



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

(11) BR 112016025009-5 B1



(22) Data do Depósito: 20/05/2015

(45) Data de Concessão: 02/08/2022

(54) Título: COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE À PROTEÍNA SPIKE DO MERS-COV E SEU USO

(51) Int.Cl.: A61K 39/215; C07K 16/08; A61K 39/00.

(30) Prioridade Unionista: 17/09/2014 US 62/051,717; 23/05/2014 US 62/002,233; 30/05/2014 US 62/004,971; 30/10/2014 US 62/072,716.

(73) Titular(es): REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

(72) Inventor(es): CHRISTOS KYRATSOUS; NEIL STAHL; SUMATHI SIVAPALASINGAM.

(86) Pedido PCT: PCT US2015031800 de 20/05/2015

(87) Publicação PCT: WO 2015/179535 de 26/11/2015

(85) Data do Início da Fase Nacional: 26/10/2016

(57) Resumo: ANTICORPO RECOMBINANTE ISOLADO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO, SEU USO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA DE POLINUCLEOTÍDEO ISOLADO, VETOR, MÉTODO PARA PRODUZIR UMA CÉLULA TRANSGÊNICA E USO DA MESMA. A presente invenção refere-se aos anticorpos monoclonais que se ligam a Síndrome Respiratória do Oriente médio - Coronavírus (MERS-CoV) do pico de proteína, e aos métodos de utilização. Em várias modalidades da presente invenção, os anticorpos são anticorpos completamente humanos que se ligam a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção são úteis para inibir ou neutralizar a atividade de MERS-CoV, proporcionando assim um meio para o tratamento ou prevenção da infecção MERS em seres humanos. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a uma combinação de um ou mais anticorpos que se ligam a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV para uso no tratamento de infecção de MERS. Em certas modalidades, um ou mais anticorpos se ligam a epitopos distintos não concorrentes compreendidos no domínio de ligação do receptor da proteína de superfície "spike" de MERS-CoV.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA COMPREENDENDO ANTICORPO OU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO DO MESMO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE À PROTEÍNA "SPIKE" DO MERS-COV E SEU USO**".

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se aos anticorpos humanos e aos fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos humanos que se ligam especificamente a proteína de superfície "spike" da Síndrome Respiratória do Oriente médio - Coronavírus (MERS-CoV), e métodos terapêuticos e de diagnóstico de utilização desses anticorpos.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA RELACIONADA

[002] Síndrome Respiratória do Oriente Médio - Coronavírus (MERS-CoV) é um betacoronavírus recém-emergente que causa a doença respiratória aguda grave. Ele foi isolado pela primeira vez na Arábia Saudita em 2012 (Zaki *et al.*, 2012, NEJM 367: 1814 a 1820) e desde então se espalhou para cerca de 18 países com a maior parte dos casos na Arábia Saudita e Emirados Árabes Unidos. Em 15 de maio de 2014, a Organização Mundial de Saúde relatou 571 casos de MERS, incluindo 171 mortes. Dois casos de infecção MERS têm sido descobertos recentemente nos EUA. As características clínicas da infecção MERS-CoV em seres humanos variam desde uma infecção assintomática a pneumonia muito grave, com potencial de desenvolvimento da síndrome da angústia respiratória aguda, choque séptico e falência de múltiplos órgãos, resultando em morte.

[003] Mers-CoV compartilha similaridade com coronavírus de morcego HKU4 e HKU5. O vírus usa o seu pico de proteína para a interação com um receptor celular para a entrada em uma célula-alvo. Raj *et al.*, mostraram que o vírus se liga por meio do domínio de ligação ao receptor da sua proteína de superfície "spike" de dipeptidil pep-

tidase 4 (DPP4) em epitelial humano e células endoteliais (Raj *et al.*, 2013, Nature 495: 251 a 256). Lu *et al.*, 2013 demonstraram que a domínio de ligação ao receptor MERS-CoV constituído por meio de um núcleo e um subdomínio de ligação ao receptor que interage com a DPP4 (Lu *et al.*, 2013, Nature 500: 227 a 231).

[004] WO2014/045254 descreve o isolamento e caracterização de Mers-CoV, o pico de proteína e os anticorpos policlonais contra o domínio de ligação ao receptor da proteína de superfície "spike". Os anticorpos monoclonais neutralizantes para o domínio da proteína de superfície "spike" de ligação ao receptor foram descritos por, por exemplo, Du *et al.*, (2014, J. Virol.), Ying *et al.*, (2014, J. Virol.), Tang, *et al.*, (2014, PNAS) e Jiang *et al.*, (2014, Sci. Transl. Med. Vol. 6, 234ra59).

[005] Até agora, não houve nenhuma vacina ou agente terapêutico para prevenir ou tratar a infecção MERS. Em vista da constante ameaça para a saúde humana e uma elevada taxa de mortalidade (30%), há uma necessidade urgente de terapias antivirais preventivas e terapêuticas para o controle de MERS. Os anticorpos completamente humanos que se ligam especificamente a proteína de superfície "spike" MERS-CoV com elevada afinidade e inibem a infecciosidade do vírus pode ser importante na prevenção e tratamento da infecção MERS.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[006] A presente invenção refere-se a anticorpos e os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam a proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Os anticorpos da presente invenção são úteis, *inter alia*, para inibir ou neutralizar a atividade da proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Em algumas modalidades, os anticorpos são úteis para bloquear a ligação do vírus ao seu receptor da célula hospedeira dipeptidil-peptidase 4 (DPP4) e para prevenir a entrada de vírus MERS-Corona em células hospedeiras. Em algumas modalida-

des, os anticorpos funcionam através da inibição da transmissão célula-a-célula do vírus. Em certas modalidades, os anticorpos são úteis na prevenção, tratamento ou melhoria de pelo menos um sintoma da infecção MERS-CoV em um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos podem ser administrados profilaticamente ou terapêuticamente a um indivíduo tendo ou estando em risco de ter infecção MERS-CoV.

[007] Os anticorpos da presente invenção podem ser de comprimento completo (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4) ou podem compreender apenas uma porção de ligação ao antígeno (por exemplo, um fragmento Fab, F (ab')₂ ou scFv), e podem ser modificados para afetar a funcionalidade de, por exemplo, aumentando a persistência no hospedeiro ou eliminando as funções efetoras residuais (Reddy *et al.*, 2000, *J. Immunol* 164: 1925 a 1933). Em certas modalidades, os anticorpos podem ser biespecíficos.

[008] Em um primeiro aspecto, a presente invenção refere-se a anticorpos monoclonais recombinantes isolados ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Em algumas modalidades, os anticorpos são anticorpos monoclonais totalmente humanos. Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção ligam-se a um epítipo dentro do domínio de ligação ao receptor (RBD) da proteína de superfície "spike" de Mers-CoV. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a anticorpos e os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam a um aminoácido selecionado de entre os aminoácidos 367-606 de Número de Acesso GenBank AFS88936.1 (SEQ ID NO: 457). Em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção ligam-se a proteína de superfície "spike" de Mers-CoV isolado EMC/2012. Em certas modalidades, os anticorpos ligam-se a espiga de proteína de diferentes MERS-CoV isolados.

[009] Os anticorpos anti-MERS-CoV-S exemplificativos da presente invenção estão listados nas Tabelas 2 e 3 apresentadas na presente invenção. A Tabela 2 apresenta os identificadores de sequências de aminoácidos das regiões da cadeia pesada variável (HCVRs), regiões determinantes das regiões variáveis da cadeia leve (LCVRs), regiões determinantes da cadeia pesada de complementaridade (HCDR1, HCDR2 e HCDR3), e da cadeia leve de complementaridade (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) de anticorpos exemplares anti-Mers-CoV-S. A Tabela 3 apresenta as sequências de ácidos nucleicos identificadores dos HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dos exemplos de anticorpos anti-MERS-CoV-S.

[0010] A presente invenção refere-se a anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma HCVR que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0011] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma LCVR que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácido LCVR listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0012] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma HCVR e um par sequência de aminoácidos LCVR (HCVR/LCVR) que compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR listados na Tabela 2 emparelhadas com qualquer uma das sequências

de aminoácidos LCVR listados na Tabela 2. De acordo com certas modalidades, a presente invenção refere-se a anticorpos, ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende um par de sequência de aminoácidos de HCVR/LCVR contido dentro de qualquer um dos anticorpos anti-MERS-CoV-S exemplares enumerados na Tabela 2. Em certas modalidades, o par da sequência de aminoácidos HCVR/LCVR é selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10, 18/26, 34/42, 50/58, 66/74, 82/90, 98/106, 114/106, 122/106, 130/106, 138/106, 146/106, 154/162, 170/162, 178/162, 186/194, 202/210, 218/226, 234/242, 250/258, 266/274, 282/290, 298/306, 314/322, 330/338, 346/354, 362/370, 378/386, 394/402, 410/418, 426/434 , e 442/450. Em certas modalidades, o par da sequência de aminoácidos HCVR/LCVR é selecionado a partir de uma de SEQ ID NOs: 2/10 (por exemplo, H1H15177P), 18/26 (por exemplo, H1H15188P), 66/74 (por exemplo, H1H15211P), 114/106 (por exemplo, H1H15231P2), 170/162 (por exemplo, H1H15260P2) ou 218/226 (por exemplo, H1H15277N).

[0013] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma cadeia pesada CDR1 (HCDR1) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR1 listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0014] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma CDR2 da cadeia pesada (HCDR2) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR2 listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo

menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0015] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma CDR3 da cadeia pesada (HCDR3) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR3 listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0016] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma CDR1 da cadeia leve (LCDR1) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0017] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma CDR2 da cadeia leve (LCDR2) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR2 listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0018] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma CDR3 da cadeia leve (LCDR3) que compreende uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR3 listados na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente similar possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0019] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende uma HCDR3 e um par de sequência de aminoácido LCDR3 (HCDR3/LCDR3) que compreende qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR3 listados na Tabela 2 emparelhado com qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR3 listados na Tabela 2. De acordo com certas modalidades, a presente invenção refere-se a anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende um par de sequência de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contido dentro de qualquer um dos anticorpos anti-meros exemplificativos-CoV-S listados na Tabela 2. Em certas modalidades, o par de sequência de aminoácidos HCDR3/LCDR3 é selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8/16 (por exemplo, H1H15177P), 24/32 (por exemplo, H1H15188P), 72/80 (por exemplo, H1H15211P), 120/112 (por exemplo, H1H15231P2), 176/168 (por exemplo, H1H15260P2) e 224/232 (por exemplo, H1H15277N).

[0020] A presente invenção também se refere aos anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende um conjunto de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3-) contidos dentro de qualquer um dos anticorpos anti-MERS-COV-S exemplares listados na Tabela 2. Em certas modalidades, a sequência de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 definidos é selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16 (por exemplo, H1H15177P), 20-22-24-28-30-32 (por exemplo, H1H15188P); 68-70-72-76-78-80 (por exemplo, H1H15211P); 116-118-120-108-110-112 (por exemplo, H1H15231P2); 172-174-176-164-166-168 (por exemplo, H1H15260P2) e 220-222-224-228-230-232 (por exemplo, H1H15277N).

[0021] Em uma modalidade relacionada, a presente invenção refere-se a anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos,

que compreende um conjunto de seis CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contidos dentro de um par de sequência de aminoácido HCVR/LCVR, tal como definido por meio de qualquer um dos anticorpos anti-MERS-CoV-S exemplares listados na Tabela 2. Por exemplo, a presente invenção inclui os anticorpos, ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, que compreende o conjunto de sequências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 contido dentro de um par de sequência de aminoácidos de HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10 (por exemplo, H1H15177P), 18/26 (por exemplo, H1H15188P); 66/74 (por exemplo, H1H15211P); 114/106 (por exemplo, H1H15231P2); 170/162 (por exemplo, H1H15260P2) e 218/226 (por exemplo, H1H15277N). Métodos e técnicas para a identificação de CDRs dentro das sequências de aminoácidos de HCVR e LCVR são bem conhecidos na técnica e podem ser usados para identificar CDR dentro das sequências de aminoácidos HCVR e/ou LCVR especificadas descritas na presente invenção. As convenções exemplificativas que podem ser utilizadas para identificar os limites da CDR incluem, por exemplo, a definição de Kabat, a definição de Chothia, e a definição de AbM. Em termos gerais, a definição de Kabat é baseada na variabilidade de sequências, a definição de Chothia é baseada na localização das regiões de ansa estrutural, e a definição de AbM é um compromisso entre as abordagens de Kabat e Chothia. Vide, por exemplo, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).; Al-Lazikani *et al.*, J. Mol. Biol. 273: 927 a 948 (1997); e Martin *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EUA 86: 9.268 a 9.272 (1989). As bases de dados públicos também estão disponíveis para a identificação de sequências de CDR dentro de um anticorpo.

[0022] A presente invenção inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S

que têm um padrão de glicosilação alterado. Em algumas modalidades, a modificação para remover os locais de glicosilação indesejáveis pode ser útil, ou um anticorpo falta uma porção de fucose presente na cadeia de oligossacarídeo, por exemplo, para aumentar a função do anticorpo dependente da citotoxicidade celular (ADCC) (vide Shield *et al.*, (2002) JBC 277: 26733). Em outras aplicações, a modificação de galactosilação pode ser feita de modo a modificar a citotoxicidade dependente do complemento (CDC).

[0023] A presente invenção também se refere aos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que competem para a ligação específica de Mers-CoV-S com um anticorpo ou um fragmento do mesmo contendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que HCVR e LCVR se liga cada uma ao antígeno tendo uma sequência de aminoácidos selecionada entre as sequências de HCVR e LCVR listadas na Tabela 2.

[0024] A presente invenção também se refere aos anticorpos e aos fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se cruzam-competem para a ligação a MERS-CoV-S com um anticorpo de referência ou um fragmento de ligação ao antígeno, que compreende as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e LCVR cada uma tem uma sequência de aminoácidos selecionada entre as sequências de HCVR e LCVR listados na Tabela 2.

[0025] Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, pode ligar-se especificamente a Mers-CoV-S de uma forma agonista, isto é, pode aumentar ou estimular a ligação e/ou atividade de Mers-CoV-S; em outras modalidades, o anticorpo pode ligar-se especificamente a Mers-CoV-S de uma forma antagonista, isto é, pode bloquear MERS-CoV-S da ligação ao seu receptor (DPP4).

[0026] A presente invenção refere-se a também anticorpos isola-

dos e fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a ligação a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV a DPP4. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que bloqueia a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV a DPP4 pode ligar-se ao mesmo epítipo na proteína de superfície "spike" MERS-CoV como DPP4 ou pode ligar-se a um epítipo diferente na proteína de superfície "spike" de MERS-CoV como DPP4. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se a anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a ligação de Mers-CoV-S para ser humano, camelo bastão ou DPP4.

[0027] Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção são biespecíficos que compreendem uma primeira especificidade de ligação para um primeiro epítipo do domínio de ligação ao receptor da proteína de superfície "spike" MERS-CoV e uma segunda especificidade de ligação para um segundo epítipo no domínio de ligação ao receptor da proteína de superfície "spike" MERS-CoV, em que os primeiro e segundo epítipos são distintos e não sobrepostos.

[0028] Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um anticorpo isolado ou o fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que tem uma ou mais das seguintes características: (a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano; (B) é isolado a partir de uma linhagem celular de hibridoma selecionada de entre o grupo que consiste em HBVX06H05, HBVX11H04, HBVX11D02, HBVZ10E10, HBVY09F08, HBVZ05G02, HBVZ09B06, HBVY01F08, HBVY10G02, HBVY04B06, HBVY07D10, HBVZ08A09, HBVZ05G04, HBVY06C07, HBVY03H06, HBVZ10G06, HBVZ04F10, HBVX11E09, HBVY06H09, HBVZ05B11, HBVY02E05 e HBVZ04C07; (C) interage com um ou mais resíduos de aminoácidos no domínio de ligação ao receptor da proteína de superfície "spike" MERS-CoV selecionada a partir de resíduos de aminoáci-

dos 367 a 606 da SEQ ID NO: 457; (D) liga-se a proteína de superfície "spike" MERS-CoV com uma constante de dissociação (KD) inferior a 10^{-9} M, tal como medido em um ensaio de ressonância plasmônica de superfície; (E) bloqueia a ligação da proteína de superfície "spike" MERS-CoV a dipeptidil-peptidase 4 (DPP4) por mais de 90%, tal como medido em um ensaio de bloqueio de ELISA; (F) neutraliza a infecciosidade MERS-CoV de células hospedeiras humanas por mais de 90% e com um IC50 inferior a 4 nM, como medido em uma partícula semelhante ao vírus de ensaio de neutralização (VLP); (G) neutraliza a infecciosidade de MERS-CoV em que os MERS-CoV compreendem um isolado do vírus selecionado a partir do grupo que consiste em EMC/2012, Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England 1, Hafr-Al-Batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE e Wadi-Ad-Dawasir; e (h) é um anticorpo biespecífico que compreende uma primeira especificidade de ligação para um primeiro epítipo no receptor de domínio da proteína de superfície "spike" MERS-CoV e uma segunda especificidade de ligação que se liga a um segundo epítipo do receptor de domínio da proteína de superfície "spike" MERS-CoV obrigatório em que os primeiro e segundo epítopos são distintos e não sobrepostos.

[0029] Em um segundo aspecto, a presente invenção refere-se a moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-MERS-CoV-S ou porções dos mesmos. Por exemplo, a presente invenção refere-se a as moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR listados na Tabela 2; em certas

modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCVR listados na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0030] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos LCVR listadas na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico LCVR listados na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0031] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR1 listadas na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico HCDR1 listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0032] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR2 listados na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico HCDR2 listados na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou

pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0033] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR3 listadas na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico HCDR3 listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0034] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR1 listadas na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico LCDR1 listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0035] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR2 listados na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico LCDR2 listados na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0036] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR3 listados na Tabela 2; em certas modalidades a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico

LCDR3 listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta.

[0037] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico que codificam uma HCVR, em que a HCVR compreende um conjunto de três CDRs (isto é, HCDR1-HCDR2-HCDR3), em que a sequência de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3 definida é tal como definida por meio de qualquer um dos anticorpos anti-MERS-CoV-S exemplares listados na Tabela 2.

[0038] A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico que codificam uma LCVR, em que a LCVR compreende um conjunto de três CDRs (isto é, LCDR1-LCDR2-LCDR3), em que a sequência de aminoácidos LCDR1-LCDR2-LCDR3 definida é como definida por meio de qualquer um dos anticorpos anti-MERS-CoV-S exemplares listados na Tabela 2.

[0039] A presente invenção também se refere as moléculas de ácidos nucleicos que codificam ambos uma HCVR e uma LCVR, em que a HCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR listadas na Tabela 2, e em que a LCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCVR listadas na Tabela 2. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCVR listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta, e uma sequência de polinucleotídeo selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácido nucleico LCVR listadas na Tabela 3, ou uma sequência substancialmente semelhante do mesmo, tendo, pelo menos, 90%, pelo menos

95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência com esta. Em certas modalidades de acordo com este aspecto da presente invenção, a molécula de ácido nucleico codifica uma HCVR e LCVR, em que a HCVR e LCVR são ambas derivadas a partir do mesmo anticorpo anti-MERS-CoV-S listados na Tabela 2.

[0040] A presente invenção refere-se as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos da cadeia pesada listadas na Tabela 2. A presente invenção também se refere as moléculas de ácido nucleico codificando qualquer uma das sequências de aminoácidos da cadeia leve listadas na Tabela 2.

[0041] Em um aspecto relacionado, a presente invenção refere-se aos vetores de expressão recombinantes capazes de expressar um polipeptídeo que compreende uma região variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-MERS-CoV-S. Por exemplo, a presente invenção inclui os vetores de expressão recombinantes que compreendem qualquer uma das moléculas de ácidos nucleicos acima mencionadas, ou seja, moléculas de ácido nucleico que codifica qualquer uma das sequências de HCVR, LCVR, e/ou CDR conforme estabelecido na Tabela 3. Também estão incluídos dentro do âmbito da presente invenção as células hospedeiras nas quais foram introduzidos esses vetores, bem como os métodos de produção de anticorpos ou porções dos mesmos através da cultura das células hospedeiras sob condições que permitam a produção dos anticorpos ou fragmentos de anticorpos, e recuperam os anticorpos e fragmentos de anticorpo dessa maneira produzidos.

[0042] Em um terceiro aspecto, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo monoclonal recombinante ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente a proteína de superfície "spike" MERS-CoV e um veículo farmaceu-

ticamente aceitável. Em um aspecto relacionado, a presente invenção apresenta uma composição que é uma combinação de um anticorpo anti-MERS-CoV-S e um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo agente terapêutico é qualquer agente que é vantajosamente combinado com um anticorpo anti-MERS-CoV-S. Exemplos de agentes que podem ser vantajosamente combinados com um anticorpo anti-MERS-CoV-S incluem, sem limitação, outros agentes que se ligam e/ou inibem a atividade de MERS-CoV (incluindo outros anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos, etc.) e/ou agentes que não se ligam diretamente a MERS-CoV-S, mas ainda assim inibem a atividade viral, incluindo a infecciosidade de células hospedeiras. Em certas modalidades, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende: (a) um primeiro anticorpo anti-MERS-CoV-S ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos; (B) um segundo anticorpo anti-MERS-CoV-S ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo, em que o primeiro anticorpo se liga a um primeiro epítipo na proteína de superfície "spike" MERS-CoV e o segundo anticorpo se liga a um segundo epítipo na proteína de superfície "spike" MERS-CoV em que o primeiro e segundo epítipos são distintos e não sobrepostos; e (c) um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. Em certas modalidades, a presente invenção refere-se a uma composição farmacêutica que compreende: (a) um primeiro anticorpo anti-MERS-CoV-S ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos; (B) um segundo anticorpo anti-MERS-CoV-S ou um fragmento de ligação ao antígeno dos mesmos, em que o primeiro anticorpo não inter-compete com o segundo anticorpo para se ligar a proteína de superfície "spike" MERS-CoV; e (c) um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável. As terapias de combinação adicionais e coformulações que envolvem os anticorpos anti-MERS-CoV-S da presente invenção são descritos na presente invenção em um

outro local.

[0043] Em um quarto aspecto, a presente invenção refere-se aos métodos terapêuticos para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado com MERS-CoV, tais como infecção viral em um indivíduo utilizando um anticorpo anti-MERS-CoV-S ou uma porção de ligação do mesmo ao antígeno de um anticorpo de a presente invenção, em que os métodos terapêuticos compreendem a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição farmacêutica que compreende um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção ao indivíduo em necessidade do mesmo. O distúrbio tratado é qualquer doença ou condição que é melhorada, inibida ou evitada através da inibição da atividade MERS-CoV. Em certas modalidades, a presente invenção refere-se aos métodos para prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um sintoma da infecção MERS-CoV, o método que compreende a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo anti-MERS-CoV-S ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da presente invenção a um indivíduo em necessidade do mesmo. Em algumas modalidades, a presente invenção refere-se aos métodos para melhorar ou reduzir a gravidade de, pelo menos, um sintoma ou indicação de infecção MERS em um indivíduo por administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção, em que o pelo menos um sintoma ou indicação é selecionado a partir do grupo que consiste em inflamação no pulmão, dano alveolar, febre, tosse, falta de ar, diarreia, falência de órgãos, pneumonia, choque séptico e morte. Em certas modalidades, a presente invenção fornece métodos para diminuir a carga viral em um indivíduo, os métodos que compreendem a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento do mesmo da presente invenção que se liga a Mers-CoV-S e bloqueia Mers-CoV-S obrigatório para acolher os receptores de células

DPP4. Em algumas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno podem ser administrados profilaticamente ou terapêuticamente a um indivíduo tendo ou estando em risco de ter infecção MERS. Os indivíduos em risco incluem, mas não estão limitados a, uma pessoa imunocomprometida, um adulto idoso (mais de 65 anos de idade), crianças menores de 2 anos de idade, os viajantes para países do Oriente Médio (como Arábia Saudita, Estados Emirados Árabes Unidos, Qatar, etc.), profissionais de saúde, adultos ou crianças em contato próximo com uma pessoa (s) com a infecção MERS confirmados ou suspeitos e pessoas com condições médicas subjacentes, como infecção pulmonar, doença cardíaca ou diabetes. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de antígeno de ligação dos mesmos da presente invenção é administrado em combinação com um segundo agente terapêutico para o indivíduo em necessidade do mesmo. O segundo agente terapêutico pode ser selecionado a partir do grupo que consiste em um fármaco anti-inflamatório (tais como corticosteroides, anti-inflamatórios e não esteroides), um medicamento anti-infeccioso, um anticorpo diferente da proteína de superfície "spike" MERS-CoV, um fármaco antiviral, uma vacina para MERS-CoV, um suplemento dietético, tais como antioxidantes e qualquer outro fármaco ou terapia conhecidos na técnica. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um agente que ajuda a reduzir ou contrariar qualquer efeito (s) colateral (s) possível (s) associado (s) com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da presente invenção, se tais efeito (s) colateral (s) devem ocorrer. O anticorpo ou fragmento pode ser administrado subcutaneamente, intravenosamente, intradermicamente, intraperitonealmente, oralmente, por via intramuscular, ou por via intracraniana. Em uma modalidade, o anticorpo pode ser administrado como uma única infusão intravenosa para a concentração máxima do anticorpo no soro do indivíduo. O an-

ticorpo ou o fragmento do mesmo pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,1 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal do indivíduo. Em certas modalidades, um anticorpo da presente invenção pode ser administrado em uma ou mais doses, que compreende entre 50 mg a 600 mg.

