesma, ou com 80% ou mais homólogos de sequência da mesma, e com as mesmas funções ou funções similares; e as CDR1, CDR2 ou CDR3 do VL compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma entre a SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 30, 31, ou 32, ou com substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou com 80% ou mais homólogos de sequência da mesma, e com as mesmas funções ou funções similares.

[012] De modo preferencial,em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VH compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 1, na SEQ ID NO: 2, e na SEQ ID NO: 3, respectivamente; em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VL compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 4, na SEQ ID NO: 5, e na SEQ ID NO: 6, respectivamente;

[013] em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VH compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 9, na SEQ ID NO: 10, e na SEQ ID NO: 11, respectivamente; em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VL compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 13, na SEQ ID NO: 14, e na SEQ ID NO: 15, respectivamente. E o domínio estrutural de VH do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 12, e o domínio estrutural de VL do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 16;

[014] em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VH compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 19, na SEQ ID NO: 20, e na SEQ ID NO: 21, respectivamente; em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VL compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 23, na SEQ ID NO: 24, e na SEQ ID NO: 25, respectivamente;

[015] em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VH compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 27, na SEQ ID NO: 28, e na SEQ ID NO: 29, respectivamente; em que as CDR1, CDR2 e CDR3 de VL compreendendo uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO: 30, na SEQ ID NO: 31, e na SEQ ID NO: 32, respectivamente.

[016] Além disso, o VH do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada em qualquer uma entre a SEQ ID NO.: 7, a SEQ ID NO.: 17, a SEQ ID NO.: 22, e a SEQ ID NO.: 33, ou com substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou com 80% ou mais homólogos de sequência da mesma, e com as mesmas funções ou funções similares; e o VL do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 8, na SEQ ID NO.: 18, na SEQ ID NO.: 26, na SEQ ID NO.: 34, ou com substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou com 80% ou mais homólogos de sequência da mesma, e com as mesmas funções ou funções similares;

[017] De modo preferencial,

[018] o VH do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 7, e o VL do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 8;

[019] e o VH do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 17, e o VL do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 18;

[020] e o VH do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 22, e o VL do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de

aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 26;

[021] e o VH do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 33, e o VL do anticorpo monoclonal neutralizante compreende uma sequência de aminoácidos estipulada na SEQ ID NO.: 34.

[022] Além disso, o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção se liga imuno especificamente com toxina tetânica, e o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo não se dissocia da toxina tetânica ou *Clostridium tetani* em uma constante de dissociação de equilíbrio (KD) superior a 10^{-6}M.

[023] De modo preferencial, o tipo de cadeia pesada do anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção é IgG1, IgG2, IgG3, ou Ig4, e de modo mais preferencial, IgG1.

[024] De modo preferencial, o tipo de cadeia leve do anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção é κ ou λ.

[025] O anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção compreende não somente uma região variável, mas também uma região constante.

[026] De modo preferencial, a região constante do anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção é a região constante de qualquer uma entre as IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4 humanas.

[027] O anticorpo antitoxina tetânica ou seu fragmento de ligação ao antígeno desta invenção é preferencialmente anticorpo humanizado, compreendendo (não limitado a) fragmento Fv de cadeia única (scFv), Fab, Fab', F(ab')2, Fv, dsFv, diacorpo, Fd ou Fd'.

[028] O anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção também compreende um adaptador peptídico, e de modo preferencial, o adaptador peptídico compreende cerca de 1 a 50 aminoácidos.

[029] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um conjugado, e o conjugado, o qual consiste no anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou no fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção, e no marcador conjugado ao anticorpo monoclonal neutralizante ou no fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção, tal como uma parte testável e reagentes. O marcador é conjugado diretamente de maneira covalente ou não covalente ao anticorpo monoclonal neutralizante ou ao fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção. Além disso, o marcador pode ser conjugado através de um ou mais adaptadores ao anticorpo monoclonal neutralizante ou ao fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção. A técnica para marcação de conjugação ao anticorpo monoclonal neutralizante ou ao fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção são de conhecimento geral dos técnicos neste campo. A parte testável e/ou reagentes da marcação incluem enzimas livres, grupos prostéticos, materiais fluorescentes, materiais bioluminescentes, materiais radioativos, materiais de emissão de pósitrons, e íons metálicos paramagnéticos não radioativos.

[030] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma composição, compreendendo o anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou seu fragmento de ligação ao antígeno, e um marcador químico ou biológico ligado de maneira covelante ao anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou seu fragmento de ligação ao antígeno.

[031] De modo preferencial, a referida marcação química incluindo marcação isotópica, marcação com imunotoxina, ou marcação com fármaco químico; e a referida marcação biológica incluindo marcação com biotina, marcação com avidina, marcação enzimática, marcação fluorescente, ou marcação com agente de

transferência de elétrons.

[032] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um conjugado, compreendendo o anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou seu fragmento de ligação ao antígeno, e/ou conjugado acima descrito, e/ou composição acima descrita acoplado a um meio sólido ou semi-sólido.

[033] Os exemplos de meio sólido ou semissólido incluem placa revestida com enzima (placa ELISA), magnética ou não magnética imunosfera ou imunogrânulos, e agente de dispersão celular. Exemplos do agente de dispersão celular incluem dióxido de silício coloidal revestido com oli-vinil-pirrolidona, polissacarídeo e amidotrizoato de sódio ou seus derivados.

[034] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma combinação de composições compreendendo o anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou seu fragmento de ligação ao antígeno, e/ou conjugado acima descrito, e/ou composição acima descrita, e/ou conjugado acima descrito.

[035] A combinação de composições inclui combinação de composições farmacológicas e combinação de composições de diagnóstico.

[036] A combinação de composições farmacológicas acima descrita também inclui adjuvante farmacêutico aceitável. Os adjuvantes farmacêuticos aceitáveis são o agente adjuvante ou diluente com pouca irritação significativa para o corpo e sem nenhum efeito para eliminar as atividades biológicas dos compostos farmacêuticos. Exemplos incluem salina, água estéril, solução de Ringer, salina tamponada, solução de glicose, solução de maltodextrina, glicerina, etanol, ou uma mistura de dois ou mais dos mesmos. Caso necessário, a combinação de composições farmacológicas descrita nesta invenção pode incluir outros aditivos

usados regularmente, tais como antioxidantes, tampões, bacteriostáticos, dispersantes, surfactantes, adesivos e lubrificantes. Também pode ser preparada em diferentes formas de dosagens, tais como preparações injetáveis como soluções, suspensões ou emulsões, pílulas, cápsulas, grânulos ou comprimido.

[037] A combinação de composições farmacológicas deve ser estéril e estável durante a produção ou o armazenamento. Ao produzir pó estéril para soluções injetáveis, O método preferencial é secagem a vácuo ou secagem por congelamento. Secagem a vácuo ou secagem por congelamento pode transformar soluções filtradas esterilizadas em pós ao mesmo tempo que mantendo a atividade dos compostos farmacêuticos. Opcionalmente, excipientes farmaceuticamente aceitáveis podem ser adicionadas a uma solução da combinação de composição farmacológica desta invenção de modo a gerar uma forma de dosagem de unidade injetável. De modo preferencial, os excipientes farmaceuticamente aceitáveis usados nesta invenção são adequados para alta concentração de fármacos, são capazes de manter adequada fluidez, e, caso necessário, são capazes de retardar a absorção de fármaco.

[038] Vários fatores influenciam as escolhas da melhor via de administração, incluindo as propriedades físicas e químicas dos ingredientes ativos da combinação de composições farmacológicas, a gravidade e a urgência dos sintomas, e as relações entre a concentração sanguínea dos ingredientes ativos e os efeitos esperados do fármaco. Por exemplo, pode ser adicionado adjuvante durante a preparação do anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção, o qual pode proteger o anticorpo contra rápida liberação (tal como adjuvante de controle de liberação), o adjuvante referido pode incluir implantes, emplastros, ou microcápsulas. Podem ser usados nesta invenção polímeros que sejam biodegradáveis e biocompatíveis,

tais como acetato de vinil etileno, polianidrido, ácido poliglicólico, colágeno, poliéster ou polilactida. Além disso, o anticorpo monoclonal neutralizante pode misturar com compostos ou materiais que possam proteger o anticorpo contra perda de bioatividade, ou administrados juntos com os referidos compostos ou materiais. Por exemplo, o anticorpo monoclonal neutralizante pode ser administrado junto com adjuvante apropriado tal como lipossomas ou diluentes.