[0044] A presente invenção também inclui o uso de um anticorpo anti-MERS-CoV-S ou um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo da presente invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio que iria beneficiar do bloqueio de ligação e/ou atividade de Mers -cov.

[0045] Outras modalidades serão evidentes a partir de uma revisão da descrição detalhada que se seguiu.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0046] A Figura 1 é uma tabela que lista os sobrenadantes de hibridoma de anticorpo (listados na coluna 1 pelo seu ID de amostra) e as suas propriedades de ligação, bloqueio e ensaios de neutralização, como descrito na presente invenção em um outro local.

[0047] A Figura 2 é uma matriz que mostra os resultados de um ensaio de anticorpo de competição cruzada na qual um primeiro anticorpo anti-MERS-CoV-S (mAb-1) foi aplicado a uma ponta do sensor revestido com RBD MERS , seguido por meio do tratamento com um segundo anticorpo anti-MERS-CoV-S (mAb-2). As respostas de ligação (valores numéricos -0.05 a 0,64) para cada combinação de anticorpos testados são retratadas. As caixas cinza claro com fonte preta representam a resposta de ligação para auto-competição. Os anticorpos que competem em ambas as direções, independente da ordem de ligação do antígeno, são destacados em caixas pretas com letra branca. Sem concorrência, sugerindo as regiões de ligação distintas, é representado como caixas brancas com letras pretas. Os anticorpos que mostram mais de 0.18nm de mudança de ligação não cruzam-

competem um com o outro.

[0048] A Figura 3 é uma matriz que mostra os resultados de um ensaio de anticorpo de competição cruzada na qual um primeiro anticorpo anti-MERS-CoV-S (mAb-1) foi aplicado a uma ponta do sensor revestido com RBD MERS, seguido por meio do tratamento com um segundo anticorpo anti-MERS-CoV-S (mAb-2). As respostas de ligação (valores numéricos -0.01 a 0,55) para cada combinação de anticorpos testados são retratadas. As caixas cinza claro com fonte preta representam a resposta de ligação para auto-competição. Os anticorpos que competem em ambas as direções, independente da ordem de ligação do antígeno, são destacados em caixas pretas com letra branca. Sem concorrência, sugerindo as regiões de ligação distintas, é representado como caixas brancas com letras pretas. Os anticorpos que mostram mais de 0.14nm de mudança de ligação não cruzam-competem um com o outro.

[0049] A Figura 4 mostra PCR quantitativa de Mers-CoV transcrito (mRNA transcrito do genoma a montante do gene do envelope - UPE) em camundongos DPP4 humanizados nos dias 2 e 4 após a infecção.

[0050] A Figura 5 mostra PCR quantitativa de transcrição de Mers-CoV (genoma MERS-CoV - sequência líder) em camundongos humanizados DPP4 nos dias 2 e 4 pós infecção.

[0051] A Figura 6 mostra quantificação de título viral de Mers-CoV de pulmão infectado do camundongo no dia 4 após a infecção. Os níveis do pulmão de camundongo de Mers-CoV foram quantificados e expressos como pfu/mL de pulmão de camundongo homogeneizado.

[0052] A Figura 7 mostra PCR quantitativa de transcrição de Mers-CoV (transcrito de mRNA do genoma a montante do gene do envelope - UPE) a partir de pulmões de camundongos tratados com 200 µg, 20 µg, ou 2 µg de anticorpos H1H15211P ou H1H15277N, ou com um hlgG de controle de isotipo um dia antes da infecção com o MERS-

CoV. Todas as amostras foram comparadas com o controle de isotipo hlgG1 fixado em 100%.

[0053] A Figura 8 mostra de PCR quantitativa de Transcrição de Mers-CoV (genoma MERS-CoV - sequência líder) a partir de pulmões de camundongos tratados com 200 µg, 20 µg, ou 2 µg de anticorpos H1H15211P ou H1H15277N, ou com um controle do isotipo hlgG um dia antes infecção com o MERS-CoV. Todas as amostras foram comparadas com o controle de isotipo de hlgG1 fixado em 100%.

[0054] A Figura 9 mostra a análise de título viral nos pulmões tal como quantificado por meio do ensaio de placas e classificado como ufp/mL a partir de pulmões de camundongos tratados com 200 µg, 20 µg, ou 2 µg de anticorpos H1H15211P ou H1H15277N, ou com um hlgG de controle de isotipo um dia antes da infecção com MERS-CoV. Todas as amostras foram comparadas com o controle de isotipo hlgG1 fixado em 100%.

[0055] A Figura 10 mostra as contagens inflamatórias a partir da análise histológica de pulmões de camundongos tratados com 200 µg, 20 µg, ou 2 µg de anticorpos H1H15211P ou H1H15277N, ou com um controle do isotipo hlgG um dia antes da infecção com MERS-CoV.

[0056] A Figura 11 mostra de PCR quantitativa de Transcrição de Mers-CoV (transcrito de mRNA do genoma a montante do gene do envelope - UPE) a partir de pulmões de camundongos tratados com 200 µg ou 500 µg de H1H15211P ou um controle de isotipo hlgG a infecção pós um dia ou com 200 µg de H1H15211P com um dia antes da infecção com MERS-CoV. Todas as amostras foram comparadas com o controle de isotipo hlgG1 fixado em 100%.

[0057] A Figura 12 mostra PCR quantitativa de Transcrição de Mers-CoV (genoma MERS-CoV - sequência líder) a partir de pulmões de camundongos tratados com 200 µg ou 500 µg de H1H15211P ou um controle de isotipo hlgG a infecção pós um dia ou com 200 µg de

H1H15211P em uma dia antes da infecção com MERS-CoV. Todas as amostras foram comparadas com o controle de isotipo hlgG1 fixado em 100%.

[0058] A Figura 13 mostra a análise do título viral nos pulmões tal como quantificado por meio do ensaio de placas e classificado como ufp/mL a partir de pulmões de camundongos tratados com 200 µg ou 500 µg de H1H15211P ou um controle de isotipo hlgG da infecção pós um dia ou com 200 µg de H1H15211P com um dia antes da infecção com MERS-CoV. Todas as amostras foram comparadas com o controle de isotipo hlgG1 fixado em 100%.

[0059] A Figura 14 mostra as contagens inflamatórias a partir da análise histológica de pulmões de camundongos tratados com 200 µg ou 500 µg de H1H15211P ou com um controle do isotipo hlgG um dia após a infecção com MERS-CoV.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0060] Antes dos presentes métodos terem sido descritos, é para ser entendido que esta presente invenção não é limitada a métodos particulares, e condições experimentais descritas, uma vez que tais métodos e condições podem variar. É também para ser compreendido que a terminologia usada na presente invenção é para o propósito de descrever apenas modalidades particulares, e não se destina a ser limitativa, uma vez que o âmbito da presente invenção será limitado apenas por meio das reivindicações anexas.

[0061] A menos que seja definido de um outro modo, todos os termos técnicos e científicos usados na presente invenção têm o mesmo significado que o normalmente entendido por meio de uma pessoa que é versada na técnica à qual a presente invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos descritos na presente invenção possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, os métodos e materiais preferidos

são agora descritos. Todas as publicações mencionadas na presente invenção são incorporadas na presente invenção por meio de referência na sua totalidade.

Definições

[0062] O termo "MERS-CoV", também chamado de "MERS coronavírus", refere-se a recém-surgida Síndrome Respiratória do Oriente médio - Vírus Corona que foi isolada pela primeira vez na Península Árabe em 2012 (Zaki *et al.*, 2012, NEJM 367 : 1814 a 1820) e identificada como a causa para o surto de doença respiratória aguda grave. Ele foi inicialmente chamado de coronavírus-EMC humano (Centro Médico Erasmus; HCoV-EMC). Pertence à linhagem 2c betacoronavírus e provoca doença respiratória grave, semelhante à Síndrome Respiratória Aguda Grave coronavírus (SARS-CoV) que surgiu na China em 2002. O coronavírus MERS foi encontrado para estar estreitamente relacionado com coronavírus encontrado em morcegos e camelos. Ele liga-se por meio da proteína de superfície "spike" viral para hospedeiro humano dipeptidil peptidase do receptor celular 4 (DPP4). A proteína de superfície "spike" MERS-CoV foi encontrado para ligar DPP4 de outras espécies, especialmente os morcegos e camelos (Raj *et al.*, 2013, Nature 495: 251 a 254).

[0063] O termo "MERS-CoV-s", também chamado de "proteína S" refere-se a proteína de superfície "spike" do coronavírus MERS. A proteína de superfície "spike" MERS-CoV é uma glicoproteína de membrana de aminoácido 1353 do tipo I que monta em trímeros que constituem os picos ou peplômeros na superfície da partícula de MERS coronavírus envelopados. A proteína tem duas funções essenciais, a ligação e a membrana de fusão do receptor hospedeiro, que são atribuídos ao N-terminal (S1, resíduos de aminoácidos 1 - 751) e C-terminal (S2, os resíduos de aminoácidos 752 - 1353) das metades da proteína S. MERS-CoV-S liga-se ao seu receptor cognato, dipeptidil-peptidase

4 (DPP4) por meio do domínio de ligação do receptor de comprimento cerca de 230 de aminoácido (RBD) presente na subunidade S1. Mou *et al.*, (2013) demonstraram em *J. Virology* (Vol 87, páginas 9379-9383) que os MERS-CoV RBD estão localizados dentro dos resíduos 358 - 588 da proteína de superfície "spike". A sequência de aminoácidos da proteína de superfície "spike" de comprimento total MERS-CoV é exemplificada por meio da sequência de aminoácidos da proteína de superfície "spike" de isolado de Mers-CoV EMC/2012 fornecida no número de acesso GenBank como AFS88936.1 (SEQ ID NO: 457). O termo "MERS-CoV-S" também inclui as variantes de proteína da proteína de superfície "spike" MERS-CoV isolada de diferentes MERS-CoV isolados, por exemplo, Jordan-N3/2012, England, Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England 1, Hafr-Al-Batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE e Wadi-Ad-Dawasir. O termo "MERS-CoV-S" inclui Mers-CoV recombinantes da proteína de superfície "spike" ou um fragmento do mesmo. O termo também abrange a proteína de superfície "spike" MERS-CoV ou um fragmento do mesmo acoplado a, por exemplo, histidina, camundongo ou Fc humano, ou uma sequência de sinal, tais como ROR1. Por exemplo, o termo inclui as sequências exemplificadas por meio da sequência ilustrada na SEQ ID NO: 458, que compreende um Fc de camundongo (mIgG2a) ou Fc humano (hIgG1) na extremidade C-terminal, juntamente com os resíduos de aminoácido 367-606 de comprimento completo Da proteína de superfície "spike" Mers-CoV. O termo também inclui as variantes da proteína que compreendem uma etiqueta de histidina na extremidade C-terminal, acopladas

aos resíduos de aminoácidos 367-606 da proteína de superfície "spike" Mers-CoV de comprimento completo.

[0064] O termo "DPP4" refere-se a inibidores da dipeptidil peptidase 4, um receptor para MERS-CoV. DPP4 é uma glicoproteína transmembrana do aminoácido 766 do Tipo II presente em uma forma dimerica na superfície da célula. É uma exopeptidase, que cliva os dipeptídeos de hormônios e quimiocinas após um resíduo de aminoácido de prolina amino, regulando assim a sua bioatividade. Nos seres humanos, DPP4 é expresso principalmente nas células epiteliais em rim, intestino delgado, do fígado e da próstata, das células ciliadas e não ciliadas do trato respiratório superior e inferior, e em células imunes (isto é, CD4 +, CD8 +, células dendríticas e macrófagos). A menos que seja especificado como sendo de uma espécie de não humanos, o termo "DPP4", tal como usado na presente invenção, significa DPP4 humano.

[0065] O termo "infecção de MERS" ou "infecção de MERS-CoV", como usado na presente invenção, também caracterizado como Síndrome Respiratória do Oriente médio refere-se à doença respiratória aguda grave causada por coronavírus MERS e relatada pela primeira vez na Arábia Saudita em 2012. O termo infecção do trato respiratório inclui, muitas vezes, no trato respiratório inferior. Os sintomas incluem febre alta, tosse, falta de pneumonia respiração, sintomas gastrointestinais, como diarreia, falência de órgãos (insuficiência renal e disfunção renal), choque séptico e morte em casos graves.

[0066] O termo "anticorpo", como usado na presente invenção, destina-se a referir às moléculas de imunoglobulina composta por quatro cadeias de polipeptídeos, duas cadeias pesadas (H) e duas (L) cadeias leves interligadas por meio das ligações dissulfeto (isto é, "moléculas de anticorpo completas"), assim como multímeros dos mesmos (por exemplo, IgM) ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mes-

mos. Cada cadeia pesada é compreendida por uma região variável da cadeia pesada ("HCVR" ou "VH") e uma região constante da cadeia pesada (composto de domínios CH1, CH2 e CH3). Cada cadeia leve é constituída por uma região variável da cadeia leve ("LCVR ou" VL ") e uma região constante da cadeia leve (CL). As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, designadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões que são, designadas regiões de estrutura principal mais conservadas (FR). Cada VH e VL é composto por três CDRs e quatro FRs, dispostos a partir do terminal amino para terminal carboxila na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em certas modalidades da presente invenção, FRs do anticorpo (ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo) podem ser idênticas às sequências da linhagem germinal humana, ou podem ser natural ou artificialmente modificada. Uma sequência de consenso de aminoácidos pode ser definida com base em uma análise de lado a lado de duas ou mais CDRs.

[0067] A substituição de um ou mais resíduos de CDR ou omissão de um ou mais CDRs também é possível. Os anticorpos têm sido descritos na literatura científica no qual um ou dois CDR podem ser dispensados para a ligação. Padlan *et al.*, 1995 (FASEB J. 9: 133 a 139) analisaram as regiões de contato entre os anticorpos e os seus antígenos, com base em estruturas de cristal publicadas, e concluiu que apenas cerca de um quinto a um terço dos resíduos de CDR realmente em contato com o antígeno. Padlan também encontraram muitos anticorpos em que um ou dois CDR não tinham aminoácidos em contato com um antígeno (vide também, Vajdos *et al.*, 2002 J Mol Biol 320: 415 a 428).

[0068] Os resíduos de CDR não em contato com o antígeno podem ser identificados com base em estudos anteriores (por exemplo,

resíduos H60-H65 em CDRH2 frequentemente não são necessários), a partir de regiões de CDR de Kabat deitados para fora de CDR de Chothia, por meio da modelação molecular e/ou empiricamente. Se uma CDR ou de resíduo (s) é omitida, é usualmente substituído por um aminoácido que ocupa a posição correspondente na outra sequência de anticorpo humano ou a um consenso de tais sequências. Posições de substituição dentro de CDRs e aminoácidos para substituir também podem ser selecionadas empiricamente. As substituições empíricas podem ser substituições conservativas ou não conservativas.

[0069] Os anticorpos monoclonais anti-MERS-CoV-S totalmente humanos descritos na presente invenção podem compreender uma ou mais substituições de aminoácidos, inserções e/ou deleções nas regiões estruturais e/ou CDR dos domínios variáveis das cadeias pesada e leve, em comparação com as sequências da linhagem germinal correspondente. Tais mutações podem ser facilmente determinadas por meio da comparação das sequências de aminoácidos descritas na presente invenção para as sequências da linhagem germinal disponíveis a partir, por exemplo, bases de dados de sequências de anticorpos pública. A presente invenção inclui os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, que são derivados a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos descritas na presente invenção, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais estrutura e ou regiões/CDR são mutados ao (s) resíduo (s) correspondente (s) da sequência da linhagem germinal a partir do qual o anticorpo foi derivado, ou o (s) resíduo (s) correspondente (s) de outra sequência da linhagem germinal humana, ou a uma substituição de aminoácidos conservadora do resíduo da (s) linha (s) germinal (s) correspondente (s) (tais alterações de sequência são na presente invenção referidos coletivamente como "mutações da linhagem germinal"). Uma pessoa com conhecimentos correntes na técnica, a partir das sequências da região

variável da cadeia leve e pesada descritas na presente invenção, pode facilmente produzir numerosos anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno, que compreendem uma ou mais mutações da linhagem germinal individuais ou suas combinações. Em certas modalidades, todos os resíduos de estrutura e/ou CDR dentro dos domínios VL e/ou VH são mutados de volta para os resíduos encontrados na sequência da linhagem germinal original a partir do qual foi derivado o anticorpo. Em outras modalidades, apenas os resíduos determinados são mutados de volta para a sequência da linhagem germinal original, por exemplo, somente os resíduos mutados foram encontrados dentro dos primeiros 8 aminoácidos de FR1 ou dentro dos últimos 8 aminoácidos da FR4, ou apenas os resíduos mutados encontrado dentro de CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, uma ou mais da estrutura principal e/ou de resíduo (s) de CDR são mutadas ao (s) resíduo (s) correspondente (s) de uma sequência diferente da linhagem germinal (ou seja, uma sequência da linhagem germinal, que é diferente da sequência da linhagem germinal a partir do qual o anticorpo foi originalmente derivado). Além disso, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações da linhagem germinal no interior das regiões de estrutura e/ou CDR, por exemplo, em que determinados resíduos individuais são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência da linhagem germinal particular, enquanto alguns outros resíduos que diferem a partir da sequência da linhagem germinal original são mantidos ou são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência da linhagem germinal diferente. Uma vez obtidos, os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que contêm uma ou mais mutações da linhagem germinal podem ser facilmente testados por meio de uma ou mais propriedades desejada, tal como, melhoria da especificidade de ligação, o aumento de ligação de afinidade, propriedades biológicas antagonistas ou ago-

nistas melhoradas ou aprimoradas (como o caso pode ser), imunogenicidade reduzida, etc. os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno obtidas desta maneira geral são englobadas dentro da presente invenção.

[0070] A presente invenção também inclui os anticorpos monoclonais anti-MERS-CoV-S totalmente humanos que compreendem as variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR, e/ou CDR descritas na presente invenção possuindo uma ou mais substituições conservativas. Por exemplo, a presente invenção inclui os anticorpos anti-MERS-CoV LCVR, sequências de aminoácidos de HCVR e/ou CDR com, por exemplo, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. As substituições do aminoácido conservador relativamente a qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCVR, LCVR, e/ou CDR na descritas presente invenção.

[0071] O termo "anticorpo humano", tal como usado na presente invenção, pretende incluir os anticorpos com regiões variáveis e as constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linhagem germinal humana. Os mAbs humanos da presente invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por meio das sequências de imunoglobulina da linhagem germinal humana (por exemplo, as mutações introduzidas por meio da mutagênese ao acaso, ou específica do local *in vitro* ou por meio da mutação somática *in vivo*), por exemplo nos CDRs e em particular a CDR3. No entanto, o termo "anticorpo humano", tal como usado na presente invenção, não se destina a incluir os mAbs em que as sequências CDR derivadas da linhagem germinal de outra espécie de mamífero (por exemplo, camundongo), foram enxertadas nas sequências FR humanas. O termo inclui os anticorpos produzidos de forma recombinante em um mamífero não humano, ou em células de um mamífero não humano. O termo não pretende incluir anticorpos isolados a partir de ou gerados em um indiví-

duo humano.

[0072] O termo "recombinante", tal como usado na presente invenção, refere-se a anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção criado, expresso, isolado ou obtido por meio das tecnologias e métodos conhecidos na técnica como a tecnologia recombinante do DNA, que incluem, por exemplo, fatiamento de DNA e a expressão transgênica. O termo refere-se aos anticorpos expressos em um mamífero não humano (incluindo mamíferos não humanos transgênicos, por exemplo, camundongos transgênicos), ou uma célula (por exemplo, células CHO) ou sistema de expressão isolado a partir de uma biblioteca de anticorpos combinatória humana recombinante.

[0073] O termo "liga-se especificamente" ou "liga-se especificamente a", ou outros semelhantes, significa que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que forma um complexo com um antígeno que é relativamente estável em condições fisiológicas. A ligação específica pode ser caracterizada por meio de uma constante de dissociação de equilíbrio de pelo menos cerca de 1×10^{-8} M ou inferior (por exemplo, um KD menor indica uma ligação mais apertada). Os métodos para determinar se duas moléculas se ligam especificamente são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, a ressonância de superfície plasmônica, e outros semelhantes. Como na presente invenção descrito, os anticorpos foram identificados por meio da ressonância de superfície plasmônica, por exemplo, do BIACORE™, que se ligam especificamente a MERS-CoV-S. Além disso, os anticorpos específicos de múltiplos que se ligam a um domínio em Mers-CoV-S e um ou mais antígenos adicionais ou biespecíficos que se ligam a duas regiões diferentes de Mers-CoV-S são, todavia, considerados anticorpos que "especificamente se ligam", tal como usado na presente invenção.

[0074] O termo anticorpo de "afinidade elevada" refere-se aos

mAbs que têm uma afinidade de ligação para Mers-CoV-S, expressa em KD, de, pelo menos, 10^{-8} M; de preferência 10^{-9} M; mais de preferência 10^{-10} M, ainda mais de preferência, 10^{-11} M, ainda mais de preferência 10^{-12} M, tal como medido por ressonância de superfície plasmônica, por exemplo, BIACORE™ ou solução de afinidade de ELISA.

[0075] Com o termo "retardar a taxa", "Koff" ou "Kd" entende-se um anticorpo que se dissocia do MERS-CoV, com uma constante de velocidade de 1×10^{-3} s⁻¹ ou inferior, de preferência 1×10^{-4} s⁻¹ ou inferior, como determinado por meio da ressonância de superfície plasmônica, por exemplo, de BIACORE™.

[0076] Os termos "porção de ligação ao antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo e semelhantes, tal como usado na presente invenção, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtível, sintética, ou geneticamente modificado. O termo "fragmento de ligação ao antígeno" que se liga especificamente a um antígeno de modo a formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", como usado na presente invenção, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar a proteína de superfície "spike" MERS-CoV.

[0077] Em modalidades específicas, o anticorpo ou fragmentos de anticorpos da presente invenção podem ser conjugados com uma porção de um tal ligante ou uma porção terapêutica ("imunocjugado"), tal como um fármaco antiviral, um segundo anticorpo anti-MERS-CoV-S, ou qualquer outra porção terapêutica útil para o tratamento de uma infecção causada por MERS-CoV.

[0078] Um "anticorpo isolado", tal como usado na presente invenção, pretende referir-se a um anticorpo que é substancialmente isento

de outros anticorpos (ABS) possuindo diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que se liga especificamente a Mers-CoV-S, ou um fragmento do mesmo, é substancialmente livre de Abs que se ligam especificamente a outros antígenos do que MERS-CoV-S.

[0079] Um "anticorpo de bloqueio" ou um "anticorpo neutralizante", tal como usado na presente invenção (ou um "anticorpo que neutraliza a atividade de MERS-CoV-S" ou "anticorpo antagonista"), pretende referir-se a um anticorpo cuja ligação a MERS-cov-S resulta em inibição de, pelo menos, uma atividade biológica de Mers-CoV. Por exemplo, um anticorpo da presente invenção pode impedir ou bloquear a ligação de Mers-CoV a DPP4.

[0080] O termo "ressonância de superfície plasmônica", tal como usado na presente invenção, refere-se a um fenômeno óptico, que permite a análise de interações biomoleculares em tempo real através da detecção de alterações nas concentrações de proteína em uma matriz de biossensor, por exemplo, utilizando o sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, NJ).

[0081] O termo " K_D ", tal como usado na presente invenção, destina-se a referir a constante de equilíbrio de dissociação de uma interação anticorpo-antígeno particular.

[0082] O termo "epítopo" refere-se a um determinante antigênico que interage com um local de ligação ao antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecido como um paratopo. Um único antígeno pode ter mais do que um epítopo. Dessa maneira, os anticorpos podem ligar-se diferentes para diferentes áreas do um antígeno e podem ter diferentes efeitos biológicos. O termo "epítopo" refere-se também a um local em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Também se refere a uma região de um antígeno que é ligada por um anticorpo. Os epítopos podem ser definidos como

estrutural ou funcional. Os epítomos funcionais são geralmente um subconjunto dos epítomos estruturais e têm aqueles resíduos que contribuem diretamente para a afinidade da interação. Os epítomos também podem ser conformacionais, ou seja, compostos por meio dos aminoácidos não lineares. Em certas modalidades, os epítomos podem incluir determinantes que são quimicamente grupos tensoativos de moléculas, tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforila, ou sulfonila, e, em certas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas, e/ou características de carga específicas.

[0083] O termo "competição cruzada", tal como usado na presente invenção, significa um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga a um antígeno e inibe ou bloqueia a ligação de outro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno. O termo também inclui competição entre dois anticorpos em ambas as orientações, isto é, um primeiro anticorpo que se liga e bloqueia a ligação do segundo anticorpo e vice-versa. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo pode ligar-se ao mesmo epítopo. Em alternativa, os primeiro e segundo anticorpos podem ligar-se a diferentes, mas epítomos sobrepostos de modo que a ligação inibe ou bloqueia a ligação do segundo anticorpo, por exemplo, através de impedimento estérico. A competição cruzada entre os anticorpos pode ser medida por meio dos métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por meio de um ensaio de interferometria de biocamada livre de rótulo em tempo real. A competição cruzada entre dois anticorpos pode ser expressa como a ligação do segundo anticorpo que é menor que o sinal de fundo devido à ligação de auto-auto (em que o primeiro e segundo anticorpos é o mesmo anticorpo). A competição cruzada entre 2 anticorpos pode ser expressa, por exemplo, como a% de ligação do segundo anticorpo que é menor do que a linha de base de antecedente de auto-auto de liga-

ção (em que os primeiro e segundo anticorpos é o mesmo anticorpo).