[039] A via de administração da combinação de composições farmacológicas desta invenção pode ser administração oral ou parenteral. A via preferencial é injeção intravenosa, mas não é limitada a esta.

[040] A forma de dosagem oral pode ser comprimido, pastilha, pastilha de açúcar, suspensão à base de água ou à base de óleo, pó, grânulo, emulsão, cápsula dura, cápsula mole, xarope, pílula, pílula revestida com açúcar, líquido, gel, ou pomada. Estes também podem conter alguns excipientes, incluindo, mas não limitados a, agente de granulação, substância química desintegrante, adesivo, lubrificante, preservante, colorante, agentes de mistura ou adoçante, óleo vegetal ou óleo mineral, umectante, e agente espessante.

[041] A forma de dosagem parenteral pode ser solução isotônica estéril à base de água ou não à base de água para injeção ou perfusão, ou suspensão. A referida solução ou suspensão pode ser agentes que não são tóxicos para sujeitos em uma dosagem e concentração administrativas, tais como 1, 3-butanodiol, solução de Ringer, solução de Hank, solução isotônica de cloreto de sódio, óleo, ácido graxo, anestésico localizado, preservante, solução tampão, agente para aumentar a viscosidade ou a solubilidade, antioxidante solúvel em água, antioxidante solúvel em óleo e agente quelante de metal.

[042] As composições de combinações de fármacos referidas

também podem incluir um ou mais agentes terapêuticos diversos, tais como anticorpo, compostos de pequeno peso molecular, compostos orgânicos, compostos inorgânicos, enzimas, ou polinucleotídeos.

[043] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um produto de teste, compreendendo o anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou seu fragmento de ligação ao antígeno, e/ou o conjugado, e/ou a composição, e/ou o conjugado, e/ou a combinação de composições.

[044] O produto de teste desta invenção pode ser usado para detectar toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*. Especificamente, o produto de teste desta invenção mede o nível de toxina tetânica na amostra de fluido, células ou tecido através do anticorpo. Ao mesmo tempo, o produto de teste proporcionado nos exemplos desta invenção tem capacidade de comparar o nível de toxina tetânica medido com o nível de controle. Um nível de toxina tetânica medido maior do que o nível de controle indica infecção por toxina tetânica. De modo preferencial, as amostras de células ou tecidos são de sujeito humano, e as amostras podem incluir amostra de sangue, urina, saliva, lavagem ou tecido linfoide.

[045] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma sequência de DNA codificando o anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo.

[046] A sequência de referida pode ser obtida usando quaisquer métodos conhecidos deste campo de tecnologia. Por exemplo, se a sequência de nucleotídeos do anticorpo for conhecida, a sequência de DNA codificando anticorpo referida pode ser montada com oligonucleotídeos sintetizados quimicamente.

[047] Ou, a molécula de DNA codificando anticorpo referida pode ser gerada a partir nucleotídeos de fonte apropriada. Se não for capaz obter um clone das moléculas de DNA codificando anticorpo referidas,

mas a sequência do referido anticorpo for conhecida, então as moléculas de DNA de imunoglobulina podem ser sintetizadas quimicamente, ou podem ser amplificadas por PCR usando 3'- e 5'-primers sintetizados capazes de hibridizar com a sequência referida; ou para obter as referidas moléculas de DNA codificantes usando clonagem com uma sonda de oligonucleotídeo, a qual é específica para a referida sequência de codificação, por exemplo, para isolar clone de cDNA codificante a partir de uma biblioteca de cDNA. Em seguida as moléculas de DNA amplificadas por PCR podem ser clonadas em um vetor de clonagem replicável usando quaisquer métodos conhecidos deste campo.

[048] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um vetor de expressão recombinante, compreendendo a molécula de DNA acima descrita.

[049] O vetor de expressão para construção do referido vetor de expressão recombinante pode incluir, mas não está limitado a, vetor de expressão MarEx pela Celltrion Inc., vetor de pCDNA amplamente dispnível no mercado, F, R1, RP1, Col, pBR322, ToL,Ti vetor, vetor de cosmídeo, fago tal como fago l, fago M13, fago Mu, fago P1, fago P22, fago Qm, fago T-even, fago T2, fago T4, fago T7, vetores de vírus de plantas. Pode ser usado qualquer um dos vetores de expressão de conhecimento dos técnicos no campo, e a seleção dos vetores de expressão depende das propriedades das células hospedeiras selecionadas. O vetor de expressão pode ser introduzido dentro de uma célula hospedeira (mas sem limitação) por exemplo, por transfecção com fosfato de cálcio, infecção por vírus, transfecção induzida por DEAE-dextrano, transfecção por lipossoma ou transfecção por eletroporação. Quaisquer técnicos neste campo podem escolher ou usar um método adequado para introduzir quaisquer vetores de expressão dentro de quaisquer células

hospedeiras. De modo preferencial, o referido vetor de expressão contém um ou mais marcadores de seleção, mas não limitados a, um vetor sem marcador de seleção também pode ser usado. A escolha para seleção de marcadores depende da célula hospedeira selecionada conforme é de conhecimento dos técnicos neste campo, mas isto não é crucial para esta invenção.

[050] De modo a beneficiar a purificação das moléculas de DNA desta invenção, uma sequência de etiqueta pode ser inserida no vetor de expressão. Exemplos de sequências de etiqueta incluem, mas não estão limitadas a, marcador de seis histidinas, marcador de hemaglutinina, marcador myc ou marcador FLAG. Qualquer marcador que seja de conhecimento dos técnicos desta área para beneficiar a purificação pode ser usado nesta invenção.

[051] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma célula recombinante, a referida célula recombinante resulta de transformação ou transfecção de uma célula hospedeira com o vetor de expressão acima descrito.

[052] Qualquer célula que seja de conhecimento dos técnicos desta área pode ser usada como uma célula hospedeira. A célula hospedeira nesta invenção pode incluir, mas não está limitada a, microorganismo, tal como bacteriano transformado com DNA de fago recombinante contendo sequência de codificação do anticorpo, DNA de plasmídeo ou DNA de cosmídeo (isto é, *E.coli, B. subtilis*), levedura transformada com uma sequência de codificação do anticorpo contendo expressão de levedura recombinante tal como Saccharomyces e Pichia, sistema de células de inseto infectadas com um vetor de expressão de vírus recombinante, tal como baculovírus, sistema de células de planta infectadas com um vetor de expressão de vírus recombinante (tal como CaMV ou TMV) contendo sequência de codificação do anticorpo, ou um sistema de células de mamífero (tal

como célula COS, CHO, BHK, 293, ou 3T3) transfectadas com um vetor de expressão recombinante com um promotor do genoma de célula de mamífero (tal como o promotor de metalotioneína) ou de um vírus de célula de mamífero (tal como o promotor tardio adenoviral, ou o promotor de poxvírus 7.5 K).

[053] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um método para detecção da existência ou do nível de toxina tetânica ou *Clostridium tetani* em uma amostra, usando o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo. Em um exemplo preferencial, o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende marcador detectável. Em outro exemplo preferencial, o método referido usa um marcador detectável acoplado a um segundo anticorpo para detectar o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção. O método referido pode ser para fins de diagnóstico ou para fins não de diagnóstico (por exemplo, a amostra pode ser amostra de células de amostra de um paciente).

[054] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um método para diagnosticar se um sujeito está infectado com toxina tetânica ou *Clostridium tetani*, incluindo detecção da existência de toxina tetânica ou *Clostridium tetani* em uma amostra do sujeito. Em um exemplo preferencial, o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende marcador detectável. Em outro exemplo preferncial, o método referido usa um segundo anticorpo acoplado ao marcador detectável para detectar o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção.

[055] Em outro aspecto, esta invenção proporciona um método para neutralizar a toxicidade da toxina tetânica em uma amostra, incluindo misturar a amostra contendo toxina tetânica com o anticorpo

monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo desta invenção. O método referido pode ser para fins de diagnóstico ou para fins não de diagnóstico (por exemplo, a amostra pode ser amostra de células da amostra de um paciente).

[056] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma aplicação do anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou do seu fragmento de ligação ao antígeno, e/ou do conjugado, e/ou da composição, e/ou do conjugado, e/ou da combinação de composições para produção do produto de teste para detecção de toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*.

[057] De modo preferencial, o referido produto de teste é um kit de detecção, uma placa de ELISA, ou um chip.

[058] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma aplicação do anticorpo monoclonal neutralizante acima descrito ou do seu fragmento de ligação ao antígeno, e/ou do conjugado, e/ou da composição, e/ou do conjugado, e/ou da combinação de composições para produção de fármacos ou medicações， e/ou prevenção ou tratamento de doenças causadas por toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*.