[0084] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntica", quando se refere a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando otimamente alinhado com inserções de nucleotídeos apropriadas ou deleções com outro ácido nucleico (ou a sua cadeia complementar), existe de identidade de sequência de nucleotídeos em pelo menos cerca de 90%, e mais de preferência pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases nucleotídicas, conforme medido por meio de qualquer algoritmo conhecido de identidade de sequência, tais como FASTA, BLAST ou GAP, tal como discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucleico possuindo uma identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em certos casos, codificar um polipeptídeo possuindo a mesma ou substancialmente similar sequência de aminoácidos que o polipeptídeo codificado por meio da molécula de ácido nucleico de referência.

[0085] Tal como aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeo, quando alinhadas otimamente, tal como pelos programas GAP ou BESTFIT usando por pesos de hiato por defeito, partilham pelo menos 90% de identidade de sequência, ainda mais de preferência, pelo menos, 95%, 98% ou 99% da identidade de sequência. De preferência, as posições dos resíduos, que não são idênticas, diferem por meio das substituições de aminoácidos conservadoras. Uma "substituição de aminoácidos conservativa" é aquela em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácidos conservadora não irá alterar substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos diferentes umas das outras por meio

das substituições conservativas, a porcentagem ou o grau de semelhança pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Os meios para fazer este ajuste são bem conhecidos de uma pessoa que é versada na técnica. Vide, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307 a 331, que é incorporado na presente invenção por meio de referência. Exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais alifáticas-hidroxila: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5) cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato, e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. grupos de substituição conservativa de aminoácidos preferidos são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. De uma maneira alternativa, uma substituição conservadora é qualquer alteração tendo um valor positivo na matriz de probabilidade logarítmica PAM250 descrito em Gonnet *et al.*, 1992 (*Science* 256: 1443 a 45), incorporado na presente invenção por meio de referência. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer mudança que tem um valor não negativo na matriz PAM250 log-verossimilhança.

[0086] A similaridade de sequência de polipeptídeos é tipicamente medida utilizando software de análise de sequência. O software de análise de proteínas corresponde as sequências semelhantes utilizando medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo as substituições de aminoácidos conservativas. Por exemplo, o software de GCG contém programas tais como GAP e BESTFIT que pode ser usado com os parâmetros por

defeito para determinar a homologia ou identidade de sequência de sequências entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos a partir de diferentes espécies de organismos ou entre uma proteína do tipo selvagem e uma muteína da mesma. Vide, por exemplo, GCG Versão 6.1. As sequências de polipeptídeo também podem ser comparadas usando FASTA com os parâmetros por defeito ou recomendados; Um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (por exemplo, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e a porcentagem da identidade de sequência das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de consulta e de pesquisa (Pearson (2000) supra). Um outro algoritmo preferido quando se compara a uma sequência da presente invenção para uma base de dados contendo um grande número de sequências de diferentes organismos é o programa de computador BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, utilizando os parâmetros por defeito. Vide, por exemplo, Altschul *et al.*, (1990) J. Mol. Biol. 215: 403 a 410 e (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389 a 3402, cada um dos quais é incorporado na presente invenção por meio de referência.

[0087] A frase "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade que produz o efeito desejado para o qual ele é administrado. A quantidade exata dependerá da finalidade do tratamento, e será determinável por meio de uma pessoa que é versada na técnica usando técnicas conhecidas (vide, por exemplo, Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*).

[0088] Tal como usado na presente invenção, o termo "indivíduo" refere-se a um animal, de preferência um mamífero, mais de preferência um ser humano, com necessidade de melhoria, a prevenção e/ou tratamento de uma doença ou distúrbio, tais como infecção viral. O termo inclui seres humanos que têm ou estão em risco de ter infecção MERS.

[0089] Tal como usado na presente invenção, os termos "tratar", "tratando" ou "tratamento" refere-se à redução ou melhoria da severidade de pelo menos um sintoma ou indicação de infecção MERS devido à administração de um agente terapêutico, tal como um anticorpo da presente invenção a um indivíduo em necessidade do mesmo. Os termos incluem a inibição da progressão da doença ou do agravamento da infecção. Os termos também incluem prognóstico positivo da doença, isto é, o indivíduo pode ser livre de infecção ou pode ter reduzido ou nenhum título viral por meio da administração de um agente terapêutico tal como um anticorpo da presente invenção. O agente terapêutico pode ser administrado a uma dose terapêutica para o indivíduo.

[0090] Os termos "prevenir" ou "prevenção" referem-se a inibição de manifestação da infecção MERS ou quaisquer sintomas ou sinais de infecção MERS quando da administração de um anticorpo da presente invenção. O termo inclui a prevenção da disseminação da infecção em um indivíduo exposto ao vírus ou em risco de ter infecção MERS.

[0091] Tal como usado na presente invenção, o termo "fármaco antiviral" refere-se a qualquer fármaco anti-infeccioso ou terapia utilizada para tratar, prevenir, ou melhorar uma infecção viral em um indivíduo. O termo "fármaco antiviral" inclui, mas não está limitado a ribavirina, oseltamivir, zanamivir, interferona alfa2b, analgésicos e corticosteroides. No contexto da presente invenção, as infecções virais incluem infecções causadas por coronavírus humanos, incluindo mas não se limitando a, MERS-CoV, HCoV_229E, HCoV_NL63, HCoV-OC43, HCoV_HKU1, e SARS-CoV.

Descrição geral

[0092] A imunoterapia passiva para a profilaxia ou tratamento de doenças infecciosas tem sido utilizado há mais de um século, geral-

mente sob a forma de soros humanos convalescentes que contém títulos elevados de anticorpos neutralizantes (Good *et al.*, 1991; Cancer 68: 1415 a 1421). Hoje em dia, os anticorpos monoclonais purificados múltiplos estão atualmente em desenvolvimento pré-clínico e clínico para a utilização como antimicrobianos (Marasco *et al.*, 2007; Nature Biotechnology 25: 1421 a 1434).

[0093] Os presentes inventores têm descrito na presente invenção os anticorpos totalmente humanos e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos que se ligam especificamente a MERS-CoV-S e modulam a interação de Mers-CoV-S com DPP4. Os anticorpos anti-MERS-CoV-S podem ligar-se a MERS-CoV-S com uma afinidade elevada. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são os anticorpos de bloqueio, em que os anticorpos podem ligar-se MERS-CoV-S e bloqueiam a interação de Mers-CoV-S com DPP4. Em algumas modalidades, os anticorpos de bloqueio da presente invenção podem bloquear a ligação de Mers-CoV-S a DPP4 e/ou inibir ou neutralizar a infecciosidade viral de células hospedeiras. Em algumas modalidades, os anticorpos bloqueadores podem ser úteis para o tratamento de um indivíduo que sofre de infecção MERS. Em certas modalidades, os anticorpos que não se cruzam-competem pela ligação à proteína de pico são utilizados em combinação como um coquetel de reduzir a capacidade do vírus para escapar através de mutação em resposta à pressão seletiva a partir de qualquer componente selecionado. Os anticorpos, quando administrados a um indivíduo em necessidade dos mesmos, podem reduzir a infecção por um vírus, tal como MERS-CoV no indivíduo. Eles podem ser utilizados para diminuir a carga viral em um indivíduo. Eles podem ser utilizados isoladamente ou como terapia adjuvante com outras porções terapêuticas ou modalidades conhecidas na técnica para o tratamento de infecção viral. É também mostrado na presente invenção que estes anticorpos se ligam

a epítomos na proteína S que foram conservados durante a evolução natural do vírus, durante os últimos dois anos. Além disso, um novo modelo de camundongo transgênico foi utilizado para demonstrar que os anticorpos identificados podem profilaticamente proteger os camundongos contra a infecção, bem como melhorar uma infecção previamente estabelecido em um paradigma de tratamento de pós-inoculação. No Exemplo 7, mostra-se que a administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S a 1 dia antes da infecção é capaz de reduzir a replicação MERS-CoV para perto do nível de detecção em ensaios de vírus vivos e por 3 logs nos ensaios virais de RNA. Esta proteção dependente da dose de anticorpo demonstrada, como doses inferiores do anticorpo administrada 24 horas pré-infecção era capaz de bloquear MERS-CoV em menor grau. Além disso, a análise histológica de tecido pulmonar demonstrou que camundongos pré-tratados com o anticorpo exibido reduziu MERS-CoV induzido pela borda peribronquiolar, espessamento da parede alveolar, e focos inflamatórios em geral.

[0094] A sequência de aminoácidos de comprimento completo da proteína de superfície "spike" de comprimento total MERS-CoV é mostrada na SEQ ID NO: 457. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são obtidos a partir de camundongos imunizados com um imunógeno primário, como um completo comprimento A proteína de superfície "spike" MERS-CoV (SEQ ID NO: 457) ou com uma forma recombinante de Mers-CoV-S ou fragmentos MERS-CoV-S modificados (por exemplo, SEQ ID NO: 458), seguido por meio da imunização com um imunógeno secundário, ou com um fragmento imunologicamente ativo de Mers-CoV-S.

[0095] O imunógeno pode ser um fragmento biologicamente ativo e/ou imunogênico de Mers-CoV-S ou de DNA que codifica o fragmento ativo. O fragmento pode ser derivado a partir do domínio N-terminal ou

C-terminal de MERS-CoV-S. Em certas modalidades da presente invenção, o imunógeno é um fragmento de Mers-CoV-S que varia a partir de resíduos de aminoácidos 367 - 606 da SEQ ID NO: 457.

[0096] Os peptídeos podem ser modificados para incluir a adição ou substituição de determinados resíduos de marcação ou para efeitos de conjugação com moléculas portadoras, tais como, KLH. Por exemplo, um resíduo de cisteína pode ser adicionado em qualquer terminal N ou terminal C de um peptídeo, ou uma sequência de ligação pode ser adicionada para se preparar o peptídeo para conjugação com, por exemplo, KLH para a imunização.

[0097] Certos anticorpos anti-MERS-CoV-S da presente invenção são capazes de se ligar e neutralizar a atividade de Mers-CoV-S, como determinado por ensaios *in vitro* ou *in vivo*. A capacidade dos anticorpos da presente invenção para se ligar e neutralizar a atividade de Mers-CoV-S pode ser medida utilizando qualquer método convencional conhecido de uma pessoa que é versada na técnica, incluindo ensaios de ligação, ou ensaios de atividade, tal como descrito na presente invenção.

[0098] Os ensaios não limitativos, exemplares *in vitro* para medir a ligação e atividade de bloqueio são ilustrados nos Exemplos 4 - 5, na presente invenção. No Exemplo 4, a afinidade de dissociação e as constantes de ligação de anticorpos anti-MERS-CoV-S para Mers-CoV-S foi determinada por ensaio de ressonância plasmônica de superfície. No Exemplo 5, ensaios de neutralização foram usados para determinar a infecciosidade de partículas do tipo vírus contendo a proteína de superfície "spike" Mers-CoV.

[0099] Os anticorpos específicos para MERS-CoV-S podem conter nenhuma etiqueta ou porção adicional, ou podem conter uma etiqueta N-terminal ou C-terminal ou com o radical. Em uma modalidade, a etiqueta ou a porção é a biotina. Em um ensaio de ligação, a localização

de uma etiqueta (caso exista) pode determinar a orientação do peptídeo em relação à superfície sobre a qual o peptídeo está ligado. Por exemplo, se uma superfície está revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina N-terminal será orientada de modo que a porção C-terminal do peptídeo será distal para a superfície. Em uma modalidade, a etiqueta pode ser um radionuclídeo, um corante fluorescente ou uma etiqueta de ressonância magnética detectável. Em certas modalidades, tais anticorpos marcados podem ser utilizados em ensaios de diagnóstico, incluindo ensaios de imagiologia.

Fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos

[00100] A menos que seja especificamente indicado de uma outra forma, o termo "anticorpo", como usado na presente invenção, deve ser entendido para abranger as moléculas de anticorpo que compreende duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina (isto é, "moléculas de anticorpo total"), bem como os fragmentos de ligação ao antígeno. Os termos de um anticorpo "fragmento de ligação ao antígeno", de um anticorpo, e semelhantes, tal como usado na presente invenção, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtível, sintética, por engenharia genética ou que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", como usado na presente invenção, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente a proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Um fragmento de anticorpo pode incluir um fragmento Fab, um F (ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento dAb, um fragmento contendo uma CDR, ou uma CDR isolada. Em certas modalidades, o termo "fragmento de ligação ao antígeno" refere-se a um fragmento de polipeptídeo de uma molécula de ligação ao antígeno multiespecífica. Os fragmentos de um anticorpo de ligação do

antígeno podem ser derivados, por exemplo, a partir de moléculas de anticorpos completos, utilizando quaisquer técnicas convencionais adequadas, tais como a digestão proteolítica ou por meio das técnicas de engenharia genética recombinante envolvendo a manipulação e expressão de variável de anticorpo que codifica DNA e (opcionalmente) os domínios constantes. Tal DNA é conhecido e/ou está prontamente disponível a partir de, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo), ou pode ser sintetizado. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou por meio do uso de técnicas de biologia molecular, por exemplo, para providenciar uma ou mais variáveis e/ou constantes dos domínios em uma configuração apropriada, ou para introduzir os códons, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou eliminar os aminoácidos, etc.

[00101] Os exemplos não limitativos de fragmentos de ligação ao antígeno incluem: (i) Os fragmentos Fab; (ii) fragmentos F (ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) de moléculas de Fv da cadeia simples (scFv); (vi) fragmentos dAb; e (vii) unidades de reconhecimento mínimas que consistem nos resíduos de aminoácidos que mimetizam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região de complementaridade isolada determinante (CDR), tal como um peptídeo CDR3), ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restrito. Outras moléculas modificadas, tais como anticorpos específicos do domínio, anticorpos de domínio simples, anticorpos excluído do domínio, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos monovalente (por exemplo, nanocorpos, nanocorpos bivalentes, etc.), imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs), e os domínios variáveis Ig α de tubarão, estão também englobados dentro do termo "fragmento de ligação ao antígeno", tal como usado na presente invenção.

[00102] Um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo será tipicamente compreendido em pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácidos e compreenderá geralmente pelo menos uma CDR, que é adjacente a ou em uma estrutura com uma ou mais sequências de estrutura. Em fragmentos de ligação ao antígeno possuindo um domínio VH associado com um domínio VL, os domínios VH e VL podem ser situados em relação ao outro em qualquer arranjo adequado. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e contém dímeros VH - VH, VH - VL ou VL - VL. De uma maneira alternativa, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter um domínio VH ou VL monomérico.

[00103] Em certas modalidades, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável ligado covalentemente a pelo menos um domínio constante. Não limitativa, as configurações exemplificativas de variáveis e domínios constantes que podem ser encontradas no interior de um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de um anticorpo da presente invenção incluem: (i) VH -CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH -CH1-CH2; (v) VH -CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH -CL; (viii) VL -CH1; (ix) -CH2-VL; (x) VL-CH3; (xi) VL -CH1-CH2; (xii) VL -CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; e (xiv) VL -CL. Em qualquer configuração dos domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer uma das configurações exemplificativas listadas acima, os domínios variáveis e constantes podem ser quer diretamente ligados um ao outro ou podem ser ligados através de uma região dobradiça ou ligante total ou parcial. A região dobradiça pode ser constituída por, pelo menos, dois (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos, que resultam em uma ligação flexível ou semi-flexível entre a variável adjacente e/ou os domínios constantes de uma única molécula de polipeptídeo. Além

disso, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homodímero ou heterodímero (ou outro multímero) de qualquer uma das configurações de domínio variável e constante listados acima, em associação não covalente um com o outro e/ou com um ou mais de VH ou VL monomérico (por exemplo, por meio da (s) ligação (s) de dissulfeto).

[00104] Tal como acontece com as moléculas de anticorpos completos, os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (biespecífico, por exemplo,). Um fragmento multiespecífico de ligação ao antígeno de um anticorpo compreenderá, tipicamente, pelo menos, dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de se ligar especificamente a um antígeno ou separado para um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpos multiespecíficos, incluindo os formatos de anticorpo biespecíficos exemplares descritos na presente invenção, podem ser adaptados para utilização no contexto de um fragmento de ligação ao antígeno do mesmo de um anticorpo da presente invenção utilizando as técnicas de rotina disponíveis na técnica.

Preparação de anticorpos humanos

[00105] Os métodos para a criação de anticorpos humanos em camundongos transgênicos são conhecidos na técnica. Tais métodos conhecidos podem ser utilizados no contexto da presente invenção para produzir anticorpos humanos que se ligam especificamente a proteína de superfície "spike" MERS-CoV.

[00106] Um imunógeno que compreende qualquer um dos seguintes pode ser usado para gerar anticorpos contra a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são obtidos a partir de camundongos imunizados com um comprimento total, pico da proteína de Mers-CoV nativo (Vide, por exemplo, número de acesso GenBank AFS88936.1) (SEQ ID NO:

457), ou com DNA que codifica a proteína ou um fragmento do mesmo. De uma maneira alternativa, a proteína de superfície "spike" de ou um fragmento do mesmo podem ser produzidos utilizando as técnicas bioquímicas convencionais e modificado e utilizado como imunógeno. Em uma modalidade, o imunógeno é o domínio de ligação ao receptor (S1) da proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Em certas modalidades da presente invenção, o imunógeno é um fragmento da proteína de superfície "spike" MERS-CoV que varia de cerca de resíduos de aminoácidos 367-606 da SEQ ID NO: 457.

[00107] Em algumas modalidades, o imunógeno pode ser um peptídeo de domínio de ligação ao receptor da proteína de superfície "spike" MERS-CoV recombinante expresso em *E. coli* ou em quaisquer outras células eucarióticas ou de mamífero tais como células de ovário de hamster chinês (CHO).

[00108] Utilizando a tecnologia VELOCIMMUNE® (vide, por exemplo, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) ou qualquer outro método conhecido para a geração de anticorpos monoclonais, os anticorpos quiméricos de afinidade elevada a Mers-CoV-S são inicialmente isolados que tem uma região variável humana e uma região constante de camundongo. A tecnologia VELOCIMMUNE® envolve a geração de um camundongo transgênico com um genoma que compreende as regiões da cadeia pesada e leve de variáveis humanos ligados operacionalmente ao camundongo endógeno no local da região constante de modo a que o camundongo produz um anticorpo que compreende uma região variável humana e uma região constante de camundongo em resposta a estimulação antigênica. O DNA que codifica as regiões variáveis das cadeias pesada e leve do anticorpo é isolado e ligado operativamente ao DNA que codifica para as regiões constantes da cadeia pesada e leve humanos. O DNA é então expresso em uma célula capaz de expressar o anticorpo completamente humano.

[00109] Em geral, um camundongo VELOCIMMUNE® é desafiado com o antígeno de interesse, e células linfáticas (tais como células-B) são recuperadas a partir dos camundongos que exprimem anticorpos. As células linfáticas podem ser fundidas com uma linhagem de célula de mieloma para preparar as linhagens de célula de hibridoma imortais e estas linhagens de célula de hibridoma são rastreadas e selecionadas para identificar as linhagens de célula de hibridoma que produzem os anticorpos específicos para o antígeno de interesse. DNA que codifica as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve podem ser isolados e ligados às regiões constantes isotípicas desejáveis da cadeia pesada e da cadeia leve. Uma tal proteína de anticorpo pode ser produzida em uma célula, tal como uma célula CHO. De uma maneira alternativa, o DNA que codifica os anticorpos quiméricos específicos para o antígeno ou os domínios variáveis das cadeias leve e pesada podem ser isolados diretamente a partir de linfócitos específicos para o antígeno.

[00110] Inicialmente, os anticorpos quiméricos de elevada afinidade são isolados os quais possuem uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Tal como na seção experimental abaixo, os anticorpos são caracterizados e selecionados para as características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, epítopo, etc. As regiões constantes de camundongo são substituídas por meio de uma região constante humana para gerar o desejado anticorpo totalmente humano da presente invenção, por exemplo IgG1 ou IgG4 modificado ou de tipo selvagem. Embora a região constante selecionada pode variar de acordo com a utilização específica, ligação ao antígeno de alta afinidade e características da especificidade alvo que residem na região variável.

Bioequivalentes

[00111] Os anticorpos anti-MERS-CoV-S e os fragmentos de anti-

corpos da presente invenção abrangem as proteínas com sequências de aminoácidos que variam daquelas dos anticorpos descritos, mas que retêm a capacidade de ligar o pico de proteína de MERS-CoV. Tais anticorpos variantes e fragmentos de anticorpos compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos quando comparados com a sequência controladora, mas exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente à dos anticorpos descritos. Do mesmo modo, as sequências de DNA que codificam o anticorpo da presente invenção abrangem as sequências que compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de nucleotídeos quando comparadas com a sequência descrita, mas que codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo ou fragmento de anticorpo da presente invenção.

[00112] Duas proteínas de ligação ao antígeno, ou anticorpos, são considerados bioequivalentes se, por exemplo, eles são os equivalentes farmacêuticos ou alternativos farmacêuticos cuja taxa e extensão de absorção não mostram uma diferença significativa quando administrados na mesma dose molar sob condições experimentais similares, quer em dose única ou em doses múltiplas. Alguns anticorpos serão considerados equivalentes ou alternativos farmacêuticos se eles são equivalentes no âmbito da sua absorção, mas não em sua taxa de absorção e ainda podem ser considerados bioequivalentes porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e estão refletidas na rotulagem, são não é essencial para a realização de concentrações eficazes de fármacos sobre o corpo, por exemplo, o uso crônico, e são considerados clinicamente insignificante para o produto determinado medicamento estudado.

[00113] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se existem diferenças clinicamente significati-

vas na sua segurança, pureza ou potência.

[00114] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se um paciente pode ser comutado uma ou mais vezes entre o produto referência e o produto biológico, sem o esperado aumento do risco de efeitos adversos, incluindo uma alteração clinicamente significativa na imunogenicidade, ou eficácia reduzida, em comparação com a terapia continuada sem tais comutação.

[00115] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se as duas agem por meio de um mecanismo comum de ação ou mecanismos para a condição ou condições de utilização, na medida em que esses mecanismos são conhecidos.

[00116] A bioequivalência pode ser demonstrada por métodos *in vivo* e/ou *in vitro*. As medidas de bioequivalência incluem, por exemplo, (a) um teste *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, em que a concentração do anticorpo ou dos seus metabolitos é medida em sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico, como uma função do tempo; (b) um teste *in vitro* que tem sido correlacionado com e é razoavelmente preditivo de dados *in vivo* de biodisponibilidade de seres humanos; (c) um ensaio *in vivo* em seres humanos ou outros mamíferos, em que o efeito farmacológico agudo adequado do anticorpo (ou seu alvo) é medido como uma função do tempo; e (d) em um ensaio clínico bem controlado que estabelece a segurança, eficácia, ou a biodisponibilidade ou a bioequivalência de um anticorpo.

[00117] As variantes bioequivalentes dos anticorpos da presente invenção podem ser construídas, por exemplo, fazendo várias substituições de resíduos ou sequências ou suprimindo os resíduos ou sequências não necessárias para a atividade biológica terminal ou interna. Por exemplo, os resíduos de cisteína não essenciais para a atividade biológica podem ser eliminados ou substituídos por meio de outros aminoácidos para evitar a formação de pontes dissulfeto intramo-

leculares desnecessárias ou incorretas após renaturação. Em um outro contexto, os anticorpos podem incluir as variantes bioequivalentes de anticorpo que compreendem as alterações de aminoácidos, que modificam as características de glicosilação dos anticorpos, por exemplo, as mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

Anticorpos anti-MERS-CoV-S incluindo variantes Fc

[00118] De acordo com certas modalidades da presente invenção, os anticorpos anti-MERS-CoV-S são fornecidos os quais compreendem um domínio Fc que compreendem uma ou mais mutações que aumentam ou diminuem a ligação do anticorpo ao receptor de FcRn, por exemplo, a pH ácido, em comparação com pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S que compreendem uma mutação no CH2 ou uma região CH3 do domínio de Fe, em que a (s) mutação (s) aumenta a afinidade do domínio Fc a FcRn em um meio ácido (por exemplo, em um endossoma onde o pH varia de cerca de 5,5 a cerca de 6,0). Tais mutações podem resultar em um aumento da semivida no soro do anticorpo quando administrado a um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, G/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T), e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/E/D/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, A, W, H, F ou Y [N434A, N434W, N434H, N434F ou N434Y]); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F), e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação 428L, 259I (por exemplo, V259I), e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação 252, 254, e 256

(por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P). Em ainda outra modalidade, a modificação compreende uma modificação 265A (por exemplo, D265A) e/ou 297A (por exemplo, N297A).

[00119] Por exemplo, a presente invenção inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S que compreendem um domínio Fc que compreende um ou mais pares ou grupos de mutações selecionados a partir do grupo que consiste em : 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); 257I e 311I (por exemplo, P257I e Q311I); 257I e 434H (por exemplo, P257I e N434H); 376V e 434H (por exemplo, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (por exemplo, T307A, E380A N434A e); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Todas as possíveis combinações das mutações anteriores no domínio Fc e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpos descritos na presente invenção são contemplados dentro do âmbito da presente invenção.