[059] Em outro aspecto, esta invenção proporciona uma aplicação da molécula de DNA, do vetor de expressão recombinante, da célula recombinante acima descritos para produção de fármacos ou medicações para prevenção ou tratamento de doenças causadas por toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*.

[060] Conforme usado nesta Descrição, o termo “anticorpo” é definido como uma molécula de proteína agindo como um receptor reconhecendo especificamente um antígeno, incluindo imunoglobulina reagindo com antígeno específico, incluindo o anticorpo inteiro, dímero, trímero do polímero de anticorpo, anticorpo bi-específico, anticorpo quimérico, anticorpo recombinante ou manipulado, e um

fragmento do mesmo, contanto que o fragmento contenha a região de ligação ao antígeno.

[061] Um anticorpo inteiro pode pertencer a um tipo de IgA, IgD, IgE, IgM e IgG, e IgG pode incluir os subtipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Fragmento de anticorpo é a região com função de ligação ao antígeno, incluindo Fab, Fab', F(ab') 2 e Fv. Um fragmento Fab contém uma região variável de cadeia leve e uma região variável de cadeia pesada, região constante de cadeia leve e primeira região constante de cadeia pesada (domínio CH1), além disso um sítio de ligação ao antígeno. Fab' difere de Fab por sua região de articulação. O c-término do domínio CH1 de cadeia pesada contém no mínimo um resíduo de cisteína. F(ab') 2 anticorpo é resultado da formação de ligação de dissulfeto entre os resíduos de cisteína localizados na região de articulação do fragmento Fab'. Fv (fragmento variável) é o fragmento mínimo de anticorpo contendo somente uma região variável de cadeia pesada e uma região variável de cadeia leve. Fv de cadeia dupla (dsFv) contém uma região variável de cadeia pesada acoplada a uma região variável de cadeia leve através de ligação de dissulfeto. Fv de cadeia única (scFv) geralmente contém uma região variável de cadeia pesada acoplada a uma região variável de cadeia leve através de um adaptador peptídico. O fragmento de anticorpo referido pode resultar de lise por proteases (tal como usando papaína para zimolisar um anticorpo inteiro de modo a obter o fragmento F(ab') 2). De modo preferencial, um fragmento de anticorpo pode ser construído usando tecnologia de engenharia genética recombinante.

[062] O termo "anticorpo monoclonal neutralizante" é definido como um anticorpo monoclonal com atividade neutralizante. Anticorpos monoclonais são anticorpos com uma composição molecular única com especificidade de ligação única e afinidade para um epítopo específico. Tipicamente, imunoglobulina contém uma

cadeia pesada e uma cadeia leve. Tanto a cadeia pesada quanto a cadeia leve contêm uma região constante e uma região variável (uma região também é denominada um domínio). Cada cadeia leve ou cada cadeia pesada contém quatro regiões de estrutura principal, separadas por três regiões variáveis, também denominadas regiões determinantes de complementaridade (nas partes que se seguem, “CDR”). CDR é essencialmente responsável por ligação ao epítopo do antígeno. As CDRs em cada cadeia são geralmente CDR1, CDR2 e CDR3, conforme numeradas sucessivamente a partir do N-término.

[063] O anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção também inclui suas variantes funcionais, suas variantes funcionais são capazes de se ligarem à toxina tetânica ou a seu fragmento, e têm a atividade neutralizante contra o rererido subtipo ou fragmento de toxina tetânica.

[064] Mais especificamente, as referidas variantes funcionais podem incluir derivados tendo basicamente a sequência primária similar com o anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção, mas com modificações químicas ou bioquímicas que não são encontradas no anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção. As modificações referidas podem incluir acetilação, acilação, ligação de maneira covalente com nucleotídeo ou derivado nucleotídico, ligação de maneira covalente com lipídeo ou derivado lipídico, reticulação, formação de ligação de dissulfeto, glicosilação, hidroxilação, metilação, oxidação, glicosilação de polietileno, hidrólise de proteína e fosforilação.

[065] Opcionalmente, as variantes funcionais podem incluir os seguintes anticorpos monoclonais neutralizantes: uma sequência de aminoácidos com uma ou mais substituição, inserção, ou deleção, ou a combinação das mesmas, de aminoácidos em comparação com a sequência de aminoácidos do anticorpo monoclonal neutralizante de

origem. Além disso, as variantes funcionais podem ter sequência de aminoácidos truncadas em sua extremidade N-terminal ou em sua extremidade C-terminal ou em ambas as extremidades. As variantes funcionais podem ter a mesma afinidade ou afinidade diferente, maior ou menor em comparação com o anticorpo monoclonal neutralizante de origem, mas ainda se ligarem a toxina tetânica ou a seu fragmento. Por exemplo, uma variante funcional desta invenção pode ter afinidade de ligação aumentada ou reduzida com toxina tetânica ou seu fragmento.

[066] De modo preferencial, a sequência de aminoácidos que pode ser modificada inclui, mas não está limitada a, região de estrutura principal, região altamente variável, região especialmente variável de CDR3. Em geral, uma cadeia leve e uma cadeia pesada contêm três regiões altamente variáveis (incluindo três CDRs) e regiões mais conservadas (a chamada região de estrutura principal, FR). Uma região altamete variável contém resíduos de aminoácidos de CDR e loop altamente variável. Os técnicos desta área usam algoritmos de computação de conhecimento geral, tais como Gap ou Bestfit para comparar sequências de aminoácidos, de modo a definir os mesmos resíduos ou resíduos similares. Alguns métodos usados geralmente em biologia molecular (tais como PCR, mutagênese direcionada por oligonucleotídeo, mutagênese direcionada ao sítio) podem ser empregados para modificar anticorpo monoclonal neutralizante de origem ou seu fragmento, ou outra opção é gerar variantes funcionais por síntese orgânica.

[067] Os técnicos desta área também vão entender que as modificações de sequência de aminoácidos de anticorpos antitoxina tetânica cobertas nesta invenção, e como um exemplo, afinidade de ligação modificada ou outras propriedades biológicas dos anticorpos. As variantes de aminoácidos de anticorpo antitoxina tetânica podem

ser produzidas com a introdução de modificações de nucleotídeos apropriadas para a sequência de codificação do anticorpo anti-toxina tetânica, ou por síntese de peptídeo. As modificações referidas podem incluir (por exemplo) substituição, deleção ou inserção de resíduos. A deleção, inserção, substituição de resíduos, ou combinação das mesmas, completa a construção final de variantes funcionais, cujas restrições dependen dos caracteres funcionais requeridos das construções finais. As modificações de aminoácido também podem alterar o processo pós-translação, tal como os números ou sítios de glicosilação.

[068] As vantagens e os efeitos benéficos desta invenção são os seguintes:

[069] Esta invenção desenvolve anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica através de uma plataforma de desenvolvimento sistemático de anticorpos monoclonais totalmente humanos nativos de alta produtividade.

[070] Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica desenvolvidos nesta invenção são aplicáveis para a prevenção e o tratamento de infecção por *Clostridium tetani*.

[071] Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica desenvolvidos nesta invenção são aplicáveis para a detecção de infecção por *Clostridium tetani*.

[072] Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos desenvolvidos na invenção têm uma alta afinidade com toxina tetânica, e altas atividades neutralizantes, são seguros com alta eficácia, livres de contaminação por vírus exógeno, e podem ser amplamente usados em todos os tipos de grupos humanos com altas utilidades industriais.

Descrição das Figuras

[073] A Figura 1 mostra a detecção da expressão e da purificação do anticorpo TRN0010 usando SDS-PAGE e Western Blot, e A para SDS-PAGE, B para Western Blot.

[074] A Figura 2 mostra a detecção da expressão e da purificação do anticorpo TRN0012 usando SDS-PAGE e Western Blot, e A para SDS-PAGE, B para Western Blot.

[075] A Figura 3 mostra a detecção da expressão e da purificação do anticorpo TRN0011 usando SDS-PAGE e Western Blot, e A para SDS-PAGE, B para Western Blot.

[076] A Figura 4 mostra a detecção da expressão e da purificação do anticorpo TRN1015 usando SDS-PAGE e Western Blot, e A para SDS-PAGE, B para Western Blot.

[077] A Figura 5 mostra os resultados para a determinação da atividade neutralizante do anticorpo TRN0010 usando ELISA.

[078] A Figura 6 mostra os resultados para a determinação da atividade neutralizante do anticorpo TRN0012 usando ELISA.

[079] A Figura 7 mostra os resultados para a determinação da atividade neutralizante do anticorpo TRN0011 usando ELISA.

[080] A Figura 8 mostra os resultados para a determinação da atividade neutralizante do anticorpo TRN1015 usando ELISA.

[081] A Figura 9 mostra os resultados para a medição da afinidade do anticorpo TRN0010.

[082] A Figura 10 mostra os resultados para a medição da afinidade do anticorpo TRN002.

[083] A Figura 11 mostra os resultados para a medição da afinidade do anticorpo TRN0011.

[084] A Figura 12 mostra os resultados para a medição da afinidade do anticorpo TRN1015.

[085] A Figura 13 mostra os resultados para os efeitos de

proteção sobre animais com o anticorpo TRN0010.

[086] A Figura 14 mostra os resultados para os efeitos de proteção sobre animais com o anticorpo TRN0012.

[087] A Figura 15 mostra os resultados para os efeitos de proteção sobre animais com o anticorpo TRN0011.

[088] A Figura 16 mostra os resultados para os efeitos de proteção do anticorpo TRN1015 contra 20 vezes a dose de toxina tetânica LD50.

[089] A Figura 17 mostra os resultados para os efeitos de proteção do anticorpo TRN1015 contra 60 vezes a dose de toxina tetânica LD50.

Método de Uso Específico

[090] A seguir esta invenção é descrita adicionalmente em detalhes com figuras e exemplos. Os exemplos que se seguem são somente para descrição adicional sobre esta invenção, e de modo algum limitam o âmbito desta invenção. Algumas das condições e dos métodos podem não ser revelados em detalhes, essas condições e métodos são descritos de modo geral em Molecular Cloning, a Lab Manual by Sambrook *et al*. of New York Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, ou nos recomendados pelos fabricantes.

[091] Exemplo 1. Preparação de anticorpo monoclonal neutralizante contra toxina tetânica totalmente humano.

[092] Isolamento de Células.

[093] Amostras de sangue foram coletadas de voluntários saudáveis injetados com 1500 UI de toxina tetânica, em seguida células mononucleares (PBMC) foram isoladas usando Ficoll. Depois das contagens celulares obtidas, as células do plasma foram isoladas por FACS usando BD FACSria. Células únicas intactas foram colocadas dentro de placas de PCR de 96 cavidades, com uma única célula B de memória por cavidade e em seguida mantidas em freezer

a -80°C para uso futuro.

[094] 2. Isolamento de genes para regiões variáveis de anticorpo

[095] 0,5 mM de primers para cada subtipo de região constante de cadeia pesada e cadeia leve e transcriptase reversa Superscript III foram adicionados dentro da placa de 96 cavidades com célula B única, incubada a 37°C por uma hora. Foi realizada PCR sob os seguintes parâmetros: 93°C 15 min; 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min, 30 ciclos; 72°C 10 min; 4°C 5 min. Produtos de cDNA mantidos a -20°C.

[096] Usar o cDNA acima como modelo para amplificar o gene de anticorpo totalmente humano nativo anti-toxina tetânica. Mistura de 5 ml do produto da reação RT, HotStar Taq Plus polimerase (Invitrogen, Carlsbad, CA), dNTPs, e 0,5 mm de primers específicos para cada subtipo de cadeia pesada e cadeia leve. Condições de reação: pré-desnaturação a 94°C 5 min, seguida por 35 ciclos de PCR com as condições como 94°C x 30s, 55°C x 30s, 72°C x 50s, e como última extensão a 72°C por 7 min. Os produtos de PCR foram identificados com eletroforese por gel agarose a 1%.

[097] 3. Construção de vetor de expressão eucariótica para anticorpo monoclonal totalmente humano nativo contra toxina tetânica.

[098] tomar 2 ml do produto de PCR em eletroforese por gel agarose a 1% para detecção dos resultados da reação de PCR. O produto de PCR positivo com pareamento complementar entre genes para regiões variáveis de cadeia pesada e cadeia leve foram inseridos dentro do vetor de expressão pcDNA3.3(+/-) (da Invitrogen) usando o método de clonagem TA para construir vetor de expressão de anticorpo monoclonal antitoxina tetânica totalmente humano nativo

[099] transformar células DH5a competentes com o vetor de expressão acima, cultivar as células transformadas sobre placa contendo ampicilina a 37°C de um dia para o outro.

[0100] selecionar 10 colônias únicas para confirmação por PCR usando primers especiíicos, condições de reação: pré-desnaturação a 94°C por 5 min, desnaturação a 94°C por 30s, recozimento a 55°C por 30s, extensão a 72°C por 1min 40s, 28 ciclos, e por fim extensão a 72°C por 5 min.

[0101] tomar 5 ml de produto de PCR para confirmação por eletroforese por gel agarose a 1%, e foram identificados transformantes positivos.

[0102] Os resultados mostraram que a sequência do vetor de expressão recombinante de cadeia pesada / leve do anticorpo monoclonal antitoxina tetânica construído estava correta.

[0103] 4. Expressão e identificação de anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo antitoxina tetânica

[0104] Amplificar os plasmídeos expressando genes de anticorpo positivo de cadeias pesada e leve em *E coli* DH5a, e isolar rapidamente os plasmídeos recombinantes. Células 293 foram transfectadas com vetor de expressão de anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo antitoxina tetânica por kit de transfecção de DNA PolyFect de acordo com as instruções do fabricante. Células 293 não transfectadas serviram como controles. Depois de cultura por 96 horas, usando ELISA com IgG de carneiro anti humana marcada com HPR para detectar a expressão do anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo antitoxina tetânica e seu reconhecimento específico da vacina do tétano (antígeno).

[0105] Usar vacina do tétano como antígeno e revestir uma placa de ELISA de 96 cavidades com antígeno diluído 10 vezes, 100 ml por cavidade a 4°C de um dia para o outro. Bloquear com soluções de bloqueio em temperatura ambiente por 2 horas, em seguida incubar com 100 ml de sobrenadante de expressão transitória como anticorpo

primário a 37°C por 2 horas, incubar com 1:2000 de diluição de HRP/anti-His-tag como anticorpo secundário a 37°C por 1 hora, adicionar substância cor líquido 100 ml por cavidade, colocar longe de luz em temperatura ambiente por 5 min, em seguida terminar a reação com ácido sulfúrico a 2M, e detectar em comprimento de onda de 450 nm.

[0106] Os resultados mostraram que células 293 transfectadas com plasmídeos de vetor de expressão expressaram com sucesso anticorpo totalmente humano nativo, e o anticorpo foi capaz de reconhecer especificamente a vacina do tétano (antígeno), ao passo que o sobrenadante da cultura de células 293 não transfectadas não foi capaz de reconhecer a vacina do tétano (antígeno), portanto l células 293 transfectadas transitoriamente expressaram com sucesso anticorpo totalmente humano nativo antitoxina tetânica, o qual reconheceu especificamente a vacina do tétano (antígeno).

[0107] 5. Produção e purificação de anticorpo monoclonal neutralizante anti-toxina tetânica totalmente humano nativo.

[0108] Cotransfectar células 293 com vetor de expressão de cadeia pesada e cadeia leve do anticorpo numerado TRN0010 e identificado positivamente com atividade neutralizante (a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada é estipulada na SEQ ID NO: 7 e a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve é estipulada na SEQ ID NO: 8).

[0109] Cotransfectar células 293 com vetor de expressão de cadeia pesada e cadeia leve do anticorpo numerado TRN0012 e identificado positivamente com atividade neutralizante (a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada é estipulada na SEQ ID NO: 17 e a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve é estipulada na SEQ ID NO: 18).

[0110] Co-transfectar células 293 com vetor de expressão de

cadeia pesada e cadeia leve do anticorpo numerado TRN0011 e identificado positivamente com atividade neutralizante (a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada é estipulada na SEQ ID NO: 22 e a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve é estipulada na SEQ ID NO: 26).

[0111] Co-transfectar células 293 com vetor de expressão de cadeia pesada e cadeia leve do anticorpo numerado TRN1015 e identificado positivamente com atividade neutralizante (a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada é estipulada na SEQ ID NO: 33 e a sequência de aminoácidos de região variável de cadeia leve é estipulada na SEQ ID NO: 34).