[00120] A presente invenção também inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S quiméricos que compreendem uma região constante da cadeia pesada (CH), em que a região CH quimérica compreende os segmentos derivados das regiões CH de mais do que um isotipo de imunoglobulinas. Por exemplo, os anticorpos da presente invenção podem compreender uma parte região CH quimérica que compreende parte ou a totalidade de um domínio CH2 derivado de uma IgG1 humana, IgG2 humano ou molécula de IgG4 humana, combinada com a parte ou a totalidade de um domínio CH3 derivado de um IgG1 humano, IgG2 humano ou molécula de IgG4 humana. De acordo com certas modalidades, os anticorpos da presente invenção compreendem uma região CH quimérica possuindo uma região dobradiça quimérica. Por

exemplo, uma dobradiça quimérica pode compreender uma sequência de aminoácidos da "parte superior da dobradiça" (resíduos de aminoácidos das posições 216-227 de acordo com a numeração da UE) derivada a partir de uma região dobradiça de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinada com uma sequência "de dobradiça inferior" (resíduos de aminoácidos a partir de posições 228 a 236 de acordo com a numeração da UE) derivada a partir de uma região dobradiça de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. De acordo com certas modalidades, a região dobradiça quimérica compreende os resíduos de aminoácidos derivados de dobradiça superior de IgG1 humana ou IgG4 humana e os resíduos de aminoácidos derivados de dobradiça inferior de IgG2 humana. Um anticorpo que compreende uma região CH quimérica tal como descrito na presente invenção pode, em certas modalidades, exibir as funções efetoras de Fc modificadas, sem afetar adversamente as propriedades terapêuticas ou de farmacocinética do anticorpo. (Vide, por exemplo, Pedido de Patente US Provisório N ° 61/759.578, depositado em 01 de fevereiro de 2013, cuja descrição é incorporada na presente invenção por meio de referência na sua totalidade).

Características biológicas dos anticorpos

[00121] Em geral, os anticorpos da presente invenção funcionam por meio da ligação a proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção ligam-se com elevada afinidade a um ou mais aminoácidos no domínio de ligação do receptor (RBD) da proteína de superfície "spike" de Mers-CoV. Por exemplo, a presente invenção inclui os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno de anticorpos que se ligam a proteína de superfície "spike" MERS-CoV RBD dimérico (por exemplo, a 25 ° C ou a 37 ° C) com um KD de menos de 20 nM como medida por meio da ressonância de superfície plasmônica, por exemplo, usando o formato de en-

saio, tal como definido no Exemplo 4 na presente invenção. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno se ligam ao MERS-CoV-S dimérico, com um KD de menos do que cerca de 20 nM, menos do que cerca de 10 nM, menos do que cerca de 5 nM, menos do que cerca de 2 nM, menos do que cerca de 1 nM, menos do que cerca de 500pM, menos do que cerca de 250pM, ou menos do que cerca de 100 pM, medida por meio da ressonância de superfície plasmônica, por exemplo, usando o formato de ensaio, tal como definido no Exemplo 4 na presente invenção, ou em um ensaio substancialmente semelhante.

[00122] A presente invenção também inclui os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que a proteína de superfície "spike" de ligação MERS-CoV com uma meia-vida de dissociação ($t_{1/2}$) maior do que cerca de 2,1 minutos, determinado por meio da ressonância de superfície plasmônica, a 25°C, por exemplo, utilizando um formato de ensaio, tal como definido no Exemplo 4 na presente invenção, ou em um ensaio substancialmente semelhante. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da proteína de superfície "spike" presente invenção ligam-se a MERS-CoV com um $t_{1/2}$ maior do que cerca de 5 minutos, superiores a cerca de 10 minutos, maior do que cerca de cerca de 30 minutos, maior do que cerca de 50 minutos, uma maior do que cerca de 100 minutos, maior do que cerca de cerca de 150 minutos, maior do que cerca de cerca de 200 minutos, ou maior do que cerca de cerca de 250 minutos, tal como medido por ressonância de superfície plasmônica, a 25°C, por exemplo, utilizando um formato de ensaio, tal como definido no Exemplo 4 na presente invenção (por exemplo, formato de captura de mAb ou captura de antígeno), ou em um ensaio substancialmente semelhante.

[00123] A presente invenção também inclui os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno que a proteína de superfície "spike" de

ligação MERS-CoV com uma meia-vida de dissociação ($t_{1/2}$) maior do que cerca de 1,5 minutos, determinado por meio da ressonância de superfície plasmônica, a 37°C, por exemplo, utilizando um formato de ensaio, tal como definido no Exemplo 4 na presente invenção, ou em um ensaio substancialmente semelhante. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da proteína de superfície "spike" da presente invenção ligam-se ao MERS-CoV com $t_{1/2}$ maior do que cerca de 2 minutos, maior do que cerca de 5 minutos, superiores a cerca de 10 minutos, maior do que cerca de 25 minutos, uma maior do que cerca de 50 minutos, maior do que cerca de 100 minutos, maior do que cerca de 150 minutos, ou maior do que cerca de 200 minutos, tal como medido por ressonância de superfície plasmônica, a 37°C, por exemplo, utilizando um formato de ensaio, tal como definido no Exemplo 4 na presente invenção (por exemplo, mAb- capturar ou formato de captura de antígeno), ou em um ensaio substancialmente semelhante.

[00124] A presente invenção também inclui os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam mais de 90% MERS-CoV-S ligação a DPP4, tal como determinado utilizando um ensaio de imunoenensaio baseado em ELISA, por exemplo, como mostrado no Exemplo 2, ou um substancialmente ensaio semelhante.

[00125] A presente invenção também inclui os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno que neutralizam ou inibem a infectividade de Mers-CoV para as suas células hospedeiras. Em certas modalidades, os anticorpos neutralizam a infecciosidade de Mers-CoV-Pseudopartículas (como MERSp). Em algumas modalidades, os anticorpos inibiram mais de 90% da ligação de Mers-CoV em células hospedeiras humanas em um ensaio de neutralização otimizado semelhante a vírus de pseudopartículas (VLP), por exemplo, como mostrado no Exemplo 5, ou em um ensaio substancialmente semelhante. Os

anticorpos neutralizado a infecciosidade MERSpp com IC50 variando de 58,9pM para 2,93nM.

[00126] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção ligam-se ao domínio de ligação ao receptor da proteína de superfície "spike" MERS-CoV ou a um fragmento do domínio. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ligar-se a mais do que um domínio (anticorpos de reação cruzada). Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem-se ligar a um epítopo localizado no domínio de ligação que compreende os resíduos de aminoácidos do receptor de 367-606 de Mers-CoV-S. Em uma modalidade, os anticorpos podem-se ligar a um epítopo que compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em resíduos de aminoácidos 367-606 da sequência apresentada na SEQ ID NO: 457.

[00127] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem funcionar por meio de bloquear ou inibir a atividade de ligação a DPP4 associada a proteína de superfície "spike" MERS-CoV por meio da ligação a qualquer outra região ou ao fragmento da proteína de comprimento total, a sequência de aminoácidos de que é apresentada na SEQ ID nO: 457.

[00128] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser anticorpos biespecíficos. Os anticorpos biespecíficos da presente invenção podem se ligar um epítopo de um domínio e podem também de ligar a um segundo epítopo do mesmo ou um domínio diferente da proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Em certas modalidades, os anticorpos biespecíficos da presente invenção podem se ligar a dois epítopos diferentes no mesmo domínio.

[00129] Em uma modalidade, a presente invenção refere-se a um fragmento isolado do anticorpo recombinante ou de ligação do antígeno, que se liga especificamente a proteína de superfície "spike"

MERS-CoV, em que o anticorpo ou fragmento do mesmo exibe uma ou mais das seguintes características: (a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano; (b) interage com um ou mais resíduos de aminoácidos no domínio da proteína de superfície "spike" de ligação ao receptor selecionado a partir de resíduos de aminoácido 367-606 da sequência apresentada na SEQ ID NO: 457; (c) liga-se a proteína de superfície "spike" MERS-CoV com uma constante de dissociação (KD) de menos de 18.5nM, tal como medido em um ensaio de ressonância plasmônica de superfície; (d) bloqueia a ligação da proteína de superfície "spike" MERS-CoV a dipeptidil-peptidase 4 por mais do que 90%, tal como medido em um ensaio de ELISA de bloqueio; (e) neutraliza a infecciosidade de MERS-CoV de células hospedeiras humanas por mais de 90% e com um IC50 inferior a 4 nM, como medido em um ensaio de neutralização de VLP; (f) neutraliza a infecciosidade de MERS-CoV em que os MERS-CoV compreende um isolado do vírus selecionado a partir do grupo que consiste em EMC/2012, Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, Al-Hasa_3_2013, Al-Hasa_4_2013, Al-Hasa_12, Al-Hasa_15, Al-Hasa_16, Al-Hasa_17, Al-Hasa_18, Al-Hasa_19, Al-Hasa_21, Al-Hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England 1, Hafr-Al-Batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, UAE e Wadi-Ad-Dawasir; (g) bloqueia MERS-CoV in vivo em um indivíduo infectado com MERS-CoV; e (h) é um anticorpo biespecífico que compreende uma primeira especificidade de ligação para um primeiro epítipo no receptor de domínio da proteína de superfície "spike" MERS-CoV e uma segunda especificidade de ligação que se liga a um segundo epítipo do receptor de domínio da proteína de superfície "spike" MERS-CoV obrigatório em que os primeiro e segundo epítopos são distintos e

não sobrepostos.

[00130] Os anticorpos da presente invenção podem possuir uma ou mais das características biológicas acima mencionadas, ou quaisquer combinações dos mesmos. Outras características biológicas dos anticorpos da presente invenção serão evidentes para uma pessoa com conhecimentos correntes na técnica a partir de uma revisão da presente descrição, incluindo os exemplos de trabalho descritos na presente invenção.

Mapeamento de Epítipo e Tecnologias Relacionadas

[00131] A presente invenção inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S que interagem com um ou mais aminoácidos que se encontram dentro de um ou mais domínios da molécula da proteína de superfície "spike" MERS-CoV incluindo, os resíduos N-terminal do domínio S1 (aminoácidos 1 -751) e C-terminal do domínio S2 (resíduos de aminoácidos 752-1353). O epítipo para o qual os anticorpos se ligam podem consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos localizados dentro de qualquer um dos domínios acima referidos da molécula do pico de proteína MERS-CoV (por exemplo, um epítipo linear em um domínio). De uma maneira alternativa, o epítipo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos), localizados dentro de um ou ambos os domínios acima referidos da molécula da proteína de superfície "spike" (por exemplo, um epítipo conformacional).

[00132] Várias técnicas conhecidas para pessoas com conhecimentos normais na técnica podem ser utilizadas para determinar se um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos " dentro de um polipeptídeo ou proteína. Exemplos de técnicas incluem, por exemplo, os ensaios de bloqueio cruzado de rotina, tal como o descrito em Antibodies, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor,

Nova Iorque). Outros métodos incluem a análise de digitalização mutacional de alanina, análise de peptídeo blot (Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248: 443 a 63), análise de clivagem do peptídeo de estudos de cristalografia e análise de RMN. Além disso, os métodos tais como a excisão de epítopo, extração de epítopo e modificação química dos antígenos podem ser empregues (Tomer (2000) *Prot Sci* 9: 487 a 496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um anticorpo interage é a troca de hidrogênio/deutério detectado por meio da espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de troca de hidrogênio/deutério envolve a proteína de interesse, seguido por meio da ligação do anticorpo a proteína marcada com deutério. Em seguida, o complexo proteína/anticorpo é transferido para a água e prótons permutáveis dentro dos aminoácidos que estão protegidos por meio do complexo anticorpo submetendo a volta de troca deutério-a-hidrogênio a uma taxa mais lenta do que prótons permutáveis nos aminoácidos que não são parte da interface. Como resultado, os aminoácidos que formam parte da interface de proteína/anticorpo podem reter o deutério e, portanto, exibem relativamente mais elevação em comparação com a massa dos aminoácidos não incluídos na interface. Após dissociação do anticorpo, a proteína alvo é submetida a protease de clivagem e análise de espectrometria de massa, revelando assim os resíduos marcados com deutério, que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais interage anticorpo. Vide, por exemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252 a 259; Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A a 265A.

[00133] O termo "epítopo" refere-se a um local em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Os epítopos de células B podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos ou aminoácidos não contíguos justapostos por meio da dobragem terciária de uma pro-

teína. Os epítomos formados a partir de aminoácidos contíguos são tipicamente mantidos a exposição a solventes desnaturantes, enquanto que os epítomos formados por meio do enovelamento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com solventes desnaturantes. Um epítomo tipicamente inclui pelo menos 3, e mais geralmente, pelo menos 5 ou 8-10 aminoácidos em uma conformação espacial única.

[00134] Perfil associado à Modificação (MAP), também conhecido como perfil de anticorpo à base de estrutura de antígeno (ASAP) é um método que categoriza um grande número de anticorpos monoclonais (mAbs) dirigidos contra o mesmo antígeno de acordo com as semelhanças entre o perfil de ligação de cada anticorpo para superfícies de antígeno modificadas quimicamente ou enzimaticamente (vide o documento US 2004/0101920, especificamente incorporado na presente invenção por meio de referência na sua totalidade). Cada categoria pode refletir um epítomo único quer distintamente diferente ou parcialmente sobreposto com epítomo representado por outra categoria. Esta tecnologia permite a filtração rápida de anticorpos geneticamente idênticos, de tal modo que a caracterização pode ser focada em anticorpos geneticamente distintos. Quando aplicado a um rastreamento de hibridomas, MAP pode facilitar a identificação de clones de hibridoma que produzem os mAbs raros possuindo as características desejadas. MAP pode ser utilizado para classificar os anticorpos da presente invenção em grupos de anticorpos de ligação a epítomos diferentes.

[00135] Em certas modalidades, os anticorpos anti-MERS-CoV-s ou os fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos se ligam a um epítomo dentro de qualquer uma ou mais das regiões exemplificadas na proteína de superfície "spike" MERS-CoV, quer na forma natural, como exemplificado na SEQ ID nO: 457, ou produzido de forma recombinante, como exemplificado na SEQ ID nO: 458, ou a um fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente inven-

ção ligam-se a uma região extracelular que compreende um ou mais aminoácidos selecionados do grupo que consiste em resíduos de aminoácidos 367-606 da proteína de superfície "spike" MERS-CoV.

[00136] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção, interagem com pelo menos uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste em resíduos de aminoácidos que vão desde cerca da posição 358 a cerca da posição 450; ou resíduos de aminoácidos que vão desde cerca da posição 451 a cerca da posição 606 da SEQ ID NO: 457.

[00137] A presente invenção inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S que se ligam ao mesmo epítopo, ou a uma porção do epítopo, como qualquer um dos exemplos de anticorpos específicos obtidos a partir das linhagens de célula listadas na Figura 1. Da mesma forma, a presente invenção também inclui os anticorpos anti-MERS-CoV-S que competem para a ligação a proteína de superfície "spike" MERS-CoV ou um fragmento do mesmo com qualquer um dos exemplos de anticorpos específicos obtidos a partir dos hibridomas referidos na Figura 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anti-anticorpos MERS-CoV-S que competem para a ligação cruzada do pico de proteína MERS-CoV com um ou mais anticorpos obtidos a partir dos hibridomas referidos na Figura 1.

[00138] Pode-se facilmente determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítopo que, ou compete para a ligação com um anticorpo de referência anti-MERS-CoV-S usando os métodos de rotina conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epítopo como um anticorpo anti-MERS-CoV-S de referência da presente invenção, o anticorpo de referência é deixado ligar-se a um pico da proteína MERS-CoV ou peptídeo sob condições de saturação. Em seguida, a capacidade de um anticorpo de teste para se ligar à molécula da proteína de superfície "spike" MERS-CoV é ava-

liada. Se o anticorpo de teste é capaz de se ligar a Mers-CoV-S a seguir à ligação com o anticorpo de referência anti-MERS-CoV-S de saturação, pode-se concluir que o anticorpo de teste liga-se a um epítopo diferente do que a referência anti-MERS-CoV anticorpo -S. Por outro lado, se o anticorpo de teste não é capaz de se ligar a proteína de superfície "spike" MERS-CoV a seguir à ligação com o anticorpo anti-MERS-CoV-S de referência de saturação, em seguida, o anticorpo de teste pode-se ligar ao mesmo epítopo que o epítopo ligado ao anticorpo anti-MERS-CoV-S de referência da presente invenção.

[00139] Para determinar se um anticorpo compete para a ligação com um anticorpo de referência anti-MERS-CoV-S, a metodologia de ligação acima descrito é realizada em duas orientações: em uma primeira orientação, o anticorpo de referência é deixado ligar-se a um pico da proteína MERS-cov sob condições de saturação seguida de uma avaliação da ligação do anticorpo de teste à molécula MERS-CoV-S. Em uma segunda orientação, o anticorpo de teste é deixado ligar-se a uma molécula MERS-CoV-S sob condições de saturação seguida de uma avaliação da ligação do anticorpo de referência para a molécula MERS-CoV-S. Se, em ambas as orientações, apenas o primeiro anticorpo (saturação) é capaz de se ligar à molécula MERS-CoV-S, então concluiu-se que o anticorpo de teste e o anticorpo de referência compete para a ligação a MERS-CoV-S. Como irá ser apreciado por meio de uma pessoa de conhecimentos normais na técnica, um anticorpo que compete para a ligação com um anticorpo de referência pode não se ligar necessariamente à do epítopo idêntico como o anticorpo de referência, mas estericamente pode bloquear a ligação do anticorpo de referência através da ligação de uma sobreposição ou epítopo adjacente.

[00140] Dois anticorpos se ligam ao mesmo epítopo ou a sobreposição se cada inibe competitivamente (bloqueia) a ligação da outra pa-

ra o antígeno. Isto é, um de 1, 5, 10, 20 ou 100 vezes em excesso de um anticorpo inibe a ligação do outro por, pelo menos, 50%, mas de preferência 75%, 90% ou mesmo 99% como medido em um ensaio de ligação competitivo (Vide, por exemplo, Junghans *et al.*, Cancer Res 1990 50: 1495 a 1502). De uma maneira alternativa, dois anticorpos têm o mesmo epítipo se essencialmente todas as mutações de aminoácidos do antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzindo ou eliminando a ligação do outro. Dois anticorpos têm epítopos sobrepostos se algumas mutações de aminoácidos que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzindo ou eliminando a ligação do outro.

[00141] A experimentação de rotina adicional (por exemplo, a mutação de peptídeos e análise de ligação) pode, então, ser realizada para confirmar se a observada ausência de ligação do anticorpo de teste é, de fato, devido à ligação para o mesmo epítipo que o anticorpo de referência ou se o bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável para a falta de ligação observada. As experiências deste tipo podem ser realizadas por meio de ELISA, RIA, ressonância de superfície plasmônica, citometria de fluxo ou qualquer outro teste de ligação de anticorpo qualitativo ou quantitativo disponível na técnica.

Imunoconjugados

[00142] A presente invenção abrange um anticorpo monoclonal anti-MERS-CoV-S humano conjugado com uma porção terapêutica ("imunoconjugado"), tal como um toxoide ou um fármaco antiviral para tratar a infecção por MERS. Tal como usado na presente invenção, o termo "imunoconjugado" refere-se a um anticorpo que é quimicamente ou biologicamente ligado a um agente radioativo, uma citocina, um interferona, uma unidade de destino ou repórter, uma enzima, um peptídeo ou uma proteína ou um agente terapêutico. O anticorpo pode ser ligado ao agente radioativo, uma citocina, interferon, uma porção re-

pórtar ou alvo, enzima, peptídeo ou agente terapêutico em qualquer local ao longo da molécula, desde que ele é capaz de se ligar ao seu alvo. Exemplos de imunocombinados incluem combinados de medicamentos de anticorpos e proteínas de fusão anticorpo-toxina. Em uma modalidade, o agente pode ser um segundo anticorpo diferente a proteína de superfície "spike" MERS-CoV. Em certas modalidades, o anticorpo pode ser combinado a um agente específico de uma célula viralmente infectada. O tipo de grupo terapêutico que pode ser combinado com o anticorpo anti-MERS-CoV-S tomará em consideração a condição a ser tratada e do efeito terapêutico desejado a ser alcançado. Exemplos de agentes adequados para a formação de imunocombinados são conhecidos na técnica; vide, por exemplo, o documento WO 05/103081.

Anticorpos multiespecíficos

[00143] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecífico, biespecífico ou multiespecífico. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítopos de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação ao antígeno específico para o polipeptídeo de mais do que um destino. Vide, por exemplo, Tutt *et al.*, 1991, J. Immunol. 147: 60 a 69; Kufer *et al.*, 2004, Trends Biotechnol. 22: 238 a 244.

[00144] Qualquer uma das moléculas de ligação ao antígeno multiespecíficas da presente invenção, ou variantes dos mesmos, podem ser construídos usando as técnicas de biologia moleculares padrão (por exemplo, tecnologia de DNA e expressão de proteína, recombinante), como será conhecido de uma pessoa que é versada na técnica.

[00145] Em algumas modalidades, os anticorpos Mers-CoV-S-específicas são gerados em um formato biespecífico (um "biespecífico") em que as regiões variáveis que se ligam a domínios distintos da proteína de superfície "spike" MERS-CoV estão ligados entre si para

conferir especificidade dual-domínio dentro de uma única molécula de ligação. Adequadamente, os biespecíficos concebidos podem melhorar a eficácia global inibitória da proteína de superfície "spike" MERS-CoV através do aumento tanto especificidade e avides de ligação. As regiões variáveis com especificidade para os domínios individuais, (por exemplo, segmentos do domínio N-terminal), ou que podem ligar-se a diferentes regiões dentro de um domínio, são combinados em uma estrutura principal que permite que cada região venha a se ligar simultaneamente aos epítomos separados, ou a diferentes regiões dentro de um domínio. Em um exemplo para as regiões biespecíficas da cadeia pesada variável (VH) de um ligante, com especificidade para um domínio são recombinados com regiões variáveis da cadeia leve (VL) de uma série de ligantes com especificidade para um segundo domínio de identificar os parceiros VL não cognatos que podem ser emparelhados com uma VH original sem interromper a especificidade original para que VH. Desta forma, um único segmento VL (por exemplo, VL1) pode ser combinado com dois domínios VH diferentes (por exemplo, VH1 e VH2), para gerar um biespecífico composto de dois "braços" de ligação (VH1- VL1 e VH2-VL1). A utilização de um único segmento VL reduz a complexidade do sistema e, assim, simplifica e aumenta a eficiência de clonagem, expressão, e processos de purificação utilizados para gerar o biespecífico (Vide, por exemplo, USSN13/022759 e US2010/0331527).

[00146] Em alternativa, os anticorpos que se ligam a mais de um domínio e um segundo alvo, tais como, mas não limitados a, por exemplo, um segundo anticorpo anti-MERS-CoV-S diferente, pode ser preparado em um formato biespecífico utilizando as técnicas na presente invenção descritas, ou outras técnicas conhecidas de uma pessoa que é versada na técnica. As regiões variáveis do anticorpo que se ligam a regiões distintas podem ser ligadas em conjunto com as

regiões variáveis que se ligam a locais relevantes em, por exemplo, o domínio extracelular de Mers-CoV-S, para conferir especificidade dual-antígeno dentro de uma única molécula de ligação. Adequadamente, os biespecíficos concebidos desta natureza servem uma função dupla. As regiões variáveis com especificidade para o domínio extracelular são combinadas com uma região variável com especificidade para fora do domínio extracelular e são combinadas em uma estrutura principal que permite que cada região variável venha a se ligar aos antígenos separados.

[00147] Um formato de anticorpo biespecífico exemplar que pode ser usado no contexto da presente invenção envolve a utilização de um primeiro domínio CH3 de imunoglobulina (Ig) e um segundo domínio CH3 de Ig, em que os primeiro e segundo domínios CH3 de Ig diferem de um do outro por pelo menos um aminoácido, e em que pelo menos uma diferença de aminoácidos reduz a ligação do anticorpo biespecífico para a proteína em relação a um anticorpo biespecífico para a falta a diferença de aminoácidos. Em uma modalidade, o primeiro domínio CH3 de Ig liga a proteína A e o segundo domínio CH3 de Ig contém uma mutação que reduz ou suprime a proteína A de ligação, tal como uma modificação H95R (por numeração IMGT éxon; H435R por numeração UE). A segunda CH3 pode compreender ainda uma modificação Y96F (por IMGT; Y436F pela UE). Outras modificações que podem ser encontrados dentro do segundo CH3 incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M e V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M e V422I pela UE) no caso de anticorpos IgG1; N44S, K52N e V82I (IMGT; N384S, K392N, e V422I pela UE) no caso de anticorpos IgG2; e Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q e V422I pela UE) no caso de anticorpos IgG4. Variações no formato de anticorpo biespecífico descrito acima são contemplados dentro do âmbito

da presente invenção.

[00148] Outros formatos biespecíficos exemplificativos que podem ser utilizados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, scFv ou diacorpo baseados em formatos biespecíficos, fusões scFv-IgG, domínio duplo variável (DVD) -Ig, quadroma, botões nos buracos, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com botões nos buracos, etc.), CrossMab, CrossFab, (SEED) corpo, leucina zipper, Duobody, IgG1/IgG2, Fab (DAF) – IgG de ação dupla, e formatos mAb2 biespecíficos (vide, por exemplo, Klein *et al.*, 2012, os mAbs 4: 6, 1-11, e referências aí citadas, por meio de uma avaliação dos formatos precedentes). Os anticorpos biespecíficos também podem ser construídos utilizando peptídeo/conjugação do ácido nucleico, por exemplo, em que os aminoácidos não naturais com reatividade química ortogonal são utilizados para gerar conjugados de anticorpo-oligonucleotídeo específicos do local, que, em seguida, auto-montam em complexos multiméricos com composição, valência e geometria definida. (Vide, por exemplo, Kazane *et al.*, J. Am Chem Soc [Epub: 04 de dezembro de 2012]).