[0112] Substituir com meio de cultura fresco 6 a 8 horas depois da transfecção, e incubar continuamente a 37°C em uma incubadora a 8% de CO2 por 96 horas. Coletar o sobrenadante da transfecção e centrifugar a 4000 rpm por 1 hora, em seguida purificar com cromatografia por afinidade por Proteína A. Identificar a expressão e a pureza do anticorpo usando SDS-PAGE e Western Blot. Conforme mostrado nas Figuras 1 a 4, foi obtida proteína relativamente pura, e a cadeia pesada e a cadeia leve do anticorpo foram claramente identificáveis depois de fusão. Nota: Alameda 1 das Figuras 1 a 4A e das Figuras 1 a 4B representando não de fusão, Alameda 2 das Figuras 1 a 4A e das Figuras 1 a 4B representando marcadores de proteína e Alameda 3 1 das Figuras 1 a 4A e das Figuras 1 a 4B representando proteína de fusão.

Exemplo 2. Detecção de atividades neutralizantes de anticorpo monoclonal neutralizante

[0113] Usar vacina do tétano como antígeno e revestir uma placa de ELISA de 96 cavidades com antígeno diluído 10 vezes, 100 ml por cavidade a 4°C de um dia para o outro. Bloquear com soluções de bloqueio em temperatura ambiente por 2 horas, em seguida incubar

com diluição serial de anticorpo purificado como anticorpo primário a 37°C por 2 horas, incubar com 1:2000 de diluição de HRP/anti-His-tag como anticorpo secundário a 37°C por 1 hora, adicionar substância cor líquido 100 ml por cavidade, colocado longe de luz em temperatura ambiente por 5 min, em seguida terminar a reação com ácido sulfúrico a 2M, e detectar em comprimento de onda de 450 nm.

[0114] Os resultados são mostrados nas Figuras 5 a 8. Depois de diluição do anticorpo purificado até não inferior a 10.000 vezes, a concentração do anticorpo foi tão baixa quanto 0,0002 mg/ml. O anticorpo diluído ainda foi capaz de se ligar ao antígeno, mostrando suas fortes atividades de ligação e atividades neutralizantes.

Exemplo 3. Medição da afinidade do anticorpo monoclonal neutralizante

[0115] Acoplar moléculas de captura ao chip CM5 e em seguida ativar a superfície de Dextrano do chip. A quantidade de acoplamento foi controlada pelo tempo de amostragem, e por último capturar ligantes com as moléculas capturadas. O anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo antitoxina tetânica preparado foi usado como ligante, e toxina tetânica diluída com tampão HS-EB foi usada como analito. Analito com concentração aumentada passou através do chip ordenadamente, e os sinais foram registrados respectivamente. Cada concentração de analito reagiu com o chip por um ciclo e depois de cada ciclo, o chip foi regenerado com 10 mmol/L de solução de glicina-HCl para retornar para seu estado original sem ligação de antígeno. Análise cinética da afinidade de ligação de anticorpo monoclonal à toxina tetânica foi realizada usando o software BiaCore X-100 system.

[0116] Os resultados são mostrados nas Figuras 9 a 12 e na Tabela 1, a constante de dissociação de equilíbrio do anticorpo monoclonal neutralizante desta invenção para toxina tetânica é inferior

a 10^{-9} mol, indicando que tem atividades de muito alta afinidade.

[0117] Tabela 1 Resultados da detecção da afinidade do anticorpo monoclonal neutralizante antitoxina tetânica totalmente humano nativo

Anticorpo	Ka (l/Ms)	Kd(l/s)	KD(M)
TRN0010	4.15E+04	1.53E-04	3.68E-09
TRN0012	8.06E+04	3.28E-04	4.07E-09
TRN0011	4.27E+04	3.87E-05	9.05E-09
TRN1015	3.88E+04	9.40E-05	2.43E-09

[0118] Exemplo 4. Experimentos de proteção animal de anticorpo monoclonal neutralizante antitoxina tetânica

[0119] Diluição de anticorpo monoclonal antitoxina tetânica para experimentação

[0120] O anticorpo monoclonal foi diluído até 100 mg/ml, em seguida foi realizada uma diluição serial de 3 vezes, reservada para experimentação.

(2) Diluição de antitoxina padrão

[0121] Misturar solução salina antitoxina de rotina com igual volume de glicerina neutra (esterilizada a 116°C por 10 min) em seguida diluir em 0,5 UI/ml da solução, que proporcionou UI/10 de cada injeção de 0,4 ml depois de misturar com igual volume da solução de toxina. Cada captação da solução antitoxina de rotina não deve ser inferior a 0,5 ml.

(3) Diluição da toxina

[0122] Dissolver toxina em pó liofilizada do Chinese National Biotesting Lab em salina e mistura com igual volume de glicerina neutra (esterilizada a 116°C por 10 min), em seguida diluir a solução de toxina com diluente para concentração de elaboração.

(4) Determinação da dose letal mediana (LD50)

[0123] Diluir a solução de toxina preparada até 10^2, 10^3, 10^4, 10^5,

10^6, e 10^7, para no mínimo 2 ml para cada nível de diluição. Tomar 0,2 ml e injetar em camundongos, 4 para cada grupo, e observar por 5 dias. Calcular de modo a obter a LD50 usando dados experimentais. O grupo experimental vai usar uma quantidade de toxina igual a 20 vezes ou mesmo 60 vezes da LD50.

(5) Determinação do título de anticorpos

[0124] Tomar igual volume de antitoxina diluída e anticorpo diluído serialmente dentro de pequenos tubos de teste, misturar com igual volume de toxina diluída (20 vezes ou 60 vezes de LD50). Depois de misturar homogeneamente, vedar com rolhas dos tubos de teste, reagir por 1 hora a 37°C e em seguida injetar imediatamente nos camundongos. 140 camundongos saudáveis foram tomados e agrupados em 4 camundongos por grupo para o referido experimento. Injetar por via subcutânea 0,4 ml as misturas acima no abdômen de camundongos de 18 a 22 g (para grupos de controle negativo, injetar 0,2 ml de toxina + 0,2 ml de salina tamponada com borato; para grupos de controle positivo, injetar 0,2 ml de toxina + 0,2 ml de antitoxina; e para grupos experimentais, injetar 0,2 ml de toxina + 0,2 ml de anticorpo monoclonal). Observar o estado dos camundongos duas vezes a cada dia, uma de manhã e uma de tarde, registrando a doença e a morte dos camundongos.

[0125] Os resultados são mostrados nas Figuras 13 a 16. Quando atacados com 20 vezes toxina tetânica LD50, todos os camundongos nos grupos de controle negativo foram mortos, exceto pelos camundongos nos grupos experimentais com 1,85 mg/ml de anticorpo TRN0010 que morreram depois de 7 dias, todos os camundongos em todos os outros grupos experimentais (0,62 mg/ml, 5,56 mg/ml, 16,67 mg/ml, 50 mg/ml) e todos os camundongos nos grupos de controle positivo sobreviveram. Isto indica que baixa dose de anticorpo monoclonal, tão baixa quanto 0,62 mg/ml, foi equivalente a 10 UI/ml de

antitoxina de rotina. O anticorpo monoclonal é capaz de proteger os animais contra o ataque da dose letal da toxina tetânica, e tem cerca da mesma atividade protetora que a antitoxina de rotina. A dose prática de anticorpo monoclonal desta invenção foi bem menor do que a da antitoxina de rotina, indicando que seus efeitos foram superiores aos da antitoxina. Os resultados indicam que o anticorpo monoclonal desta invenção tem capacidade de neutralizar a toxina dentro do corpo dos camundongos, para proteger os camundongos e tem atividades *in vivo*.

[0126] Conforme mostrado na Figura 17, quando sob um ataque de maior dose de toxina tetânica (60 vezes LD50), os camundongos nos grupos de controle negativo morreram dentro de 24 horas, os camundongos nos grupos experimentais de baixa dose (0,62 mg/ml, 1,85 mg/ml) morreram dentro de 7 dias, os camundongos nos grupos experimentais de dose média e alta (5,56 mg/ml, 16,67mg/ml e 50 mg/ml) todos sobreviveram dentro de 7 dias, indicando que o anticorpo monoclonal desta invenção foi capaz de defender contra ataque de alta dose de toxina, também indicando que o anticorpo monoclonal possui atividades neutralizantes in vivo extremamente fortes.