Administração e Formulações terapêuticas

[00149] A presente invenção refere-se a composições terapêuticas que compreende os anticorpos anti-MERS-CoV-s ou fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos da presente invenção. As composições terapêuticas de acordo com a presente invenção serão administradas com os veículos adequados, excipientes, e outros agentes que são incorporados em formulações para proporcionar uma melhor transferência, a entrega, a tolerância, e semelhantes. Uma multidão de formulações apropriadas podem ser encontradas no formulário conhecido de todos os químicos farmacêuticos: Remington 's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Estas formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geleias, ceras, óleos,

lipídios, lipídios (aniônico ou catiônico) contendo vesículas (tais como LIPOFECTIN™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidras, emulsões óleo-em-água e emulsões óleo em água, emulsões de Carbowax (polietileno glicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos, e misturas semissólidas contendo Carbowax. Vide também Powell *et al.*, "Compêndio de excipientes para formulações parenterais" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52: 238 a 311.

[00150] A dose de anticorpos pode variar dependendo da idade e do tamanho de um indivíduo a ser administrado, da doença alvo, o estado, a via de administração, e semelhantes. Quando um anticorpo da presente invenção é utilizado para tratar uma doença ou distúrbio em um paciente adulto, ou para a prevenção de uma tal doença, é vantajoso administrar o anticorpo da presente invenção, normalmente a uma dose única de cerca de 0,1 a cerca de 60 mg/kg de peso corporal, mais de preferência cerca de 5 a cerca de 60, cerca de 10 a cerca de 50, ou cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. Dependendo da gravidade da condição, a frequência e a duração do tratamento pode ser ajustado. Em certas modalidades, o anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da presente invenção pode ser administrado como uma dose inicial de pelo menos cerca de 0,1 mg a cerca de 800 mg, cerca de 1 a cerca de 500 mg, cerca de 5 a cerca de 300 mg, ou cerca de 10 a cerca de 200 mg, a cerca de 100 mg, ou de cerca de 50 mg. Em certas modalidades, a dose inicial pode ser seguida por meio da administração de uma segunda ou uma pluralidade de doses subsequentes do anticorpo ou um fragmento do mesmo em uma quantidade que pode ser aproximadamente a mesma ou menor do que a da dose inicial, em que a ligação ao antígeno das doses subsequentes são separadas por pelo menos 1 dia a 3 dias; pelo menos uma semana, pelo menos, 2 semanas; pelo menos, 3 semanas; pelo menos 4 semanas; pelo menos 5 semanas; pelo me-

nos 6 semanas; pelo menos 7 semanas; pelo menos 8 semanas; pelo menos 9 semanas; pelo menos 10 semanas; pelo menos 12 semanas; ou, pelo menos, 14 semanas.

[00151] Vários sistemas de liberação são conhecidos e podem ser utilizados para administrar a composição farmacêutica da presente invenção, por exemplo, encapsulação em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutantes, endocitose mediada pelo receptor (vide, por exemplo, Wu *et al.*, (1987) J. Biol Chem 262: 4429 a 4432). Os métodos de introdução incluem, mas não estão limitados a intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural e oral. A composição pode ser administrada por qualquer via conveniente, por exemplo por infusão ou injeção de bolus, absorção através de revestimentos por epiteliais ou mucocutâneas (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e podem ser administrados juntamente com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local. A composição farmacêutica pode também ser entregue em uma vesícula, em particular um lipossoma (vide, por exemplo, Langer (1990) Science 249: 1527 a 1533).

[00152] A utilização de nanopartículas para entregar os anticorpos da presente invenção é também contemplada na presente invenção. As nanopartículas de anticorpo de conjugado podem ser utilizadas tanto para aplicações terapêuticas quanto de diagnóstico. As nanopartículas e métodos de preparação e utilização de anticorpos conjugados são descritas em detalhe por Arruebo, M., *et al.*, 2009 ("Nanopartículas de anticorpo conjugado para aplicações biomédicas" em J. NanoMat Volume 2009, Artigo 439389, 24 páginas, doi: 10,1155./2009/439389), incorporado na presente invenção por meio de referência. As nanopartículas podem ser desenvolvidas e conjugadas com anticorpos contidos em composições farmacêuticas para direcionar as células viral-

mente infectadas. As nanopartículas para entrega de fármacos também têm sido descritas em, por exemplo, US 8257740, US 8246995 ou, cada uma incorporada na presente invenção na sua totalidade.

[00153] Em certas situações, a composição farmacêutica pode ser entregue em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, pode ser usada uma bomba. Em uma outra modalidade, os materiais poliméricos podem ser usados. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo da composição, requerendo assim apenas uma fração da dose sistêmica.

[00154] As preparações injetáveis podem incluir as formas de dosagem para administração intravenosa, subcutânea, intradérmica, intracraniana, intraperitoneal e injeções intramusculares, infusões por gotejamento, etc. Estas preparações injetáveis podem ser preparadas por meio dos métodos conhecidos publicamente. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, por dissolução, suspensão ou emulsificação o anticorpo ou o seu sal descrito anteriormente em um meio aquoso estéril ou um meio oleoso convencionalmente utilizados para injeções. À medida que o meio aquoso para injeções, existem, por exemplo, solução salina fisiológica, uma solução isotônica contendo glucose e outros agentes auxiliares, etc., os quais podem ser utilizados em combinação com um agente de solubilização apropriado tal como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, propileno glicol, polietileno glicol), um agente tensoativo não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) do aduto de óleo de rícino hidrogenado)], etc. Como o meio oleoso, são empregados, por exemplo, óleo de sésamo, óleo de soja, etc, que podem ser utilizados em combinação com um agente de solubilização, tais como benzoato de benzila, álcool de benzila, etc. A injeção assim preparada é de preferência

cheia em uma ampola adequada.

[00155] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser entregue por via subcutânea ou por via intravenosa com uma agulha e seringa padrão. Além disso, no que diz respeito à entrega por via subcutânea, um dispositivo de administração tipo caneta tem prontamente aplicações na entrega de uma composição farmacêutica da presente invenção. Um tal dispositivo de administração tipo caneta pode ser reutilizável ou descartável. Um dispositivo de administração tipo caneta reutilizável geralmente utiliza um cartucho substituível que contém uma composição farmacêutica. Uma vez que toda a composição farmacêutica no interior do cartucho foi administrada e o cartucho está vazio, o cartucho vazio pode ser facilmente descartado e substituído com um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de administração tipo caneta pode então ser reutilizado. Em um dispositivo de administração tipo caneta descartável, não há cartucho substituível. Em vez disso, o dispositivo de administração tipo caneta descartável vem pré-cheio com a composição farmacêutica realizada em um reservatório no interior do dispositivo. Uma vez que o reservatório é esvaziado da composição farmacêutica, todo o dispositivo é descartado.

[00156] Vários dispositivos do tipo caneta e auto-injetor de entrega reutilizáveis têm aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Os exemplos incluem, mas certamente não se limitam a Autopen™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suíça), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta Humalog™, caneta Humalin 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NovoPen™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhaga, Dinamarca), NovoPen JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhaga, Dinamarca), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), Optipen™, Optipen PRO™,

Optipen STARLET™ e OptiClik™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha), para citar apenas alguns. Exemplos de dispositivos de administração tipo caneta descartável possuindo as aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção incluem, mas certamente não estão limitados a a caneta SoloSTAR™ (Sanofi-Aventis), o FLEXPEN™ (Novo Nordisk), e a KwikPen™ (Eli Lilly), o autoinjeter SureClick™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), o PENLET™ (Haselmeier, Estugarda, Alemanha), o EpiPen (Dey, LP) e caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), para citar apenas alguns.

[00157] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para utilização oral ou parentérica descritas acima, são preparadas em formas de dosagem de uma dose unitária adequada para encaixar uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagem em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios, etc. A quantidade do anticorpo contido é geralmente cerca de 5 a cerca de 500 mg por forma de dosagem em uma dose unitária; especialmente sob a forma de injeção, prefere-se que o anticorpo esteja contido em cerca de 5 a cerca de 100 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para as outras formas de dosagem.

Usos Terapêuticos dos anticorpos

[00158] Os anticorpos da presente invenção são úteis para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou distúrbio ou condição associada com Mers-coronavírus, tais como infecção MERS e/ou para melhorar pelo menos um sintoma associado com tal doença, distúrbio ou condição. Em uma modalidade, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno da presente invenção pode ser administrado a uma dose terapêutica a um paciente com infecção MERS.

[00159] Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são úteis para o tratamento de indivíduos que sofrem da infecção

respiratória grave e aguda causada por MERS-coronavírus. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção são úteis na diminuição título viral ou reduzem a carga viral no hospedeiro. Em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção são úteis na prevenção ou redução da inflamação no pulmão de um indivíduo com MERS. Em uma modalidade, os anticorpos da presente invenção são úteis na prevenção ou redução intersticial, inflamação peribronquiolar ou perivascular, dano alveolar e alterações pleurais em um indivíduo com MERS.

[00160] Um ou mais anticorpos da presente invenção podem ser administrados para aliviar ou prevenir ou diminuir a severidade de um ou mais dos sintomas ou condições de doença ou distúrbio. Os anticorpos podem ser utilizados para melhorar ou reduzir a gravidade de, pelo menos, um sintoma de infecção MERS incluindo, mas não se limitando a que consiste em febre, tosse, falta de ar, pneumonia, diarreia, insuficiência de órgãos (por exemplo, insuficiência renal e disfunção renal), choque séptico e morte.

[00161] É também contemplado na presente invenção para usar um ou mais anticorpos da presente invenção profilaticamente a indivíduos em risco de desenvolver infecção MERS como indivíduos imunocomprometidos, adultos idosos (mais de 65 anos de idade), crianças menores de 2 anos de idade, os viajantes para países do Oriente médio (por exemplo, a Arábia Saudita, Emirados Árabes Unidos e Qatar), trabalhadores da saúde, pessoas com contato ocupacional ou recreacional com camelos ou morcegos, os membros da família em estreita proximidade a um paciente MERS, adultos ou crianças com entre em contato com pessoas com infecção confirmada ou suspeita de MERS, e pacientes com uma história médica (por exemplo, aumento do risco de infecção pulmonar, doença cardíaca ou diabetes).

[00162] Em uma outra modalidade da presente invenção, os anti-

corpos da presente invenção são utilizados para a preparação de uma composição farmacêutica ou medicamento para o tratamento de pacientes que sofrem de infecção MERS. Em uma outra modalidade da presente invenção, os anticorpos da presente invenção são utilizados como terapia adjuvante com qualquer outro agente ou qualquer outra terapia conhecida para as pessoas que são versadas na técnica úteis para o tratamento ou melhoramento de infecção MERS.

Terapias de combinação

[00163] As terapias de combinação podem incluir um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção e qualquer agente terapêutico adicional que pode ser vantajosamente combinado com um anticorpo da presente invenção, ou com um fragmento biologicamente ativo de um anticorpo da presente invenção. Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados sinergicamente com um ou mais fármacos ou terapia utilizados para tratar MERS. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente invenção podem ser combinados com um segundo agente terapêutico para reduzir a carga viral em um paciente com infecção MERS, ou para melhorar um ou mais sintomas da infecção.

[00164] Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em combinação com um fármaco anti-inflamatório (como por exemplo corticosteroides, e fármacos não esteroides anti-inflamatórios), um medicamento anti-infeccioso, um anticorpo diferente da proteína de superfície "spike" MERS-CoV, um fármaco antiviral, interferon alfa-2b e ribavirina intramuscular, plasma convalescente, um inibidor da principal protease viral, e inibidores de entrada/fusão dirigidos a proteína de superfície "spike" MERS-CoV, uma vacina para MERS-CoV, antibióticos, uma suplemento alimentar, tais como antioxidantes ou qualquer outro tratamento paliativo para tratar MERS infecção.

[00165] Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é um outro anticorpo a proteína de superfície "spike" MERS-CoV. É na

presente invenção contemplada a utilização de um conjunto ("coquetel") de anticorpos com ampla neutralização ou atividade inibidora contra MERS-CoV. Em algumas modalidades, os anticorpos não concorrentes podem ser combinados e administrados a um indivíduo em necessidade do mesmo, para reduzir a capacidade do vírus MERS para escapar devido a mutação rápida, como resultado da pressão de seleção. Em algumas modalidades, os anticorpos que compreendem a combinação se ligam a epítopos que não se sobrepõem distintos na proteína de pico. Os anticorpos que compreendem a combinação pode bloquear a ligação de CoV de MERS a DPP4 ou pode prevenir/inibir a fusão da membrana. Os anticorpos que compreendem a combinação podem inibir a atividade MERS-CoV de um ou mais Mers-CoV isolados, incluindo, mas não se limitando a, EMC/2012, Jordan-N3/2012, England-Qatar/2012, Al-Hasa_1_2013, Al-Hasa_2_2013, al-Hasa_3_2013, al-Hasa_4_2013, al-Hasa_12, al-Hasa_15, al-Hasa_16, al-Hasa_17, al-Hasa_18, al-Hasa_19, al-Hasa_21, al-hasa_25, Bisha_1, Buraidah_1, England 1, Hafr-al -batin_1, Hafr-Al-Batin_2, Hafr-Al-Batin_6, Jeddah_1, KFU-HKU 1, KFU-HKU 13, Munich, Qatar3, Qatar4, Riyadh_1, Riyadh_2, Riyadh_3, Riyadh_3, Riyadh_4, Riyadh_5, Riyadh_9, Riyadh_14, Taif_1, Emirados Árabes Unidos, e Wadi-Ad-Dawasir.

[00166] É também contemplado na presente invenção a utilização de uma combinação de anticorpos da presente invenção, em que a combinação compreende uma ou mais anticorpos que não se cruzam-competem com anti-MERS-CoV-S; Em algumas modalidades, a combinação inclui um primeiro anticorpo com atividade de neutralização ampla com um segundo anticorpo com atividade contra um espectro estreito de isolados e que não cruza-competem com o primeiro anticorpo.

[00167] Tal como usado na presente invenção, o termo "em combinação com" significa que o (s) componente (s) terapeuticamente ativo

(s) adicionais podem ser administrados antes de, concorrentemente com, ou após a administração do anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção. O termo "em combinação com" também inclui a administração sequencial ou concomitante de um anticorpo anti-MERS-CoV-S e um segundo agente terapêutico.

[00168] O (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adicional (s) pode ser administrado (s) a um indivíduo antes da administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção. Por exemplo, um primeiro componente pode ser considerado para ser administrado "antes" um segundo componente, se o primeiro componente é administrado uma semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, a 5 minutos antes de, ou menos de 1 minuto antes da administração do segundo componente. Em outras modalidades, o (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adicional (s) podem ser administrado (s) a um indivíduo, após a administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção. Por exemplo, um primeiro componente pode ser considerado para ser administrado "depois" de um segundo componente, se o primeiro componente é administrado de 1 minuto depois, 5 minutos depois, 10 minutos após, 15 minutos depois, de 30 minutos após, uma hora depois, 2 horas depois, após 3 horas, 4 horas depois, após 5 horas, 6 horas depois, 12 horas depois, 24 horas depois, 36 horas depois, 48 horas depois, 60 horas depois, 72 horas depois da administração do segundo componente. Em ainda outras modalidades, o (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adiciona (s) podem ser administrado (s) a um indivíduo em simultâneo com a administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção. A administração "concomitante", para os fins da presente invenção, inclui, por

exemplo, a administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S e um componente terapeuticamente ativo adicional a um indivíduo em uma forma de dosagem única, ou em formas de dosagem separadas administradas ao objeto dentro de aproximadamente 30 minutos ou menos, de um ao outro. Se administradas em formas de dosagem separadas, cada forma de dosagem pode ser administrada pela mesma via (por exemplo, tanto o anticorpo anti-MERS-CoV-S e o componente terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado por via intravenosa, etc); De uma maneira alternativa, cada forma de dosagem pode ser administrada através de uma via diferente (por exemplo, o anticorpo anti-MERS-CoV-S pode ser administrado por via intravenosa, e o componente terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado por via oral). Em todo o caso, a administração dos componentes em uma única forma de dosagem, em formas de dosagem separadas, pela mesma via, ou em formas de dosagem separadas por vias diferentes são todos considerados "administração concorrente", para os fins descritos da presente invenção. Para fins da presente invenção, a administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S "antes", "concorrente com," ou "depois" (tal como esses termos são definidos na presente invenção acima) a administração de um componente terapeuticamente ativo adicional é considerada a administração de um anticorpo anti-MERS-CoV-S "em combinação com" um componente terapeuticamente ativo adicional.

[00169] A presente invenção inclui as composições farmacêuticas nas quais um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção é co-formulado com um ou mais do (s) componente (s) terapeuticamente ativo (s) adicional (s), tal como descrito na presente invenção em um outro local.

Regimes de administração

[00170] De acordo com certas modalidades, uma única dose de um

anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção (ou de uma composição farmacêutica que compreende uma combinação de um anticorpo anti-MERS-CoV-S e qualquer um dos agentes terapeuticamente ativos adicionais mencionados na presente invenção) pode ser administrado a um indivíduo em necessidade do mesmo. De acordo com certas modalidades da presente invenção, múltiplas doses de um anticorpo anti-MERS-CoV-S (ou uma composição farmacêutica que compreende uma combinação de um anticorpo anti-MERS-CoV-S e qualquer um dos agentes terapeuticamente ativos adicionais na presente invenção mencionados) podem ser administrados a um indivíduo ao longo de um curso de tempo definido. Os métodos de acordo com este aspecto da presente invenção compreendem sequencialmente a administração a um indivíduo de múltiplas doses de um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção. Tal como usado na presente invenção, "sequencialmente administrar" significa que cada dose de anticorpo anti-MERS-CoV-S é administrada ao indivíduo em um ponto diferente no tempo, por exemplo, em dias diferentes, separados por um intervalo pré-determinado (por exemplo, horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui os métodos que compreendem sequencialmente administração ao paciente de uma única dose inicial de um anticorpo anti-MERS-CoV-S, seguido de uma ou mais doses secundárias do anticorpo anti-MERS-CoV-S, e opcionalmente seguido por uma ou mais doses terciárias do anticorpo anti-MERS-CoV-S.

[00171] Os termos "dose inicial", "doses secundárias," e "doses terciárias," referem-se a sequência temporal da administração do anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção. Dessa maneira, a "dose inicial" é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também referida como a "dose inicial"); "doses secundárias" são as doses que são administrados após a dose inicial; e as doses "terciárias" são as doses que são administradas após as doses secundárias.

As doses iniciais, secundárias, e terciárias podem conter a mesma quantidade de anticorpo anti-MERS-CoV-S, mas geralmente podem ser diferentes umas das outras em termos de frequência de administração. Em certas modalidades, no entanto, a quantidade de anticorpo anti-MERS-CoV-S contida nas doses iniciais, secundárias e/ou terciárias varia de um outro (por exemplo, ajustado para cima ou para baixo, conforme o caso) durante o curso do tratamento. Em certas modalidades, dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, ou 5). As doses são administradas no início do regime de tratamento como "dose de carga", seguido por doses subsequentes que são administradas em uma base menos frequente (por exemplo, "doses de manutenção").

[00172] Em certas modalidades exemplificativas da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada 1 a 48 horas (por exemplo, 1, 1 ½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4 ½, 5, 5 ½, 6, 6 ½, 7, 7 ½, 8, 8 ½, 9, 9 ½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15 ½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½, ou mais) após a dose imediatamente anterior. A frase "a dose imediatamente anterior," tal como usado na presente invenção, significa que, em uma sequência de administrações múltiplas, a dose de anticorpo anti-MERS-CoV-S, que é administrada a um paciente antes da administração da muito próxima dose na sequência com nenhuma dose intervenientes.

[00173] Os métodos de acordo com este aspecto da presente invenção podem compreender a administração a um paciente de qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de um anticorpo anti-MERS-CoV-S. Por exemplo, em certas modalidades, apenas uma dose única secundária é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) doses secundárias são administradas ao paciente. Do mesmo modo, em certas modalidades, apenas uma dose única terciária é administrada ao

paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, ou mais) doses terciárias são administradas ao paciente.

[00174] Em certas modalidades da presente invenção, a frequência à qual as doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente pode variar ao longo do regime de tratamento. A frequência de administração pode também ser ajustada durante o curso do tratamento por um médico dependendo das necessidades do paciente individual subsequente exame clínico.

Utilizações de diagnóstico dos anticorpos

[00175] Os anticorpos anti-MERS-CoV-S da presente invenção podem ser usados para detectar e/ou medir MERS-CoV em uma amostra, por exemplo, para fins de diagnóstico. Algumas modalidades contemplam a utilização de um ou mais anticorpos da presente invenção em ensaios para detectar uma doença ou distúrbio, tais como infecção viral. Os ensaios de diagnóstico exemplificativos para MERS-CoV podem compreender, por exemplo, o contato de uma amostra, obtida de um paciente, com um anticorpo anti-MERS-CoV-S da presente invenção, em que o anticorpo anti-MERS-CoV-S é rotulado com um marcador detectável ou molécula repórter ou usado como um ligando de captura para isolar seletivamente MERS-CoV a partir de amostras de pacientes. De uma maneira alternativa, um anticorpo não marcado anti-MERS-CoV-S pode ser utilizado em aplicações de diagnóstico, em combinação com um anticorpo secundário que é ele próprio marcado de forma detectável. O marcador ou molécula repórter detectável pode ser um radioisótopo, tal como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S ou ^{125}I ; um grupo fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina ou; ou uma enzima, tal como fosfatase alcalina, β -galactosidase, peroxidase de rábano, ou de luciferase. Exemplos de ensaios específicos que podem ser utilizados para detectar ou medir MERS-CoV em uma amostra incluem ensaio imunoabsorvente ligado

a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA), e células ativadas por fluorescência (FACS).

[00176] As amostras que podem ser utilizados em ensaios de diagnóstico MERS-CoV de acordo com a presente invenção incluem qualquer tecido ou amostra de fluido obtido a partir de um paciente, que contém quantidades detectáveis de qualquer pico de proteína MERS-CoV, ou fragmentos dos mesmos, em condições normais ou condições patológicas. Geralmente, os níveis da proteína de superfície "spike" MERS-CoV em uma determinada amostra obtida de um paciente saudável (por exemplo, um paciente não sofre de uma doença associada com MERS-CoV) vão ser medidos inicialmente para estabelecer uma linha de base, ou padrão, nível de MERS-CoV. Este nível basal de MERS-CoV pode então ser comparado com os níveis de MERS-CoV medidos em amostras obtidas a partir de indivíduos suspeitos de terem uma condição associada a MERS-CoV, ou os sintomas associados a essa condição.

[00177] Os anticorpos específicos para a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV podem conter nenhuma etiqueta ou porções adicionais, ou eles podem conter uma etiqueta N-terminal ou C-terminal ou com o radical. Em uma modalidade, a etiqueta ou porção é a biotina. Em um ensaio de ligação, a localização de uma etiqueta (caso exista) pode determinar a orientação do peptídeo em relação à superfície sobre a qual o peptídeo está ligado. Por exemplo, se uma superfície está revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina N-terminal será orientado de modo que a porção C-terminal do peptídeo será distal para a superfície.

EXEMPLOS

[00178] Os exemplos seguintes são apresentados de modo a proporcionar às pessoas que são versadas na técnica com uma descrição completa de como fazer e usar os métodos e composições da presen-

te invenção, e não se destinam a limitar o âmbito daquilo que os inventores consideram como sua presente invenção. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão em relação aos números utilizados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.) mas alguns erros e desvios experimentais devem ser contabilizados. A menos que seja indicado de uma outra maneira, as partes são partes em peso, peso molecular é peso molecular médio, a temperatura é em graus centígrados, a temperatura ambiente é de cerca de 25°C, e a pressão é a atmosférica ou próximo desta.

Exemplo 1 : Geração de anticorpos humanos para a proteína de superfície "spike" MERS-CoV

[00179] Os anticorpos humanos para a proteína de superfície "spike" MERS-CoV foram gerados em um camundongo VELOCIMMUNE® que compreendem DNA que codifica as regiões variáveis de imunoglobulina humana da cadeia pesada e leve kappa. Os camundongos foram imunizados com um constructo de DNA que codifica para a proteína de superfície "spike" de comprimento total MERS-CoV, seguido por uma dose de reforço que compreende um fragmento purificado da proteína de superfície "spike" que varia de 367 - 606 aminoácidos ao GenBank Número de acesso AFS88936.1 (SEQ ID NO: 457). Os códons otimizados da sequência de cDNA que codificam para a proteína MERS-CoV S (CEM/2012 - JX869059 GenBank) foram sintetizados pela GeneArt e clonados em vetores de expressão padrão. Os plasmídeos que codificam as variantes da proteína MERS-CoV S no receptor de domínio de ligação (RBD) foram gerados por mutagênese usando QuikChange II (Agilent Technologies) de acordo com as instruções do fabricante.