[0127] Embora somente vários exemplos de métodos específicos de uso sejam discutidos acima aqui, neste requerimento de patente, os técnicos desta área vão entender que aqueles são somente alguns exemplos. O âmbito de proteção desta invenção é definido nas reivindicações. Os técnicos desta área podem modificar ou alterar alguns dos métodos específicos de uso sem se desviar do princípio e da essência desta invenção, todas as referidas modificações ou alterações estão dentro do âmbito de proteção desta invenção.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal neutralizante totalmente humano nativo contra toxina tetânica ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, caracterizado pelo fato de que o anticorpo monoclonal neutralizante compreende no mínimo um domínio variável de cadeia pesada (VH) tendo três CDRs e no mínimo um domínio variável de cadeia leve (VL) tendo três CDRs:

em que uma sequência de aminoácidos das CDR1, CDR2, CDR3 do VH é estipulada na SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 27, 28, 29, ou é uma sequência conforme mostrado na SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 27, 28, 29 e tendo substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou é uma sequência a qual no mínimo 80% de identidade com a SEQ ID NO: 1, 2, 3, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 27, 28, 29 e tem as mesmas funções ou funções similares; e uma sequência de aminoácidos das CDR1, CDR2, CDR3 do VL é estipulada na SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 30, 31, 32, ou é uma sequência conforme mostrado na SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 30, 31, 32 e tendo substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou é uma sequência a qual no mínimo 80% de identidade com a SEQ ID NO: 4, 5, 6, 13, 14, 15, 23, 24, 25, 30, 31, 32 e tem as mesmas funções ou funções similares;

de modo preferencial,

em que as sequências de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VH do anticorpo monoclonal neutralizante correspondem à SEQ ID NO: 1, à SEQ ID NO: 2, e à SEQ ID NO: 3, respectivamente; em que as sequências de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VL correspondem à SEQ ID NO: 4, à SEQ ID NO: 5, e à SEQ ID NO: 6, respectivamente;

em que as sequências de aminoácidos das CDR1, CDR2 e

CDR3 de VH do anticorpo monoclonal neutralizante correspondem à SEQ ID NO: 9, à SEQ ID NO: 10, e à SEQ ID NO: 11, respectivamente; em que as sequências de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VL correspondem à SEQ ID NO: 13, à SEQ ID NO: 14, e à SEQ ID NO: 15, respectivamente;

em que as sequências de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VH do anticorpo monoclonal neutralizante correspondem à SEQ ID NO: 19, à SEQ ID NO: 20, e à SEQ ID NO: 21, respectivamente; em que a sequência de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VL correspondem à SEQ ID NO: 23, à SEQ ID NO: 24, e à SEQ ID NO: 25, respectivamente;

em que a sequência de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VH do anticorpo monoclonal neutralizante correspondem à SEQ ID NO: 27, à SEQ ID NO: 28, e à SEQ ID NO: 29, respectivamente; em que a sequência de aminoácidos das CDR1, CDR2 e CDR3 de VL correspondem à SEQ ID NO: 30, à SEQ ID NO: 31, e à SEQ ID NO: 32, respectivamente.

2. Anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, uma sequência de aminoácidos do VH é estipulada na SEQ ID NO: 7, na SEQ ID NO: 17, na SEQ ID NO: 22, na SEQ ID NO: 33, ou é uma sequência conforme mostrado na SEQ ID NO: 7, na SEQ ID NO: 17, na SEQ ID NO: 22, na SEQ ID NO: 33 e tendo substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou é uma sequência a qual no mínimo 80% de identidade com a SEQ ID NO: 7, com a SEQ ID NO: 17, com a SEQ ID NO: 22, com a SEQ ID NO: 33 e tem as mesmas funções ou funções similares; e uma sequência de aminoácidos do VL é estipulada na SEQ ID NO: 8, na SEQ ID NO: 18, na SEQ ID NO: 26, na SEQ ID NO: 34, ou é uma sequência conforme mostrado na SEQ ID NO: 8, na SEQ ID NO: 18, na SEQ ID NO: 26, na

SEQ ID NO: 34 e tendo substituição, deleção ou inserção de um ou mais aminoácidos da mesma, ou é uma sequência a qual no mínimo 80% de identidade com a SEQ ID NO: 8, com a SEQ ID NO: 18, com a SEQ ID NO: 26, com a SEQ ID NO: 34 e tem as mesmas funções ou funções similares;

de modo preferencial,

em que a sequência de aminoácidos do VH do anticorpo monoclonal neutralizante é estipulada na SEQ ID NO: 7, e a sequência de aminoácidos do VL é estipulada na SEQ ID NO: 8;

em que a sequência de aminoácidos do VH do anticorpo monoclonal neutralizante é estipulada na SEQ ID NO: 17, e a sequência de aminoácidos do VL é estipulada na SEQ ID NO: 18;

em que a sequência de aminoácidos do VH do anticorpo monoclonal neutralizante é estipulada na SEQ ID NO: 22, e a sequência de aminoácidos do VL é estipulada na SEQ ID NO: 26;

em que a sequência de aminoácidos do VH do anticorpo monoclonal neutralizante é estipulada na SEQ ID NO: 33, e a sequência de aminoácidos do VL é estipulada na SEQ ID NO: 34.

3. Anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que, o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se ligando imuno especificamente com toxina tetânica, e o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo se dissociam da toxina tetânica e/ou *Clostridium tetani* com uma constante de dissociação de equilíbrio não superior a 10^{-6}M.

4. Molécula de DNA caracterizada pelo fato de que codifica o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3.

5. Vetor de expressão recombinante, caracterizado pelo fato de que o referido vetor de expressão recombinante compreende a molécula de DNA como definida na reivindicação 4.

6. Célula recombinante, caracterizada pelo fato de que a referida célula recombinante é obtida por transformação ou transfecção de uma célula hospedeira com o vetor de expressão recombinante como definido na reivindicação 5.

7. Complexo, caracterizado pelo fato de que, o referido complexo compreende o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3, e um marcador químico ou biológico ligando de maneira covalente ao anticorpo monoclonal neutralizante ou ao fragmento de ligação ao antígeno do mesmo; de modo preferencial, a referida marcação química inclui marcação isotópica, marcação com imunotoxina, e marcação com fármaco químico, e a referida marcação biológica inclui marcação com biotina, marcação com avidina, marcação enzimática, marcação fluorescente, e marcação com agente de transferência de elétrons.

8. Conjugado, caracterizado pelo fato de que, o referido conjugado é formado por conjugação entre o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3 e um meio sólido ou semi-sólido, e/ou entre o complexo como definido na reivindicação 7 e um meio sólido ou semissólido.

9. Composição, caracterizada pelo fato de que, a composição compreende o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3, e/ou o complexo com definido na reivindicação 7, e/ou o conjugado como definido na reivindicação 8.

10. Produto de teste, caracterizado pelo fato de que, o produto de teste compreende o anticorpo monoclonal neutralizante ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3, e/ou o complexo como definido na reivindicação 7, e/ou o conjugado como definido na reivindicação 8, e/ou a composição como definida na reivindicação 9; de modo preferencial, o produto de teste compreende um kit, uma placa de ELISA, ou um chip.

11. Método, o método caracterizado pelo fato de que compreende o uso do anticorpo monoclonal neutralizante ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3; o método é qualquer um entre:

um método para detectar a existência ou o nível de toxina tetânica ou *Clostridium tetani* em uma amostra;

um método para detectar se um sujeito está infectado com toxina tetânica ou *Clostridium tetani*; ou

um método para neutralizar a toxicidade da toxina tetânica em uma amostra.

12. Utilização, caracterizada pelo fato de ser qualquer uma entre:

utilização do anticorpo monoclonal neutralizante ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido em qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3, e/ou do complexo como definido na reivindicação 7, e/ou do conjugado como definido na reivindicação 8, e/ou da composição como definida na reivindicação 9 na fabricação de uma produção de teste para detectar toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*;

utilização do anticorpo monoclonal neutralizante ou do fragmento de ligação ao antígeno do mesmo como definido na

qualquer uma entre as reivindicações 1 a 3, e/ou do complexo como definido na reivindicação 7, e/ou do conjugado como definido na reivindicação 8, e/ou da composição como definido na reivindicação 9 na fabricação de uma medicação para prevenção ou tratamento de uma doença induzida por toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*;

utilização de molécula de DNA como definida na reivindicação 4, o vetor de expressão de recombinação como definido na reivindicação 5, ou da célula de recombinação como definido na reivindicação 6, na fabricação de uma medicação para prevenção ou tratamento de uma doença induzida por toxina tetânica ou infecção por *Clostridium tetani*.