[00180] O anticorpo da resposta imune foi monitorizado através de um imunoensaio MERS-CoV-S-específico. Quando uma resposta imunitária desejada foi conseguida, os esplenócitos foram recolhidos e

fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar as suas linhagens de células de hibridoma de viabilidade e forma. As linhagens de célula de hibridoma foram rastreadas e selecionadas para identificar as linhagens celulares que produzem os anticorpos MERS-CoV-S-específicas. De um total de 696 hibridomas que expressam anticorpos específicos para o antígeno, 182 foram encontrados para bloquear a interação entre a proteína de superfície "spike" e DPP4 e 123 bloquearam a entrada de MERSpp em células alvo. As linhagens de células exemplares geradas desta forma foram designadas como HBVX06H05, HBVX11H04, HBVX11D02, HBVZ10E10, HBVY09F08, HBVZ05G02, HBVZ09B06, HBVY01F08, HBVY10G02, HBVY04B06, HBVY07D10, HBVZ08A09, HBVZ05G04, HBVY06C07, HBVY03H06, HBVZ10G06, HBVZ04F10, HBVX11E09, HBVY06H09, HBVZ05B11, HBVY02E05 e HBVZ04C07. As linhagens de células foram usadas para obter vários anticorpos quiméricos anti-MERS-CoV-S (isto é, anticorpos que possuam os domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongo); Os exemplos de anticorpos gerados deste modo foram designados como H1M15277N, H2aM15279N, H1M15280N, H2aM15278N, H2aM15271N, H1M15267N, H2bM15292N, H2bM15291N, H1M15290N, H1M15293N, H1M15289N, H1M15269N, H2aM15287N, H1M15288N, H2aM15268N, H2aM15270N, H2aM15281N, e H2aM15272N.

[00181] A Tabela 1 mostra os anticorpos quiméricos selecionados obtidos a partir dos sobrenadantes de hibridoma correspondentes.

Tabela 1

Ab PID #	Nome do Clone
H1M15267N	HBVX11H04
H1M15269N	HBVY07D10
H1M15277N	HBVX06H05
H1M15280N	HBVZ09B06
H1M15288N	HBVY02E05

Ab PID #	Nome do Clone
H1M15289N	HBVY03H06
H1M15290N	HBVZ04F10
H1M15293N	HBVZ10G06
H2aM15268N	HBVY04B06
H2aM15270N	HBVY09F08
H2aM15271N	HBVY10G02
H2aM15272N	HBVZ05G02
H2aM15278N	HBVX11D02
H2aM15279N	HBVY01F08
H2aM15281N	HBVZ10E10
H2aM15287N	HBVX11E09
H2bM15291N	HBVZ05G04
H2bM15292N	HBVZ08A09

[00182] Os anticorpos anti-MERS-CoV-S também foram isolados diretamente a partir de células antígeno-positivo B de camundongo sem fusão com células de mieloma, tal como descrito na Patente US 7.582.298, incorporada na presente invenção especificamente por meio de referência na sua totalidade. Usando este método, vários anticorpos anti-MERS-CoV-S totalmente humanos (isto é, anticorpos que possuam os domínios variáveis humanos e domínios constantes humanos) foram obtidos; Os exemplos de anticorpos gerados deste modo foram designados como H4sH15188P, H1H15188P, H1H15211P, H1H15177P, H4sH15211P, H1H15260P2, H1H15259P2, H1H15203P, H4sH15260P2, H4sH15231P2, H1H15237P2, H1H15208P, H1H15228P2, H1H15233P2, H1H15264P2, H1H15231P2, H1H15253P2, H1H15215P, e H1H15249P2.

[00183] As propriedades biológicas dos anticorpos exemplares geradas de acordo com os métodos deste exemplo são descritas em pormenores nos exemplos apresentados a seguir.

Exemplo 2: Caracterização de sobrenadantes de hibridoma

[00184] Um ensaio de ligação de ELISA foi realizado para identificar

os anticorpos sobrenadantes (obtidos a partir dos hibridomas acima descritos) que se liga a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV. Uma proteína composta do domínio de ligação ao receptor de MERS-CoV-S (aa E367-Y606) expressa com a porção Fc da molécula de IgG1 humana no terminal C (MERS RBD-hFc; SEQ ID NO: 458) foi revestida a 2 µg/mL em uma placa de 96 cavidades em tampão PBS durante a noite a 4 ° C. Os locais de ligação não específicos foram subsequentemente bloqueados utilizando uma solução de 0,5% de BSA em PBS (v/p). Os sobrenadantes de hibridoma foram diluídos 1:50 no tampão de bloqueio e deixaram-se ligar às placas revestidas MERS RBD, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem, os anticorpos ligados foram detectados utilizando um conjugado de um anticorpo policlonal HRP-hFc (Jackson Immunochemical). As amostras foram desenvolvidas com uma solução de 3,3', 5,5' - tetrametilbenzidina (TMB; BD Biosciences) para produzir uma reação colorimétrica e, em seguida, neutralizou-se com ácido sulfúrico a 1 M antes da medição da absorbância a 450 nm em um leitor de placa Victor (Perkin Elmer). Os resultados são mostrados na Figura 1. A intensidade do sinal a 450 nm foi utilizada para selecionar anticorpos para posterior caracterização.

[00185] As constantes da taxa de ligação de associação e de dissociação (k_a e k_d , respectivamente), as constantes de equilíbrio de dissociação e semivida de dissociação (K_d e $t_{1/2}$, respectivamente) para ligação ao antígeno de sobrenadantes de hibridoma foram determinadas usando um ensaio de ressonância plasmônica de superfície biossensor em tempo real em um instrumento Biacore 4000 ou Biacore T200 (detalhes descritos no Exemplo 4). Como mostrado na Figura 1, 21 de 22 anticorpos de hibridoma ligados a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV com valores de K_D que variam de 245pM de 21.5nM.

[00186] A capacidade de anticorpos contra a proteína de superfície

"spike" anti-MERS coronavírus para bloquear o domínio de ligação ao receptor de MERS (MERS-RBD) de ligação a um parceiro de ligação cognato, dipeptidil-peptidase humano 4 (hDPP4), foi avaliado com um imunoenensaio baseado em ELISA. Resumidamente, dipeptidil-peptidase 4 humana expressa com uma marcação 6xHistidina na extremidade C-terminal (hDPP4-6His; R & D cat # 1180-SE) foi revestida a 2 µg/mL em uma placa de 96 cavidades em tampão PBS durante a noite a 4 ° C. Os locais de ligação não específicos foram subsequentemente bloqueados utilizando uma solução de 0,5% de BSA em PBS (v/p). Esta placa foi utilizada para medir MERS-RBD (aa E367-Y606) expressa com a porção Fc da molécula de IgG1 humana no terminal C (MERS RBD-hFc; SEQ ID NO: 458) em solução de pré MERS RBD-hFc – equilibrada com uma diluição de sobrenadantes de anticorpos anti-MERS. Uma concentração constante de 300pm de Mers RBD-hFc foi pré-misturada com um volume de 10% de sobrenadantes de anticorpos anti-mers, seguido por meio de uma incubação de 1 hora à temperatura ambiente (TA) para permitir que a ligação atingisse o equilíbrio de anticorpo-antígeno. As soluções de amostras equilibradas foram então transferidas para as placas de hDPP4-6his-revestidas. Depois de 1 hora de ligação à TA, as placas foram lavadas e MERS RBD ligado foi detectado utilizando um conjugado de anticorpo HRP-hFc policlonal (Jackson Immunochemical). As amostras foram desenvolvidas com uma solução de TMB (BD Biosciences, # e # 51-2606KC 51-2607KC) para produzir uma reação colorimétrica e, em seguida, neutralizou-se com ácido sulfúrico a 1 M antes da medição da absorbância a 450 nm em um leitor de placa Victor X5. A absorvência medida para a concentração constante de Mers RBD-hFc sozinho é definida como 0% de bloqueio e a absorbância medida para nenhum MERS RBD-hFc adicionado é definida como 100% de bloqueio. O bloqueio percentual foi calculado como a razão da redução do sinal observada na presen-

ça de anticorpo em relação à diferença entre o sinal com MERS RBD-hFc sozinho e antecedente (sinal de HRP conjugado com um anticorpo a-hFc sozinho) subtraído de 100% de bloqueio como definido anteriormente.

[00187] Como se mostra na Figura 1, 17 de 22 anticorpos anti-MERS-CoV-S derivados de hibridomas independentes separados vieram a bloquear mais de 90% da ligação da proteína de superfície "spike" de MERS-CoV de DPP4.

[00188] Os anticorpos anti-MERS-CoV-S derivados de hibridomas independentes separados foram testados quanto à neutralização de infecciosidade de Mers (detalhes de ensaio no Exemplo 5). Como mostrado na Figura 1, os anticorpos de hibridoma de células de 12 de 22 anticorpos anti-MERS-CoV-S de hibridoma inibiram ou neutralizaram mais do que 90% de infecciosidade de Mers e com IC50 variando de 68.4pM para 3.58nM.

Exemplo 3: Sequências de nucleotídeos e de aminoácidos da Região variável da cadeia leve e da cadeia pesada

[00189] A Tabela 2 apresenta os identificadores de sequências de aminoácidos das regiões variáveis da cadeia pesada e leve e CDRs de anticorpos anti-MERS-CoV-S selecionados da presente invenção.

Tabela 2: Identificadores da Sequência de Aminoácidos

Designação do Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H15177P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H15188P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H15203P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H15208P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H15211P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H15215P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H15228P2	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H15231P2	114	116	118	120	106	108	110	112
H1H15233P2	122	124	126	128	106	108	110	112
H1H15237P2	130	132	134	136	106	108	110	112
H1H15249P2	138	140	142	144	106	108	110	112

Designação do Anticorpo	SEQ ID NOS:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H15253P2	146	148	150	152	106	108	110	112
H1H15259P2	154	156	158	160	162	164	166	168
H1H15260P2	170	172	174	176	162	164	166	168
H1H15264P2	178	180	182	184	162	164	166	168
H1M15267N2	186	188	190	192	194	196	198	200
H1M15269N	202	204	206	208	210	212	214	216
H1M15277N	218	220	222	224	226	228	230	232
H1M15280N	234	236	238	240	242	244	246	248
H1M15289N	250	252	254	256	258	260	262	264
H1M15290N	266	268	270	272	274	276	278	280
H1M15293N	282	284	286	288	290	292	294	296
H2M15268N	298	300	302	304	306	308	310	312
H2M15270N	314	316	318	320	322	324	326	328
H2M15271N	330	332	334	336	338	340	342	344
H2M15272N	346	348	350	352	354	356	358	360
H2M15278N	362	364	366	368	370	372	374	376
H2M15279N	378	380	382	384	386	388	390	392
H2M15281N	394	396	398	400	402	404	406	408
H2M15287N	410	412	414	416	418	420	422	424
H2M15291N	426	428	430	432	434	436	438	440
H2M15292N	442	444	446	448	450	452	454	456

[00190] Os correspondentes identificadores de sequência de ácido nucleico são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Identificadores da Sequência de Ácido Nucleico

Designação do Anticorpo	SEQ ID NOS:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H15177P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H15188P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H15203P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H15208P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H15211P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H15215P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H15228P2	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H15231P2	113	115	117	119	105	107	109	111
H1H15233P2	121	123	125	127	105	107	109	111
H1H15237P2	129	131	133	135	105	107	109	111
H1H15249P2	137	139	141	143	105	107	109	111
H1H15253P2	145	147	149	151	105	107	109	111
H1H15259P2	153	155	157	159	161	163	165	167
H1H15260P2	169	171	173	175	161	163	165	167
H1H15264P2	177	179	181	183	161	163	165	167

Designação do Anticorpo	SEQ ID NOS:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1M15267N2	185	187	189	191	193	195	197	199
H1M15269N	201	203	205	207	209	211	213	215
H1M15277N	217	219	221	223	225	227	229	231
H1M15280N	233	235	237	239	241	243	245	247
H1M15289N	249	251	253	255	257	259	261	263
H1M15290N	265	267	269	271	273	275	277	279
H1M15293N	281	283	285	287	289	291	293	295
H2M15268N	297	299	301	303	305	307	309	311
H2M15270N	313	315	317	319	321	323	325	327
H2M15271N	329	331	333	335	337	339	341	343
H2M15272N	345	347	349	351	353	355	357	359
H2M15278N	361	363	365	367	369	371	373	375
H2M15279N	377	379	381	383	385	387	389	391
H2M15281N	393	395	397	399	401	403	405	407
H2M15287N	409	411	413	415	417	419	421	423
H2M15291N	425	427	429	431	433	435	437	439
H2M15292N	441	443	445	447	449	451	453	455

[00191] Os anticorpos são tipicamente referidos na presente invenção de acordo com a seguinte nomenclatura: prefixo Fc (por exemplo, "H4xH," "H1M," "H2M", etc), seguido por um identificador numérico (por exemplo, "15177", "15228," "15268", etc, como mostrado na Tabela 2), seguido por um "P", "P2", "N", ou o sufixo "B". Dessa maneira, de acordo com esta nomenclatura, um anticorpo pode ser referido na presente invenção como, por exemplo, "H1H15177P," "H1H15228P2," "H2M15268N", etc. Os prefixos H4sH, H1M, e H2M sobre as designações de anticorpos usadas na presente invenção indicam o Fc nomeadamente de isotipo da região do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo "H4sH" tem um IgG4 humana Fc com 2 ou mais alterações de aminoácidos tal como descrito em US20100331527, um anticorpo "H1M" tem um camundongo IgG 1 Fc, e um anticorpo "H2M" tem um camundongo IgG2 Fc (isotipo a ou b) (todas as regiões variáveis são totalmente humanas, como é indicado pelo primeiro "H" na designação de anticorpo). Como irá ser apreciado por uma pessoa de conhecimentos normais na técnica, um anticorpo que tem um determinado isotipo Fc pode ser convertido a um anticorpo com um isotipo Fc diferente (por

exemplo, um anticorpo com um camundongo Fc de IgG1 pode ser convertido a um anticorpo com um IgG4 humana, etc), mas, em qualquer caso, os domínios variáveis (incluindo CDRs) - os quais são indicados por meio dos identificadores numéricos mostrados na Tabela 2 - permanecerá o mesmo, e as propriedades de ligação ao antígeno são esperadas serem idênticas ou substancialmente semelhantes, independentemente da natureza do domínio de Fc.

Exemplo 4: ligação do anticorpo ao MERS-CoV-S, como determinado pela superfície de Ressonância Plasmônica

[00192] As constantes da taxa de ligação de associação e de dissociação (k_a e k_d , respectivamente), foram determinadas as constantes de equilíbrio de dissociação e a semivida de dissociação (K_d e $t_{1/2}$, respectivamente) para ligação ao antígeno de anticorpos purificados anti-MERS-CoV-S ou sobrenadantes de hibridoma utilizando um ensaio de biossensor de ressonância de superfície plasmônica em tempo real em um instrumento Biacore 4000 ou Biacore T200. A superfície do sensor da Biacore foi derivatizada com um anticorpo policlonal de coelho anti-camundongo (GE, # BR-1008-38) ou com um anticorpo monoclonal de camundongo de Fc anti-humano (GE, # BR-1008-39) para capturar cerca de 100- 900 URs de anticorpos monoclonais anti-MERS-CoV-S, expressos com qualquer um Fc de camundongo ou um Fc humano, respectivamente. Os reagentes MERS-CoV testados para a ligação aos anticorpos anti-MERS-CoV-S incluíram os recombinantes MERS-CoV-S do receptor de domínio expresso com uma Fc de IgG1 humana do C-terminal de ligação (MERS RBD-hFc; SEQ ID NO: 458). Diferentes concentrações de reagente MERS-CoV que variam de 200 nM a 3.7nM foram injetadas sobre a superfície de anticorpo anti-MERS-CoV-S monoclonal capturado a um caudal de 30 uL/min em Biacore 4000 ou em 50 uL/min em Biacore T200. A ligação do reagente MERS-CoV aos anticorpos monoclonais capturadas foi monitori-

zada durante 3 a 5 minutos, enquanto a sua dissociação a partir dos anticorpos foi monitorizada durante 7 a 10 minutos em HBST tampão de corrida (HEPES a 0,01 M de pH 7,4, NaCl a 0,15 M, EDTA a 3 mM, 0,05% v/v de tensoativo P20). As experiências foram realizadas a 25°C. A associação cinética (k_a) e de dissociação (k_d) foram determinadas as constantes de velocidade de processamento e ajustando os dados a um modelo de ligação 1:1 utilizando software de ajuste de curva purificador 2.0c. As constantes de dissociação de equilíbrio (KD) de ligação e semivida de dissociação ($t_{1/2}$) foram então calculadas a partir das constantes de velocidade cinéticas como: $KD (M) = k_d/k_a$ e $t_{1/2} (min) = [\ln 2 / (60 * KD)]$.

[00193] Em uma experiência inicial, as constantes de equilíbrio de dissociação de ligação e semividas de dissociação foram determinadas durante 22 sobrenadantes de hibridoma (descrito no Exemplo 2).

[00194] Em experiências subsequentes, os anticorpos purificados foram testados quanto à ligação a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV, utilizando o ensaio de ressonância plasmônica de superfície descrito acima.

Tabela 4

Cinéticos de Ligação @ 25°C						
mAb Capturado	Nível de captura de mAb (RU)	100nM de ligação Ag (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	KD (M)	$t_{1/2}$ (min)
H2aM15281N	223 ± 0,8	127	2,10E+06	8,18E-04	3,90E-10	14
H1M15289N	224 ± 1,5	88	2,10E+05	4,41E-05	2,10E-10	262
H1M15267N	173 ± 0,7	109	8,43E+05	1,53E-04	1,81E-10	75
H2aM15272N	229 ± 1,1	120	1,65E+06	7,33E-04	4,43E-10	16
H2aM15279N	195 ± 0,7	127	8,70E+05	8,91E-05	1,02E-10	130
H2aM15278N	230 ± 1	118	1,72E+06	8,73E-04	5,06E-10	13
H2aM15268N	174 ± 0,6	121	2,68E+06	9,50E-04	3,55E-10	12
H2aM15270N	182 ± 0,7	107	7,79E+05	6,05E-04	7,76E-10	19
H1M15277N	211 ± 1	150	2,63E+06	9,10E-04	3,46E-10	13
H2bM15292N	185 ± 1,2	95	4,57E+05	1,55E-04	3,40E-10	75
H2aM15271N	227 ± 1,4	112	9,08E+05	1,24E-03	1,37E-09	9
H1M15269N	268 ± 2,8	83	1,76E+05	1,08E-04	6,16E-10	107
H1M15290N	210 ± 1,9	108	4,82E+05	2,11E-04	4,38E-10	55
H1M15293N	187 ± 0,9	91	6,04E+05	1,98E-04	3,28E-10	58
H2bM15291N	179 ± 1,8	83	2,52E+05	1,41E-04	5,59E-10	82

Cinéticos de Ligação @ 25°C						
mAb Capturado	Nível de captura de mAb (RU)	100nM de ligação Ag (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (min)
H1M15288N	149 ± 1	55	1,73E+05	7,16E-04	4,15E-09	16
H2aM15287N	186 ± 1,9	50	6,33E+04	4,42E-04	6,98E-09	26
H1M15280N	168 ± 0,8	56	2,83E+05	5,25E-03	1,85E-08	2,2
H1H15233P2	250 ± 13,2	141	1,99E+05	4,56E-05	2,29E-10	253
H1H15231P2	228 ± 3,8	154	6,39E+05	7,44E-05	1,16E-10	155
H1H15188P	189 ± 1,4	158	1,48E+06	1,22E-04	8,25E-11	95
H1H15211P	226 ± 1,1	180	1,13E+06	8,72E-05	7,75E-11	133
H1H15249P2	195 ± 1,2	99	3,49E+05	7,91E-05	2,27E-10	146
H1H15260P2	242 ± 2	164	1,16E+06	1,60E-04	1,38E-10	72
H1H15203P	128 ± 1,4	100	4,43E+05	1,21E-04	2,73E-10	95
H1H15237P2	171 ± 2,2	131	4,39E+05	1,20E-04	2,74E-10	96
H1H15264P2	110 ± 2,9	66	2,23E+05	1,86E-04	8,33E-10	62
H1H15228P2	144 ± 4,3	113	4,43E+05	1,85E-04	4,18E-10	63
H1H15208P	114 ± 4,3	98	4,39E+05	2,43E-04	5,53E-10	48
H1H15177P	135 ± 1,3	105	4,93E+05	1,92E-04	3,90E-10	60
H1H15253P2	127 ± 1,7	94	3,56E+05	1,24E-04	3,48E-10	93
H1H15215P	171 ± 1	86	1,44E+05	9,67E-05	6,71E-10	119
H1H15259P2	234 ± 2,1	142	2,26E+05	3,77E-04	1,67E-09	31

Tabela 5

Cinéticos de Ligação @ 37°C						
mAb Capturado	Nível de captura de mAb (RU)	100nM de Ag (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (min)
H2aM15281N	276 ± 1,6	140	2,55E+06	5,43E-04	2,13E-10	21
H1M15289N	271 ± 2,2	119	4,59E+05	1,26E-04	2,75E-10	92
H1M15267N	202 ± 1,1	132	2,37E+06	7,45E-04	3,14E-10	16
H2aM15272N	284 ± 1,9	135	2,00E+06	6,34E-04	3,16E-10	18
H2aM15279N	229 ± 1	150	1,39E+06	4,45E-04	3,20E-10	26
H2aM15278N	266 ± 1,1	127	2,17E+06	1,13E-03	5,19E-10	10
H2aM15268N	208 ± 1,1	126	3,75E+06	2,02E-03	5,37E-10	6
H2aM15270N	219 ± 0,8	128	1,75E+06	1,14E-03	6,51E-10	10
H1M15277N	246 ± 1,1	156	3,24E+06	2,18E-03	6,71E-10	5
H2bM15292N	242 ± 0,6	117	5,44E+05	5,24E-04	9,63E-10	22
H2aM15271N	276 ± 1,5	117	1,45E+06	1,45E-03	1,00E-09	8
H1M15269N	319 ± 1,7	107	2,54E+05	3,39E-04	1,34E-09	34
H1M15290N	243 ± 1,8	117	6,66E+05	9,84E-04	1,48E-09	12
H1M15293N	213 ± 1,7	112	5,12E+05	8,53E-04	1,66E-09	14
H2bM15291N	229 ± 1,7	97	3,42E+05	6,40E-04	1,87E-09	18
H1M15288N	176 ± 1	69	2,73E+05	2,08E-03	7,61E-09	6
H2aM15287N	228 ± 1,4	61	1,74E+05	1,89E-03	1,09E-08	6
H1M15280N	196 ± 1	59	4,97E+05	6,57E-03	1,32E-08	1,8
H1H15233P2	317 ± 6,9	184	3,74E+05	4,74E-05	1,27E-10	244
H1H15231P2	306 ± 4,3	228	6,59E+05	9,19E-05	1,39E-10	126
H1H15188P	267 ± 1,6	217	1,59E+06	2,65E-04	1,67E-10	44
H1H15211P	305 ± 2,7	232	8,27E+05	1,60E-04	1,94E-10	72

Cinéticos de Ligação @ 37°C						
mAb Capturado	Nível de captura de mAb (RU)	100nM de Ag (RU)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	t½ (min)
H1H15249P2	260 ± 2,3	157	4,42E+05	1,27E-04	2,88E-10	91
H1H15260P2	322 ± 2,5	220	1,05E+06	5,47E-04	5,19E-10	21
H1H15203P	179 ± 1,2	106	5,01E+05	3,23E-04	6,45E-10	36
H1H15237P2	218 ± 1,4	181	5,14E+05	4,09E-04	7,97E-10	28
H1H15264P2	149 ± 2,1	106	5,07E+05	4,75E-04	9,36E-10	24
H1H15228P2	188 ± 2	157	4,76E+05	4,64E-04	9,75E-10	25
H1H15208P	151 ± 3,6	145	5,25E+05	5,31E-04	1,01E-09	22
H1H15177P	181 ± 1,5	149	5,68E+05	7,01E-04	1,23E-09	16
H1H15253P2	172 ± 0,7	139	4,36E+05	6,29E-04	1,44E-09	18
H1H15215P	224 ± 2,1	96	1,38E+05	2,33E-04	1,68E-09	50
H1H15259P2	282 ± 3,8	173	4,78E+05	8,88E-04	1,86E-09	13

[00195] Como se mostra nas Tabelas 4 e 5, os anticorpos ligados a proteína de superfície "spike" de MERS-CoV, com valores que variam de KD para 77,5pM a 18,5nM a 25°C e de 127pM a 13,2nM a 37°C. Os anticorpos apresentaram valores dissociativos de meia-vida (t½), variando de 2,2 a 262 minutos a 25 ° C e de 1,8 a 244 minutos a 37°C.

Exemplo 5 : Neutralização mediada por anticorpos da infecciosidade de MERS

Materiais e métodos

Geração de Pseudopartículas

[00196] As pseudopartículas MERS (MERSpp, também chamadas como partícula semelhante a vírus - VLP) foram geradas por células 293T de cotransfecção com uma mistura de constructos de plasmídeos que expressam pico de proteína de MERS, gag-pol de HIV, e um vetor que codifica proviral de VIH para a luciferase de pirilampo. Os sobrenadantes contendo MERSpp foram colhidos às 72 horas pós transfecção, utilizando a centrifugação clarificada, concentrada, dividida em alíquotas e congeladas a -80°C. As pseudo-partículas de controle foram geradas através da substituição do plasmídeo expressando o pico de proteína MERS-CoV com um plasmídeo que codifica para o vírus da estomatite vesicular e glicoproteína (VSVg).

Ensaio à base de MERSpp

[00197] As diluições de anticorpos foram incubadas com MERSpp durante 1 h à temperatura ambiente. As células Huh7 em meio DMEM completo foram descoladas utilizando 1% de EDTA, lavadas e incubadas com as misturas anticorpo/MERSpp durante 72 h. A eficiência de infecção foi quantificada por meio da detecção de luciferase com o ensaio de luciferase BrightGlo® (Promega, San Luis Obispo, CA, EUA) e lidas em um leitor de placa Victor® X3 (Perkin Elmer, Waltham, MA, EUA) para a produção de luz.

Ensaio à base de vírus

[00198] As células 1×10^4 Vero E6 por cavidade foram semeadas em placas de 96 cavidades um dia antes da experiência. 500 TCID₅₀ de cepa MERS-CoV EMC/2012 foi misturado com a quantidade indicada de anticorpo em meio de crescimento normais 100 uL Vero E6 e incubou-se à temperatura ambiente durante 30 minutos e a mistura foi então adicionada às células Vero E6. Aos 2 dias após a infecção, a morte celular foi avaliada utilizando o Ensaio de Viabilidade celular luminescente CellTiter-Glo® (Promega) de acordo com as instruções dos fabricantes. A luminescência foi lida em um leitor de placas Spectramax M (Molecular Devices). Os dados foram expressos como a porcentagem de controles falsamente infectada.

Resultados

Neutralização de MERS-CoV por anticorpos anti-MERS-CoV-S

[00199] Em uma experiência inicial, os anticorpos anti-MERS-CoV-S derivados de hibridomas independentes separados foram testados quanto à neutralização de infectividade de Mers. Como mostrado na Figura 1, os anticorpos de hibridoma de células de 12 de 22 anti-MERS anti-CoV-S inibiram ou neutralizaram mais do que 90% de infectuosidade de Mers e com IC₅₀ variando de 68,4pM para 3,58nM.

[00200] Em experiências posteriores, os anticorpos purificados foram testados para neutralização de MERSpp e vírus MERS vivo (Iso-

lado: EMC/2012). Os resultados são apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Tabela 6

Anticorpo	IC50 contra MERSpp (M)	IC50 contra o vírus vivo (EMC2012) (M)
H1M15277N	6,46E-11	2,87E-10
H2aM15279N	9,39E-11	8,25E-10
H1M15280N	1,11E-10	7,63E-10
H2aM15278N	1,42E-10	6,44E-10
H2aM15271N	1,27E-10	1,03E-09
H1M15267N	9,98E-11	8,91E-10
H2bM15292N	1,13E-10	2,26E-09
H2bM15291N	1,86E-10	2,22E-09
H1M15290N	2,10E-10	2,55E-09
H1M15293N	2,58E-10	2,58E-09
H1M15289N	2,81E-10	3,15E-09
H1M15269N	6,88E-10	6,80E-09
H2aM15287N	2,93E-09	8,92E-09
H1M15288N	-0,1209	2,66E-08
H2aM15268N	5,89E-11	2,72E-10
H2aM15270N	1,02E-10	7,11E-10
H2aM15281N	7,85E-11	2,92E-10
H2aM15272N	7,23E-11	5,69E-10

Tabela 7

Anticorpo	IC50 contra MERSpp (M)	IC50 contra vírus vivo (EMC2012) (M)
H1H15211P	4,74E-11	3,69E-10
H1H15188P	6,20E-11	5,05E-10
H1H15177P	4,57E-11	6,29E-10
H1H15203P	7,65E-11	8,26E-10
H1H15228P2	9,75E-11	8,98E-10
H1H15231P2	1,02E-10	9,20E-10
H1H15237P2	6,60E-11	1,01E-09
H1H15233P2	8,73E-11	1,37E-09
H1H15259P2	7,64E-11	1,63E-09
H1H15264P2	1,34E-10	2,39E-09
H1H15208P	8,27E-11	2,41E-09
H1H15253P2	1,51E-10	2,42E-09

Anticorpo	IC50 contra MERSpp (M)	IC50 contra vírus vivo (EMC2012) (M)
H1H15215P	1,92E-10	2,67E-09
H1H15260P2	6,43E-11	6,70E-09
H1H15249P2	2,27E-10	1,20E-08
H4sH15188P	2,91E-11	NA
H4sH15211P	6,08E-11	NA
H4sH15260P2	6,24E-11	NA
H4sH15231P2	7,33E-11	NA

[00201] Os dados acima sugerem que os anticorpos anti-MERS-CoV-S da presente invenção bloqueiam potentemente a entrada de MERS-CoV em células sensíveis e neutralizam a infectividade.

Neutralização de isolados clínicos por anticorpos anti-MERS-CoV-S

[00202] Os vírus de RNA codificam a baixa fidelidade da maquinaria de replicação do genoma, o que lhes permite adaptar-se rapidamente ao seu ambiente de acolhimento (Malpica *et al.*, 2002; Genetics 162: 1505 a1511). No entanto, os coronavírus, tais como MERS-CoV, codificam para uma proteína não estrutural com uma atividade de ribonuclease exo-3'-para-5', que proporciona uma função à prova de leitura durante a sua replicação e aumenta consideravelmente a capacidade de codificação do genoma sem levar a catástrofe mutacional (Cotton *et al.*, 2013; Lancet doi: 10,1016/S0140-6736 (13) 61887-5). Apesar disso, o sequenciamento de múltiplos isolados clínicos incluídos na amostra durante os dois primeiros anos da epidemia MERS-CoV revelaram que a proteína MERS-CoV S do vírus está evoluindo (Cotton *et al.*, 2014; MBio 5 doi: 10,1128/mBio.01062-13). Para este estudo, 38 sequências depositadas NCBI dos isolados clínicos MERS-CoV foram alinhadas e comparadas com a sequência da primeira cepa isolada, EMC/2012. Com base no desenho do ensaio de rastreio, eram esperados que os anticorpos da presente invenção viessem a se ligar no RBD da proteína MERS-CoV S, de modo que a comparação das sequências especificamente voltaram para os aminoácidos 367-606. Se-

te aminoácidos diferentes foram identificados que diferem entre os isolados clínicos sequenciados e a sequência protótipa EMC/2012, A431P, S457G, S460F, A482V, L506F, D509G e V534A (Tabela 8).

Tabela 8

Mudança de aminoácido	Isolado
A431P	Riyadh_9
S457G	KFU-HKU 1; KFU-HKU 13
S469F	Qatar3; Qatar4
A482V	Riyadh_9
L506F	England 1; England-Qatar/2012
D509G	Bisha_1; Riyadh_1
V534A	Riyadh_2

[00203] Para testar a capacidade dos anticorpos para se ligarem a regiões conservadas dentro do RBD e neutralizar todos os isolados clínicos MERS-CoV sequenciados como de Julho de 2014, a mutagênese dirigida ao local foi utilizada para criar os constructos de plasmídeo que codificam para todas as variantes da proteína S. Estes foram usados para gerar MERSpp pseudotipado com as proteínas S modificadas e ensaios de neutralização realizados. Os anticorpos purificados (descrito no Exemplo 1) foram testados quanto à neutralização de infectividade de Mers utilizando MERSpp gerado com as mutações acima mencionadas. As Tabelas 9 e 10 mostram a porcentagem de neutralização de variantes MERSpp.

Tabela 9

Variante RBD	peso	A431P	S457G	S460F	A482V	L506F	D509G
Anticorpo µg/mL	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
H1M15267N	71,65%	68,15%	70,81%	76,82%	66,78%	57,11%	84,91%
H1M15269N	7,19%	11,87%	27,48%	19,57%	7,74%	21,09%	7,08%
H1M15280N	56,69%	59,42%	74,42%	73,14%	65,89%	65,90%	38,21%
H1M15277N	75,83%	89,05%	90,07%	89,35%	75,14%	83,27%	62,26%
H2aM15268N	79,86%	89,51%	93,08%	89,11%	83,50%	88,63%	87,74%
H2aM15270N	63,45%	81,24%	81,64%	80,51%	67,96%	79,63%	45,28%
H2aM15271N	53,38%	63,32%	67,50%	65,52%	52,90%	4,79%	38,21%

Variante RBD	peso	A431P	S457G	S460F	A482V	L506F	D509G
Anticorpo µg/mL	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
H2aM15272N	62,88%	72,97%	78,34%	80,51%	58,90%	16,58%	7,08%
H2aM15281N	78,99%	85,38%	86,76%	83,70%	73,96%	17,87%	19,81%
H2aM15279N	48,92%	68,84%	69,91%	65,27%	55,36%	71,27%	53,77%
H2aM15278N	50,50%	65,39%	70,81%	73,87%	48,97%	56,25%	-29,72%
H1M15288N	1,29%	11,64%	20,86%	26,45%	23,68%	8,22%	-2,83%
H1M15289N	43,74%	44,26%	45,54%	51,27%	36,86%	42,32%	28,30%
H1M15290N	36,55%	39,20%	43,73%	48,08%	22,89%	-0,14%	-39,62%
H1M15293N	27,91%	29,10%	34,40%	40,21%	20,33%	1,57%	-15,57%
H2aM15287N	11,65%	5,90%	12,14%	15,15%	19,06%	15,30%	-1,42%
H2bM15291N	45,90%	38,74%	50,05%	49,80%	28,30%	-3,57%	18,40%
H2bM15292N	42,01%	41,04%	49,45%	51,02%	40,21%	14,87%	-16,98%
Controle do Isotipo (mIgG1)	-0,14%	10,03%	-3,81%	1,39%	-5,25%	2,64%	-24,06%
Controle do Isotipo (mIgG2a)	5,32%	-1,00%	7,32%	8,76%	10,30%	5,65%	-26,89%
Controle do Isotipo (mIgG2b)	0,43%	-5,13%	26,88%	5,08%	13,35%	6,08%	-4,25%
H1H15211P	87,77%	90,20%	93,98%	93,78%	88,82%	91,85%	80,66%
H4sH15211P	91,65%	95,02%	98,80%	91,81%	95,41%	96,35%	67,92%
Controle do Isotipo (hIgG1)	11,80%	10,26%	-11,63%	3,60%	15,61%	6,08%	-8,49%
Controle do Isotipo (hIgG4)	-4,60%	-0,54%	-0,50%	-0,33%	13,84%	-5,50%	8,49%

Tabela 10

Variante RBD	peso	A431P	S457G	S460F	A482V	L506F	D509G
Ab ID µg/mL	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
H4sH15188P	81,6%	89,7%	95,7%	92,6%	74,2%	93,6%	101,4%
H4sH15211P	77,1%	91,6%	88,1%	86,0%	73,8%	88,2%	57,2%
H4sH15231P2	70,6%	72,3%	74,5%	75,7%	70,5%	80,6%	60,0%
H4sH15260P2	73,3%	82,8%	77,7%	74,8%	79,0%	73,3%	73,8%
H1H15177P	82,8%	83,2%	84,4%	84,5%	75,9%	90,9%	35,2%
H1H15188P	81,4%	88,9%	86,8%	85,5%	86,4%	92,4%	90,3%
H1H15203P	61,0%	80,5%	74,5%	74,0%	74,0%	61,3%	35,2%
H1H15208P	53,9%	79,3%	73,8%	77,7%	65,2%	76,5%	82,1%
H1H15211P	77,8%	87,3%	93,5%	94,6%	80,2%	82,6%	79,3%
H1H15215P	20,2%	43,0%	42,4%	44,0%	41,7%	15,8%	-47,6%
H1H15228P2	47,8%	64,1%	68,4%	57,4%	63,1%	74,8%	62,8%
H1H15231P2	48,1%	60,6%	71,4%	55,7%	60,0%	55,2%	46,2%
H1H15233P2	55,4%	66,8%	69,7%	59,9%	65,0%	50,8%	65,5%

Variante RBD	peso	A431P	S457G	S460F	A482V	L506F	D509G
Ab ID $\mu\text{g/mL}$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
H1H15237P2	52,6%	74,4%	82,7%	73,5%	70,5%	73,8%	79,3%
H1H15249P2	15,6%	34,6%	19,8%	34,2%	37,2%	30,7%	29,7%
H1H15253P2	52,9%	66,4%	56,0%	57,7%	58,2%	56,9%	51,7%
H1H15259P2	61,2%	79,3%	77,1%	63,8%	68,1%	73,0%	79,3%
H1H15260P2	68,8%	85,6%	74,5%	86,7%	80,4%	82,1%	54,5%
H1H15264P2	23,1%	55,5%	52,3%	52,3%	40,1%	47,4%	-20,0%
Controle do Isotipo (hIgG1)	-38,0%	-0,3%	1,6%	-36,9%	0,8%	-16,9%	15,9%
Controle do Isotipo (hIgG4)	-19,9%	1,1%	-4,5%	-8,1%	6,7%	-7,4%	15,9%
H1M15277N	35,2%	86,7%	83,1%	65,0%	75,1%	73,0%	71,0%
Controle do Isotipo (mIgG1)	-8,8%	2,6%	-3,6%	3,7%	0,2%	-9,6%	26,9%

[00204] Estes dados sugerem que os anticorpos da presente invenção ligam-se a regiões da proteína de superfície "spike" de MERS-CoV que são conservados durante a evolução natural do vírus.

Os anticorpos anti-MERS-CoV-S das invenções são neutralizadores mais eficazes do que anticorpos anti-MERS-CoV isolados anteriormente

[00205] A potência dos anticorpos selecionados da presente invenção foi comparada com os anticorpos monoclonais anteriormente isolados. Três grupos foram usados em métodos de isolamento de anticorpos in vitro, ou seja, exibição de fagos (Tang *et al.*, 2014, PNAS doi: 10.1073/pnas.1402074111, e Ying *et al.*, 2014, J. Virol doi: 10.1128/JVI.00912-14) e display de leveduras (Jiang *et al.*, 2014, Sci Transl Med doi: 10.1126/scitranslmed.3008140), para selecionar para pesquisa de anticorpos que se ligam a proteínas MERS-CoV S e entrada de vírus em bloco. Para este estudo, foi selecionado um painel de três anticorpos com sequências de domínio variável publicados os quais foram relatados para neutralizar MERS-CoV e ligam-se a diferentes epítomos. As sequências de anticorpos 3B12 (Tang *et al.*, 2014, PNAS doi: 10.1073/pnas.1402074111), Mers-4 e Mers-27 (Jiang *et al.*, 2014, Sci Transl Med doi: 10.1126/scitranslmed.3008140) foram clonadas em domínios constantes de IgG1 humana, em seguida, expres-

sas e purificadas de forma semelhante aos anticorpos selecionados da presente invenção. A eficácia de neutralização de todos os anticorpos foi testada utilizando as Pseudopartículas geradas com a sequência de EMC/2012 protótipo e todos os isolados clínicos descritos acima.

[00206] O IC50 de neutralização de anticorpos selecionados contra MERSpp variantes é mostrado na Tabela 11. Como pode ser visto na Tabela 11, H1H15211P foi capaz de neutralizar todos os isolados com valores de IC50 variando de 1,3E-11M para 6,5E-11M. Valores semelhantes foram também observados para H1H15277N, com a exceção da variante V534A, que exibiu uma resistência parcial para o anticorpo. Vale a pena notar, no entanto, que esta mudança de aminoácido foi observada somente em um único isolado MERS-CoV (Riyadh_2), que foi isolado em 2012 e faz parte de um ramo morto da árvore evolutiva MERS-CoV.

[00207] H1H15211P e H1H277N neutralizam MERSpp com valores de IC50, pelo menos, um registro mais baixo do que o anticorpo de comparação mais potente, MERS-4. Além disso, tanto 3B12 e Mers-27 parecem ligar-se aos locais menos conservados na proteína MERS-CoV S, como Pseudopartículas com sequências de vários isolados clínicos não pode ser neutralizada com estes anticorpos.

Tabela 11

	H1H15177P	H1H15188P	H1H15211P	H1H15277N	H1H15267N2	3B12	MERS-4	MERS-27
peso	5,374E-11	4,819E-11	6,525E-11	6,978E-11	7,621E-11	1,69E-09	3,90E-10	8,36E-09
A431P	1,924E-11	1,323E-11	2,15E-11	3,162E-11	4,877E-11	6,35E-10	2,02E-10	4,50E-09
S457G	3,022E-11	1,99E-11	2,578E-11	3,532E-11	4,973E-11	7,43E-10	2,81E-10	5,06E-09
S460F	2,435E-11	1,49E-11	2,031E-11	3,19E-11	6,805E-11	6,69E-10	3,14E-10	6,36E-09
A482V	2,044E-11	1,955E-11	2,735E-11	8,094E-11	6,533E-11	9,58E-10	6,83E-10	1,26E-08
L506F	1,624E-11	1,017E-11	1,341E-11	3,967E-11	3,537E-11	~0,001534	5,64E-10	6,64E-09
D509G	1,792E-10	1,682E-11	4,036E-11	4,322E-11	4,846E-11	1,17E-07	1,37E-09	4,57E-09
V534A	3,663E-11	2,034E-11	3,195E-11	7,064E-09	4,317E-10	5,63E-08	2,19E-10	1,31E-07

[00208] Estes dados sugerem que os anticorpos da presente invenção são capazes de neutralizar uma gama mais ampla de MERS-CoV isolados com potência melhorada em comparação com vários anticorpos isolados exclusivamente com base nas propriedades bioquímicas in vitro.

Exemplo 6: Octeto de competição cruzada entre os anticorpos anti-MERS-CoV-S

[00209] A competição de ligação entre os anticorpos MERS-CoV S foi determinada utilizando um ensaio de interferometria de biocamada livre de rotulagem em tempo real em um biossensor Octet® RED96 (Pall ForteBio Corp). Toda a experiência foi realizada a 25 ° C em tampão de octeto HBS-P (HEPES a 10 mM, NaCl a 150 mM, e 0,05% v/v Tensoativo de Tween-20, pH 7,4, 1 mg/mL de BSA) com a placa de agitação à velocidade de 1000 rpm. Para avaliar se os anticorpos são capazes de competir um com o outro para a ligação aos seus respectivos epítomos em um MERS expresso recombinantemente do pico do receptor de proteína de domínio fundido com uma etiqueta de Fc humana de ligação (MERS RBD-hFc; SEQ ID: 458), um formato de ensaio de pré-mistura foi adotado e 50 nM de MERS-CoV-RBD-mFc foi pré-incubado com 500 nM do anticorpo anti-MERS monoclonal diferente (posteriormente referido como o mAb-2) durante pelo menos 2 horas antes de realizar o ensaio de competição de ligação. Um anticorpo monoclonal não específico foi incubado com MERS-RBS.mFc como um controle de isotipo. Os biossensores de octeto revestidos com um anticorpo policlonal anti-hFc (Pall Corp. ForteBio, Cat # 18-5060) foram primeiro submergidos em cavidades contendo uma solução de 50 µg/mL durante 4 minutos para capturar em torno de 2 nm de anticorpo anti-Mers (posteriormente referido como o mAb -1). Seguindo a etapa de captura, os anticorpos policlonais anti-hFc desocupados foram, em seguida, saturados, submergindo os biossensores octeto nas cavida-

des contendo o anticorpo monoclonal 100 µg/mL de anticorpo não específico totalmente humano. Finalmente, os biossensores foram imersos durante 4 minutos, em cavidades contendo as amostras pré-misturadas de 50 nM de Mers-RBD-MFC e 500 nM de mAb-2. Os biossensores foram lavados em tampão HBS-P de Octeto entre cada etapa do ensaio. Mediu-se a resposta em tempo real de ligação a qual foi monitorizada durante o curso da experiência e a resposta de ligação, no final de cada etapa. A resposta de mAb-1 se liga ao complexo de pré-MERS-RBD-MFC e mAb-2 foi comparada e determinou-se o comportamento competitivo/não competitivo de anticorpos monoclonais diferentes anti-MERS.

[00210] Sob as condições experimentais utilizadas neste exemplo, a competição cruzada (isto é, a competição entre anticorpos em ambas as orientações) foi observada, por exemplo, por: (a) H2aM15281N, H1M15290N, H1M15293N, e H2bM15291N; (B) H2aM15272N, H2bM15292N, e H2aM15271N; e (c) H2aM15268N, H1M15267N, H2M15279N, H1M15289N, e H1M15277N (Figura 2).

[00211] Em uma outra experiência, foi determinada a concorrência de ligação entre os anticorpos selecionados isolados diretamente a partir de células B de camundongo de antígeno-positivo (descrito no Exemplo 1). Sob as condições experimentais utilizadas neste exemplo, a competição cruzada (isto é, a competição entre anticorpos em ambas as orientações) foi observada, por exemplo, por: (a) H1H15215P, H1H15177P, H1H15203P e H1H15211P; (B) H1H15188P, H1H15208P, H1H15228P2, H1H15233P2, H1H15237P2, H1H15253P2, e H1H15259P2; e (c) H1H15231P2, H1H15249P2, H1H15260P2, e H1H15264P2 (Figura 3).

[00212] Em uma outra experiência, a ligação competitiva entre dois anticorpos H1H15211P e H1H15277N foi monitorizada.

Tabela 12

mAb1	Nível de captura de mAb1 (nm)	Ligação de pré-complexo de mAb2 e MERS-RBD-mFc para mAb1 capturado			
		H1H15277N	H1H15211P	mAb de controle do isotipo	Nenhum mAb
H1H15277N	2,19	0,22	0,55	1,03	0,96
H1H15211P	2,08	0,68	0,22	0,73	0,69

[00213] A Tabela 12 mostra que os dois anticorpos não inibem uns aos outros e que a ligação de um anticorpo a MERS-CoV RBD ainda permite a ligação do segundo anticorpo. Estes dados sugerem que os dois anticorpos se ligam a epítomos distintos, não sobrepostos. A mutação de um epítomo como um resultado da pressão seletiva por um anticorpo não deve afetar a ligação de um outro.

Exemplo 7: eficácia *in vivo* de anticorpos anti-MERS-CoV-S

Materiais e métodos

Geração de camundongos nocauteados de DPP4 humano

[00214] Uma vez que a proteína de superfície "spike" MERS não interage com DPP4 camundongo, um modelo de infecção humanizado MERS-CoV foi gerado utilizando a tecnologia VelociGene® (Valenzuela *et al.*, 2003, Nat Biotechnol 21: 652 a 659). Resumidamente, um vetor recombinante grande (VGACE) foi construído de modo a conter 82 kb de DPP4 humano de DNA genômico a partir de éxons 2-26, incluindo UTR 3' para substituir 79 kb da sequência de DPP4 camundongo homólogo. BAC RP11-68L22 humana e BAC RP23-362N15 de camundongo contendo o gene DPP4 foram identificados utilizando a explosão e a sequência confirmada usando sequenciador MiSeq de banco Illumina de topo. O VGACE foi eletroporado em células ES de híbrido F1 (129S6SvEvTac/C57BL6NTac). As colônias resistentes a G418 foram colhidas 10 dias após a eletroporação e rastreadas para direcionamento correto pelo ensaio de perda de alelo. O método utilizado foi VelociMouse® (Poueymirou, *et al.*, 2007; Nature Biotechnology 25: 91 a 99), em que as células ES alvo foram injetadas em embriões Swiss Webster de

fase de 8 células não compactadas, para produzir camundongos de geração F0 totalmente derivados de células ES completas portadores do alelo do gene humano DPP4. Todos os procedimentos com animais foram realizados em estrita conformidade com as recomendações do Guia para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do NIH. O protocolo foi aprovado pela Regeneron Pharmaceuticals Animal Care Institutional and Use Committee (IACUC). O método é descrito em detalhe no Pedido de Patente US No: 62/051,626, depositado em 17 de Setembro de 2014, incorporado na presente invenção na sua totalidade. Os camundongos transgênicos também foram gerados por meio da inserção aleatória do gene hDPP4 no genoma do camundongo.

Experimentação Animal

[00215] Seis camundongos DPP4 humanizados de oito semanas de idade foram injetados por via intraperitoneal (i.p.) com quantidades indicadas de anticorpo ou solução salina esterilizada como um controle com 1 dia de pré-infecção ou 1 dia após a infecção, dependendo da experiência. Antes da inoculação intranasal, os camundongos foram anestesiados por injeção intraperitoneal usando uma mistura de xilazina (0,38mg/camundongo; laboratórios Lloyd) e cetamina (1,3 mg/camundongo; Henry Schein saúde animal), diluído em PBS para perfazer um volume total de 50 uL por camundongo. Uma vez anestesiados, os camundongos foram inoculados com PBS de forma intranasal ou pfu 2×10^5 de MERS-CoV (Jordânia) diluído em PBS para uma inóculo total de 50 L. Durante a experiência, os camundongos foram pesados antes da infecção e todos os dias da experiência para avaliar a perda de peso induzida por MERS-CoV. Os camundongos foram sacrificados no pós-infecção dia 2 ou dia 4, utilizando uma dose letal de isofluorano (Butler Fornecimento de Saúde Animal). Os pulmões foram retirados para análise posterior da replicação MERS-CoV e patologia.

Análise de RNA de MERS-CoV

[00216] O RNA foi extraído a partir de pulmão do camundongo por homogeneização em 1 ml de Trizol® (Life Technologies Inc) usando um Magnalyzer (Roche) segundo as instruções do fabricante. Níveis de MERS-CoV ARN foram avaliados utilizando o vírus rápido de uma só etapa do master mix Taqman® (Applied Biosystems) de acordo com as instruções dos fabricantes, utilizando um duplex de iniciadores obtidos a partir de Life Technologies destinadas a uma região do genoma a montante do gene do envelope (UPE); a sequência líder do RNA mensageiro de nucleocapsídeo (líder primário) e comparada com camundongos 18S rRNA (controle endógeno). As reações de qPCR em rápidas placas de reação ópticos Microamp® (Applied Biosystems) foram lidas em um instrumento 7500 rápido DX-PCR em tempo real (Applied Biosystems) e os dados foram analisados utilizando o método Ct delta, com um controle não infectado definido para 1. A porcentagem de MERS-Cov de RN detectada foi expressa em relação aos níveis de RNA detectados em camundongos infectados tratados com anticorpos de controle do mesmo isotipo.

Ensaio de placa para os títulos de MERS-CoV

[00217] O camundongo do pulmão foi homogeneizado em 1 ml de PBS com contas de vidro durante 60 segundos a 6000 rpm utilizando um Magnalyzer (Roche). O homogeneizado foi então centrifugado durante 10 minutos a 10000 rpm e o sobrenadante analisado por ensaio de placa em células Vero E6 para quantificar os níveis de vírus remanescentes após o tratamento. Os ensaios de placa foram realizados como anteriormente descrito, exceto que as placas foram deixadas durante 3 dias para as placas aparecerem.