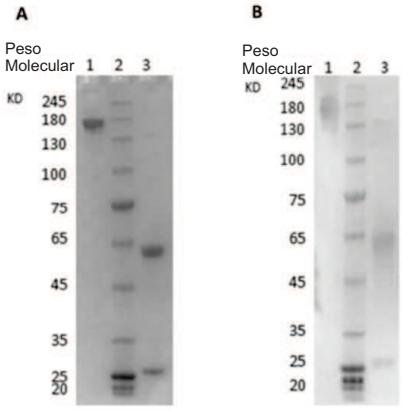


Fig .1

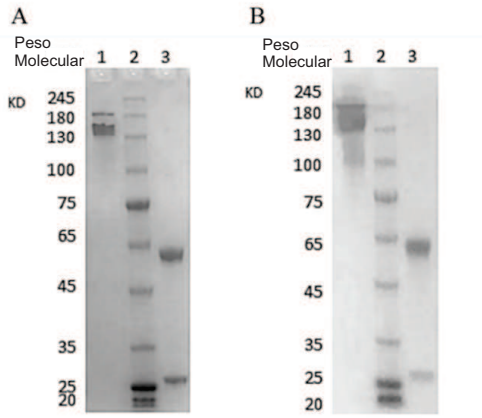


Fig .2

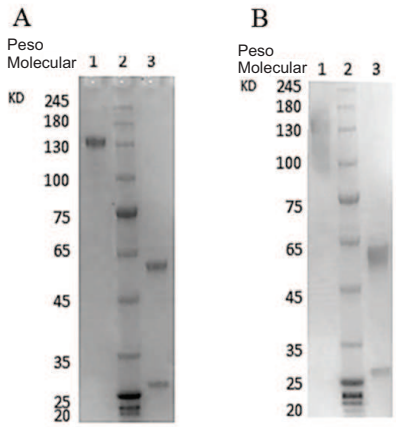


Fig .3

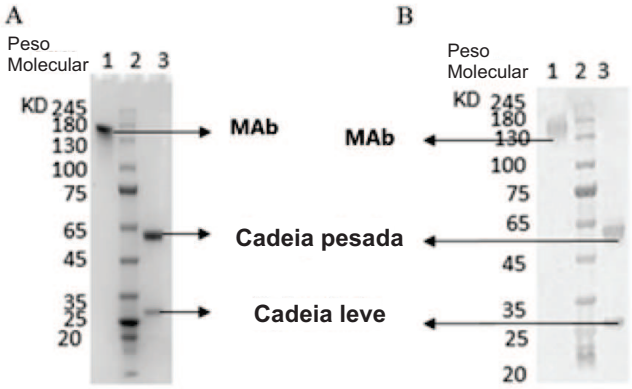


Fig .4

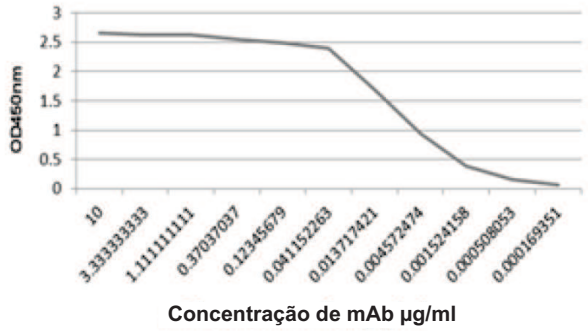


Fig .5

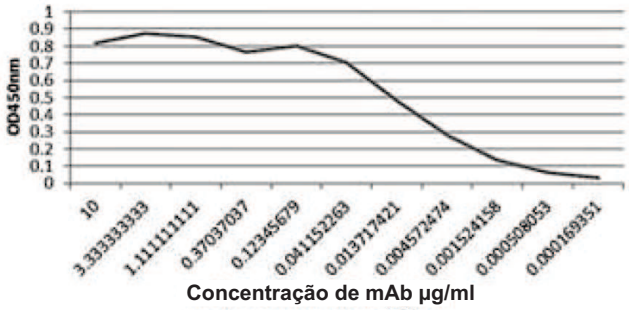


Fig .6

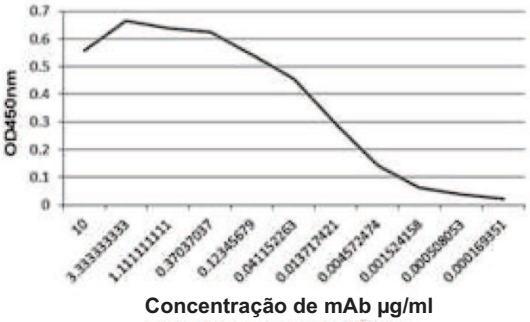


Fig .7

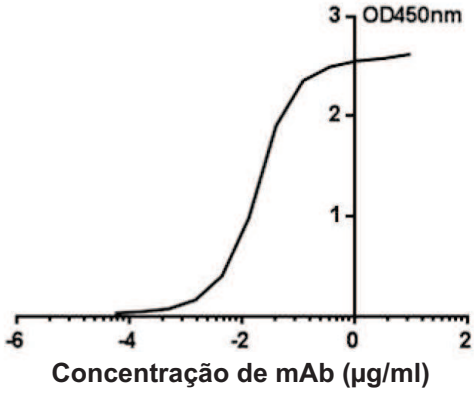


Fig .8

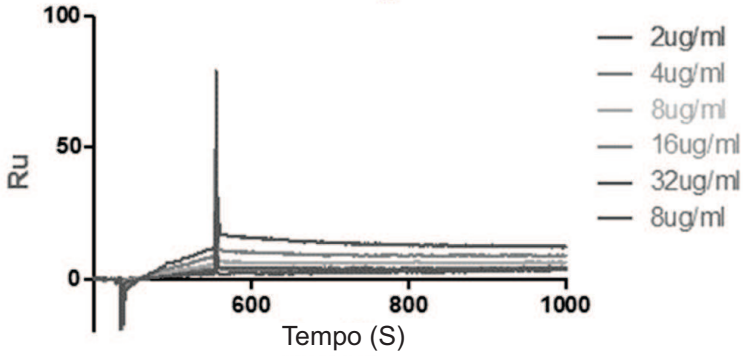


Fig .9

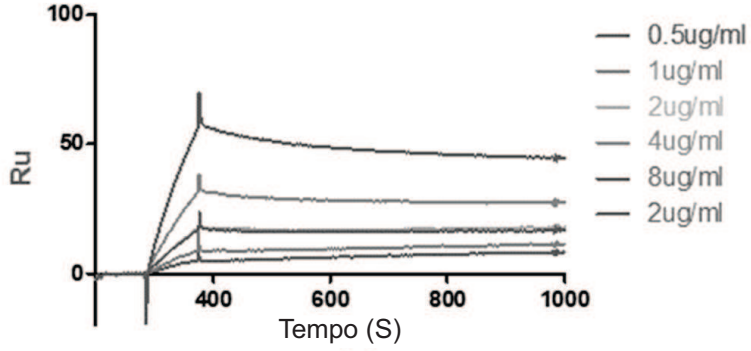


Fig .10

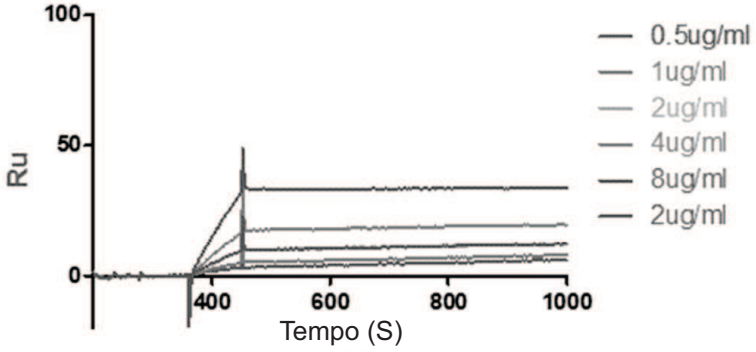


Fig .11

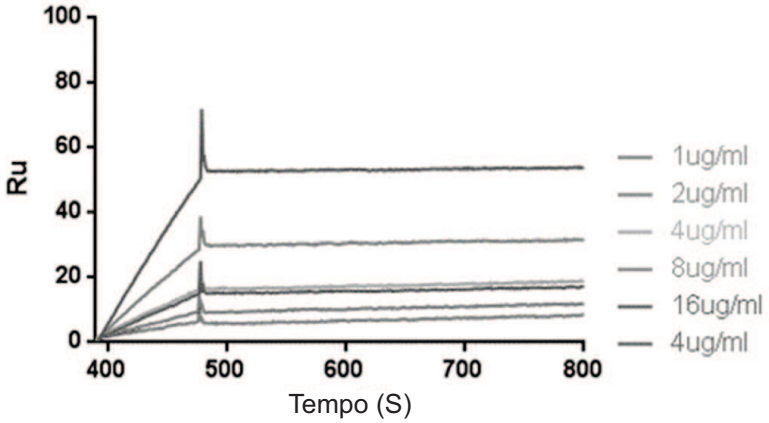


Fig .12

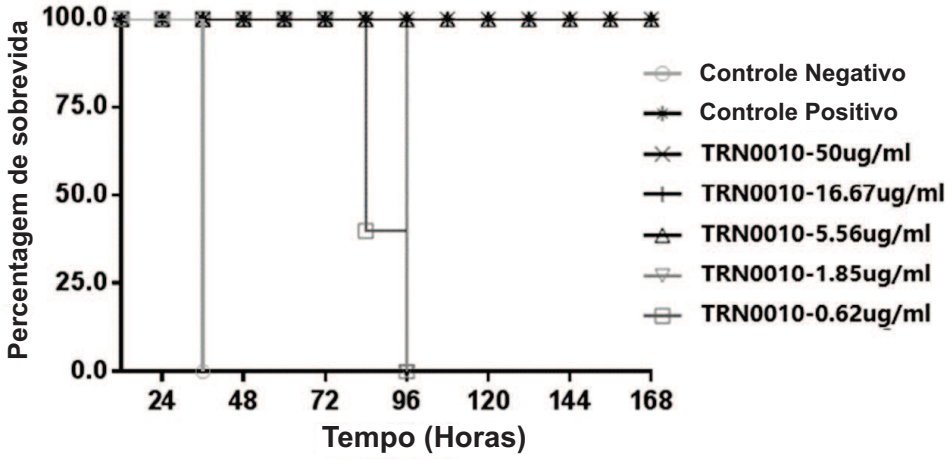


Fig .13

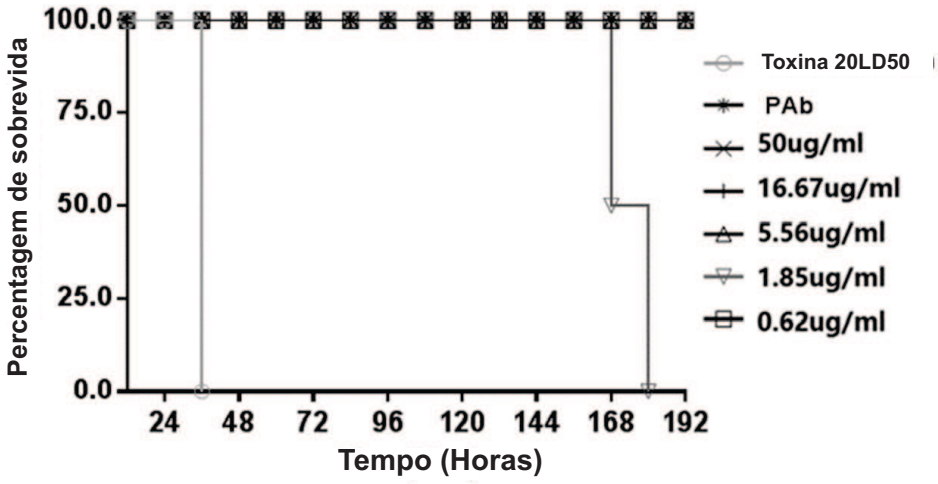


Fig .14

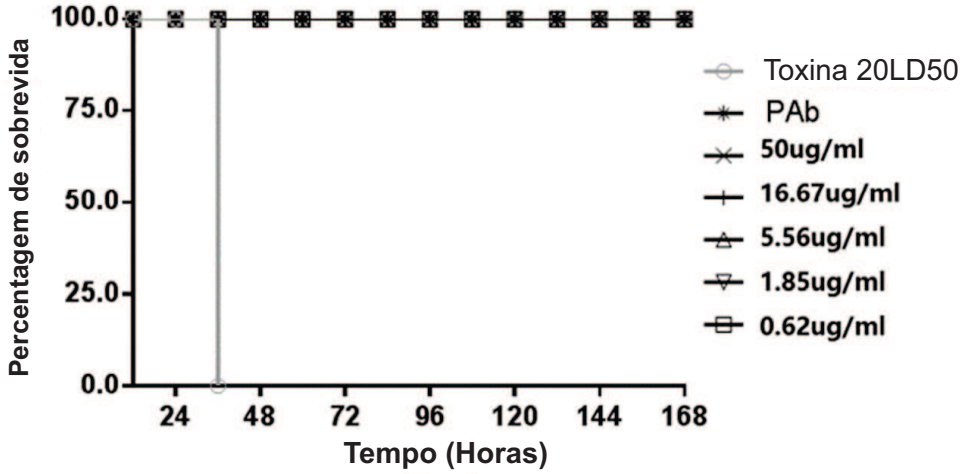


Fig .15

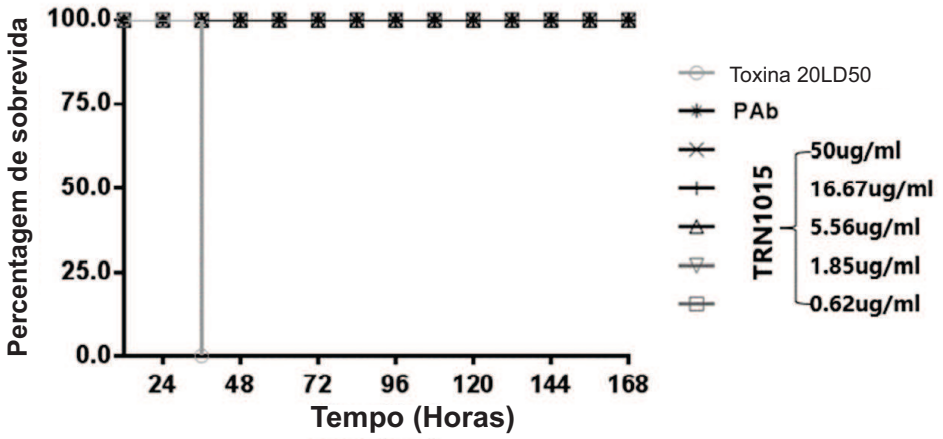


Fig .16

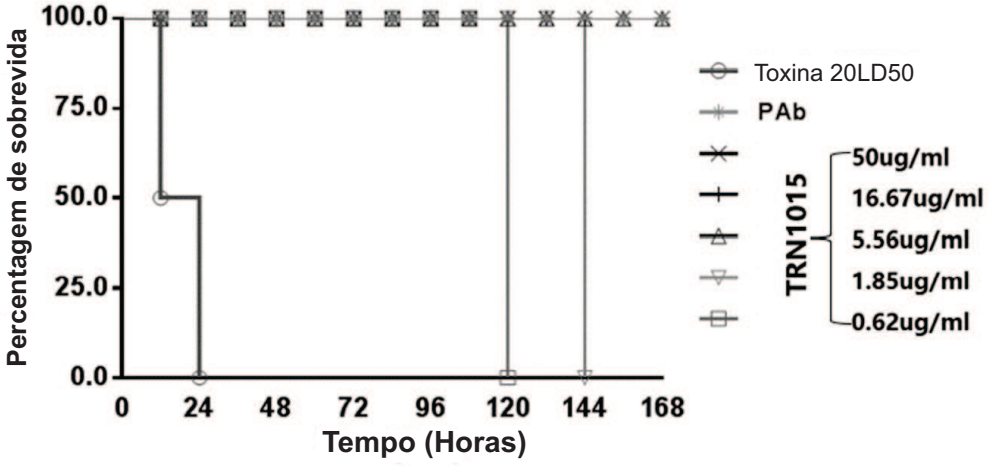


Fig .17

RESUMO

Patente de Invenção: **“ANTICORPO MONOCLONAL NEUTRALIZANTE TOTALMENTE HUMANO NATIVO CONTRA TOXINA TETÂNICA E SUAS APLICAÇÕES”.**

A presente invenção se refere a anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica. Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente humanos nativos contra toxina tetânica desenvolvidos da invenção através de uma plataforma sistemática de alta produtividade que seja especializada para identificar e desenvolver anticorpo nativo humano. Os anticorpos monoclonais neutralizantes descritos na invenção podem ser usados na prevenção, tratamento e teste de infecção por *Clostridium tetani*. Os anticorpos monoclonais neutralizantes totalmente homanos desenvolvidos na invenção têm uma alta afinidade com a toxina tetânica, bem como possuem altas atividades neutralizantes contra a toxina, seguros de uso com alta eficácia de prevenção de doença, livres de contaminação por vírus exógeno, e são amplamente aplicáveis a vários grupos humanos com fortes aplicações industriais.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: LISTAGEM DE SEQUENCIA (EV) 30-06-2020 P247887.
- Data de Geração do Código: 30/06/2020
- Hora de Geração do Código: 17:09:08
- Código de Controle:
  - Campo 1: 8A9AF8C3421069BB
  - Campo 2: 6A1151F0F35C94F8