Análise histológica

[00218] As lâminas histológicas foram preparadas a partir de seções de 5 µms de tecidos fixos embebidos em parafina e corados com hematoxilina e eosina. Os campos foram examinados por microscopia de luz

e analisados. Os graus de inflamação intersticial, peribronquiolar e perivascular foram pontuados de 0 a 5. Para cada grupo experimental, as lâminas foram cegas e pontuadas de 0 a 5 e tabulados para comparar as cepas, pontos de tempo e tratamentos. Outras características histológicas, tais como a presença de epitélio bronquiolar e dano alveolar, alterações pleurais e a extensão da inflamação peribroncovasculares, também foram observadas para cada grupo no texto. As pontuações globais inflamatórias para cada camundongo foram calculadas para cada grupo, e apresentadas como contagens médias de todos os camundongos em cada grupo e ponto de tempo.

Resultados

Camundongos humanizados para DPP4 são suscetíveis à infecção MERS-CoV

[00219] Ensaios in vivo de moléculas antivirais requerem um modelo animal de pequeno porte que é suscetível à infecção MERS-CoV. Os camundongos não são suscetíveis à infecção MERS-CoV. A comparação das sequências da sequência de DPP4 de camundongo e humano revelou que os aminoácidos que tenham sido previamente identificados como locais de contato entre a proteína MERS-CoV S e o seu receptor diferem entre as duas espécies. Além disso, a expressão de DPP4 humano em células de camundongo permite a entrada MERSpp e propagação MERS-CoV, indicando que a entrada do vírus é a etapa limitante na infecção de células de camundongo e a falta de interação entre DPP4 de camundongo e os define glicoproteína MERS-CoV o tropismo espécies in vitro.

[00220] Os inventores apresentaram a hipótese de que os camundongos que expressam DPP4 humana em lugar de DPP4 de camundongo seria susceptível a MERS-CoV e permite o teste *in vivo* de agentes terapêuticos anti-MERS-CoV. A tecnologia VelociGene® foi utilizada para substituir o gene de 79kb do camundongo DPP4 com

82kb do seu ortólogo humano. Os camundongos resultantes expressam DPP4 plenamente humana sob o controle dos elementos reguladores do camundongo, para preservar a regulação da expressão e distribuição de tecidos proteína adequada.

[00221] Para testar se camundongos humanizados e camundongos transgênicos poderiam apoiar a infecção MERS-CoV, em um experimento inicial, os camundongos transgênicos foram tratados intraperitonealmente com 200 µg de anticorpos anti-MERS-CoV-S ou isotipo controle no dia -1 e infectados por via intranasal com MERS-CoV (~ 10⁶ pfu de EMC2012) no dia 0. Quatro dias após a infecção, os pulmões foram recolhidos e os níveis de RNA do vírus foi medido por RT-PCR para verificar o efeito dos anticorpos na carga viral. A Tabela 13 mostra os níveis médios de RNA genômico viral e o RNA replicativo expresso como porcentagem de controles de isotipo. O tratamento com H1H15211P resultou na redução de cerca de 500 vezes do RNA viral nos camundongos infectados.

Tabela 13

Anticorpo	RNA genômico	RNA de replicação (líder)
H1H15177P	0,356839562	0,273565089
H1H15211P	0,254493202	0,206006238
H4sH15211P	1,989548316	1,112094283
controle do Isotipo IgG1	104,0889287	101,2578723
controle do Isotipo IgG4	100	100

[00222] Em uma outra experiência, camundongos de 6 a 8 semanas de idade DPP4 humanizado (huDPP4) foram inoculados por via intranasal com MERS-CoV. Embora nenhuma mortalidade ou sinais clínicos da doença tenha sido observada até ao dia 4, nos dias 2 e 4 os camundongos pós-inoculação foram sacrificados e os seus pulmões foram dissecados. Para se obter os níveis de RNA do vírus, os pulmões foram homogeneizados em Trizol®, e analisados em tempo real por PCR utilizando os iniciadores específicos para MERS-CoV

(Figuras 4 e 5). Para obter títulos de vírus, os pulmões foram homogeneizados em PBS, clarificados por meio da centrifugação e titulados em células Vero E6 (Figura 6). A replicação de MERS-CoV robustos nos pulmões era evidente aos 2 e 4 dias após a infecção. A quantificação de RNA usando um conjunto de iniciadores específicos para o líder MERS-CoV, que foram projetados para só amplificarem os replicantes de MERS-CoV, demonstraram altos níveis de MERS-CoV replicando o RNA nos pulmões recolhidos no dia 2, e esses níveis foram mantidos até dia 4 pós infecção (Figura 5). O ensaio de placa de homogenato de pulmão de células Vero E6 quantificados de níveis MERS-CoV (Jordan) de $\sim 7,27 \times 10^4$ pfu/g de pulmão no dia 2 e $\sim 3,75 \times 10^5$ pfu/g de pulmão em 4 dias após a infecção (Figura 6), demonstrando a replicação ativa de MERS-CoV nos pulmões dos camundongos huDPP4. Estes dados sugerem que a humanização do receptor de DPP4 usando a tecnologia VelociGene® criou um modelo robusto de MERS-CoV em camundongos que podem ser utilizados para avaliar o tratamento MERS-CoV *in vivo*.

[00223] Os pulmões de camundongos huDPP4 intranasal inoculados com qualquer MERS-CoV (cepa Jordan) ou PBS (simulação infectada) foram analisadas para alterações patológicas. Aos 2 dias após a infecção, a inflamação peri-bronquiolar foi evidente com alterações na estrutura celular bronquiolar encontrada por todo o pulmão. A inflamação perivascular mínima ou efeitos sobre as estruturas alveolares foram observados neste ponto do tempo. Aos 4 dias após a infecção, infiltração intersticial significativa foi observada com bordas peri-vasculares e extenso espessamento alveolar. As alterações bronquiolares ainda estavam presentes também. É importante ressaltar que esta patologia é consistente com os achados radiográficos de desenvolvimento de pneumonia intersticial e doença pulmonar significativa observada em seres humanos com MERS-CoV, sugerindo que este DPP4 humanizado do modelo *in vivo* de

infecção MERS-CoV recapitula as sequelas patológicas que são vistas em MERS-CoV infecção de seres humanos.

[00224] Em outras experiências (vide abaixo), os camundongos infectados foram administrados com uma ou mais doses de anticorpos purificados (tal como descrito no Exemplo 1) ou uma combinação de anticorpos profilaticamente e/ou terapêuticamente para testar a sua eficácia contra a infecção MERS.

H1H15211P e H1H15277N protegem os camundongos humanizados DPP4 de infecção MERS-CoV

[00225] Tendo estabelecido que os camundongos DPP4 humanizados eram susceptíveis à MERS-CoV, este modelo foi utilizado para avaliar a atividade de dois anticorpos monoclonais in vivo. Os camundongos foram injetados i.p. com 200 µg, 20 µg ou 2 µg de qualquer H1H15211P, ou de H1H15277N ou com 200 µg de anticorpo de controle de isotipo hIgG1 24 horas antes da infecção intranasal com 1×10^5 pfu de MERS-CoV (cepa Jordan). Como visto nas Figuras 7 e 8, os dois anticorpos foram capazes de diminuir significativamente MERS-CoV nos níveis de RNA específico nos pulmões por mais de dois registros, no 200 µg por dose de camundongo, em comparação com o anticorpo de controle de isotipo. H1H15211P foi mais eficaz na redução dos níveis de MERS-CoV de RNA com a dose de 20 µg em comparação com H1H15277N na mesma dose. A dosagem de 2 µg de qualquer um dos anticorpos foi ineficaz na redução dos níveis de RNA viral em comparação com os camundongos tratados de controle de isotipo. Quando MERS-CoV título foi analisado nos pulmões (Figura 9), verificou-se que tanto a dose de 200 µg quanto de 20 µg de H1H15211P reduz os níveis de vírus para perto do nível de detecção no ensaio de (2×10^3 pfu/mL). H1H15277N é igualmente eficiente na dose 200 µg como H1H15211P, enquanto que a 20 µg e 2 µg exibe uma inibição dependente da dose de inibição viral. Estes dados sugere-

rem que H1H15211P e H1H15277N podem bloquear, de uma maneira eficaz, a infecção MERS-CoV *in vivo*.

[00226] A análise histológica foi realizada também em pulmões de camundongos tratados 24 horas pré-infecção com H1H15277N, H1H15211P hlgG1 ou anticorpo de controle de isotipo aos 4 dias após a infecção. Os pulmões de camundongos pré-tratados com os anticorpos de controle de isotipo hlgG mostraram patologia pulmonar significativa com o aumento da inflamação intersticial, infiltrados perivasculares, e espessamento de septos alveolares. Os camundongos tratados com 200 µg quer de H1H15277N quanto de H1H15211P tinham reduzido com inflamação mínima dos focos de células inflamatórias no interstício e menor borda bronquiolar. Nos camundongos pré-tratados com 20 µg de H1H15277N e H1H15211P, os níveis moderados de infiltrados perivasculares e inflamação intersticial foram encontrados em comparação com o grupo de anticorpos mais elevados. Em contraste, o grupo de 2 µg de anticorpo pré-tratadas tinham patologia semelhante ao controle de isotipo hlgG1 exibindo a inflamação intersticial significativa e a inflamação perivascular predominante. Cego de pontuação histológica (Figura 10) reflete a pontuação reduzindo a inflamação para camundongos tratados. Estes resultados demonstram que H1H15277N e REGN 3051 conferem uma redução dependente da dose na patologia pulmonar após a infecção MERS-CoV corroborando os níveis de RNA viral e os títulos de vírus determinados para estes camundongos.

[00227] Em conjunto, estes dados indicam que H1H15211P e H1H15277N podem bloquear a infecção MERS-CoV e da doença *in vivo* quando injetados 1 dia antes da infecção. Para o conhecimento dos presentes inventores, H1H15211P e H1H15277N são os primeiros anticorpos totalmente humanos que foram mostrados para exibir eficácia em um modelo *in vivo* da infecção MERS-CoV.

H1H15211P e H1H15277N podem tratar os camundongos DPP4 hu-

manizados infectados com MERS-CoV

[00228] A capacidade de inibir a replicação MERS-CoV e patologia pulmonar após a infecção é uma característica desejada em um potencial terapêutico. Para avaliar se H1H15211P é capaz ter um efeito terapêutico, os camundongos huDPP4 foram infectados com MERS-CoV, e em seguida 24 horas depois injetados i.p. com qualquer 500 µg de hlgG controle de isotipo ou H1H15211P em 500 µg ou 200 µg. Aos 4 dias após a infecção os camundongos foram sacrificados e os pulmões de camundongo foram analisados para o RNA viral, o título do vírus e a patologia pulmonar. Ambos os 500 µg e 200 µg de doses de H1H15211P foram capazes de reduzir os níveis de RNA viral por cerca de 10 vezes nos pulmões de camundongos em comparação com camundongos de controle tratados com anticorpos (Figura 11 e 12). Os títulos pulmonares de camundongos dos mesmos demonstraram uma redução significativa nos níveis virais nos pulmões com uma redução maior do que 2 log no dia 4 após a infecção (Figura 13). Estes dados demonstram que H1H15211P pode inibir significativamente a replicação viral, mesmo quando administradas 24 horas após a inoculação viral.

[00229] A análise histológica foi realizada em camundongos tratados 24 horas após a infecção com o anticorpo controle hlgG, 500 µg ou 200 µg de H1H15211P. Os camundongos tratados com anticorpo de controle exibiam a patologia semelhante ao controle acima com inflamação intersticial significativa, borda peri-vascular e espessamento de septos alveolares. Os camundongos tratados com 200 µg ou 500 µg de H1H15211P tiveram inflamação intersticial mínima e com a inflamação peri-vascular reduzida e só focal por todo o pulmão. A pontuação histológica cega demonstra que a pontuação reduziu a inflamação para camundongos tratados (Figura 14). Estes dados demonstram que as doses terapêuticas de H1H15211P reduzem MERS-CoV indu-

ziram a patologia pulmonar mesmo quando administrado 24 horas após a infecção.

[00230] A presente invenção não é para ser limitada no âmbito por meio das modalidades específicas descritas na presente invenção. De fato, várias modificações da presente invenção em adição àquelas descritas na presente invenção serão evidentes por meio das pessoas que são versadas na técnica a partir da descrição anterior e das figuras que a acompanham. Tais modificações destinam-se a cair dentro do âmbito das reivindicações anexas.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende

(a) um primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à proteína “spike” do coronavírus da Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), em que o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidos em um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 66/74;

(b) um segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à proteína “spike” de MERS-CoV, em que o segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende três regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidos em um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 218/226;; e

(c) um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que:

(a) o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende seis CDRs (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) de SEQ ID NOs: 68-70-72-76-78-80; e

(b) o segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende seis CDRs (HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) de SEQ ID NOs: 220-222-224-228-230-232.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que:

(a) o primeiro anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 66/74; e

(b) o segundo anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo compreende um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NOs: 218/226.

4. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que é para uso em um medicamento para prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um sintoma ou indicação de infecção de MERS-CoV.

5. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo fato de que o pelo menos um sintoma ou indicação é selecionado(a) a partir do grupo que consiste em inflamação no pulmão, lesão alveolar, carga viral, febre, tosse, falta de ar, pneumonia, diarreia, falência de órgãos, choque séptico e morte.

6. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que é formulada para administração profilática ou terapêutica.

7. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que é formulado(a) para administração por via subcutânea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intramuscular ou intracraniana.

8. Uso de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga especificamente à proteína “spike” do MERS-CoV, caracterizado pelo fato de que é para a fabricação de uma composição farmacêutica, como definida qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um sintoma ou indicação de infecção de MERS-CoV.

Ligação de mAb-2 ao pré-complexo de mAb-1 & MERS																				
mAb Titer	mAb-1	MERS.mFc Nível de captura de (nm)	mAb-1 Ligação (nm)	mAb #	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
9.18	H1H15215P	0.38 ± 0.01	0.56 ± 0.02	1	0.02	0.04	0.02	0.19	0.03	0.03	0.04	0.05	0.04	0.03	0.03	0.30	0.29	0.12	0.33	0.04
16.6	H1H15177P	0.45 ± 0.01	0.60 ± 0.02	2	0.04	0.06	0.03	0.22	0.05	0.03	0.05	0.05	0.07	0.07	0.06	0.39	0.36	0.21	0.36	0.06
9.7	H1H15203P	0.36 ± 0.02	0.51 ± 0.02	3	0.01	0.04	0.02	0.20	0.04	0.01	0.02	0.03	0.04	0.01	0.03	0.31	0.33	0.19	0.34	0.04
11	H1H15211P	0.45 ± 0.01	0.76 ± 0.03	4	0.01	0.02	-0.01	0.14	0.01	0.00	0.01	0.01	0.02	-0.01	0.02	0.35	0.32	0.18	0.36	0.02
6.64	H1H15188P	0.38 ± 0.02	0.54 ± 0.02	5	0.02	0.05	0.03	0.19	0.04	0.03	0.03	0.02	0.04	0.02	0.03	0.04	0.04	0.03	0.03	0.06
6.63	H1H15208P	0.35 ± 0.02	0.46 ± 0.03	6	0.02	0.03	0.03	0.25	0.04	0.01	0.03	0.02	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02
8.29	H1H15228P2	0.37 ± 0.01	0.52 ± 0.02	7	0.00	0.03	0.01	0.19	0.03	0.01	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02	0.02	0.02	0.02	0.01	0.02
8.51	H1H15233P2	0.34 ± 0.02	0.46 ± 0.03	8	0.01	0.03	0.01	0.23	0.04	0.02	0.01	0.02	0.03	0.00	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.03
9.43	H1H15237P2	0.32 ± 0.02	0.39 ± 0.02	9	0.01	0.05	0.01	0.21	0.03	-0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.04
9.56	H1H15253P2	0.32 ± 0.02	0.38 ± 0.02	10	0.03	0.06	0.05	0.27	0.02	0.01	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.03	0.00	0.01	0.02	0.03
9.13	H1H15259P2	0.33 ± 0.01	0.42 ± 0.01	11	0.12	0.15	0.12	0.30	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.01	0.02	0.02	0.01	0.02	0.02	0.02
6.32	H1H15231P2	0.37 ± 0.01	0.50 ± 0.02	12	0.33	0.38	0.35	0.53	0.02	0.01	0.02	0.03	0.01	-0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.02	0.03
7.45	H1H15249P2	0.32 ± 0.02	0.40 ± 0.02	13	0.29	0.33	0.30	0.52	0.04	0.01	0.01	0.02	0.03	0.02	0.02	0.03	0.01	0.01	0.02	0.02
0.24	H1H15260P2	0.32 ± 0.01	0.39 ± 0.01	14	0.28	0.39	0.35	0.54	0.04	0.02	0.04	0.04	0.05	0.02	0.03	0.04	0.02	0.03	0.04	0.02
7.22	H1H15264P2	0.33 ± 0.01	0.41 ± 0.01	15	0.32	0.38	0.34	0.55	0.03	0.02	0.01	0.01	0.02	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.02	0.02
10	REGN1536	0.33 ± 0.01	0.12 ± 0.01	16	0.35	0.38	0.33	0.55	0.25	0.27	0.28	0.29	0.28	0.24	0.30	0.29	0.27	0.24	0.30	0.03

FIG. 3

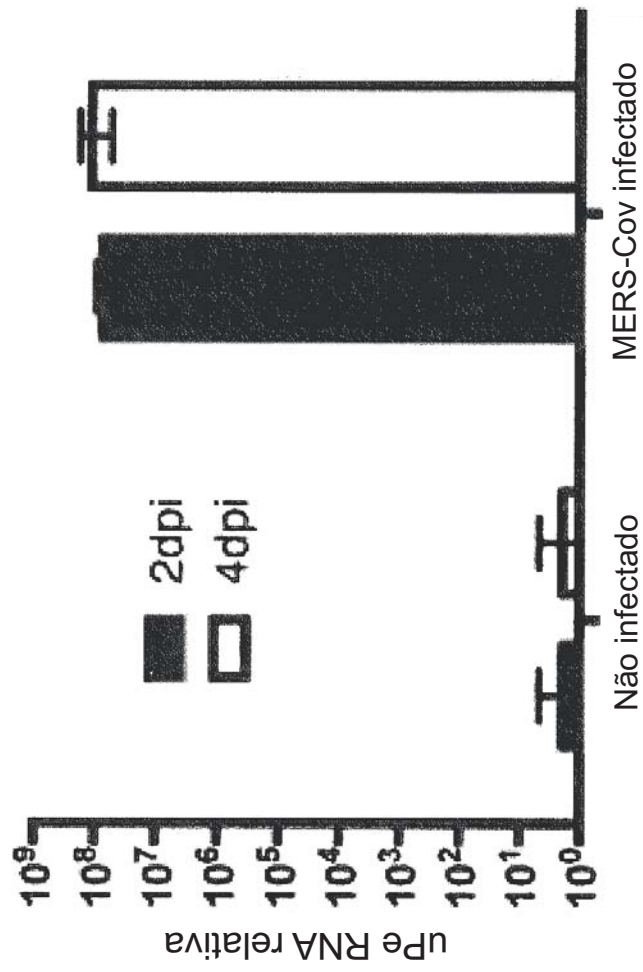


FIG. 4

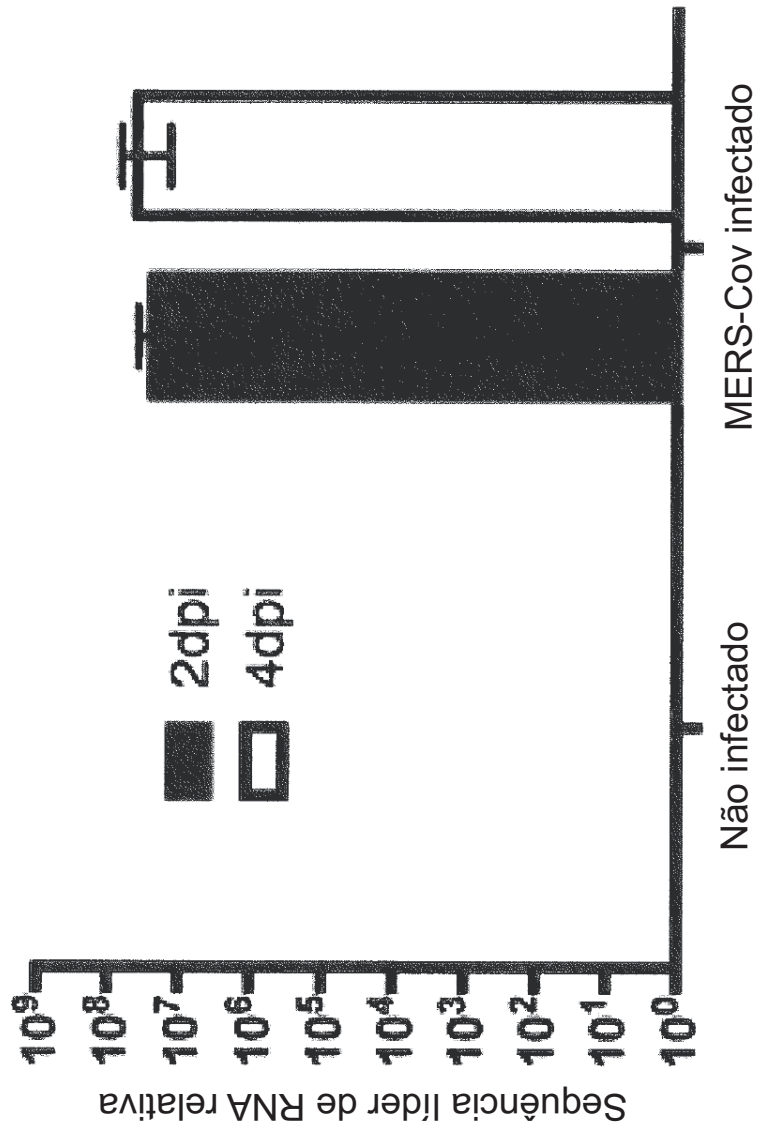


FIG. 5

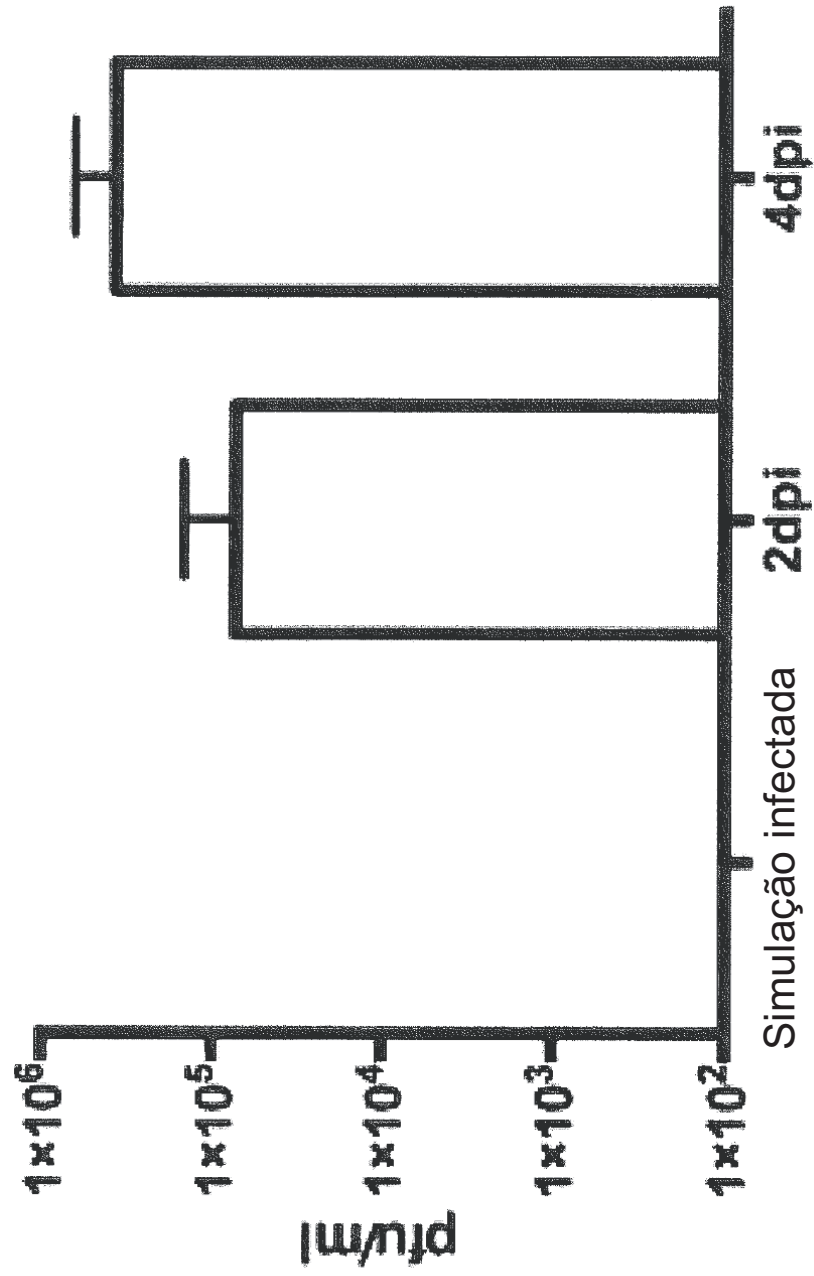


FIG. 6

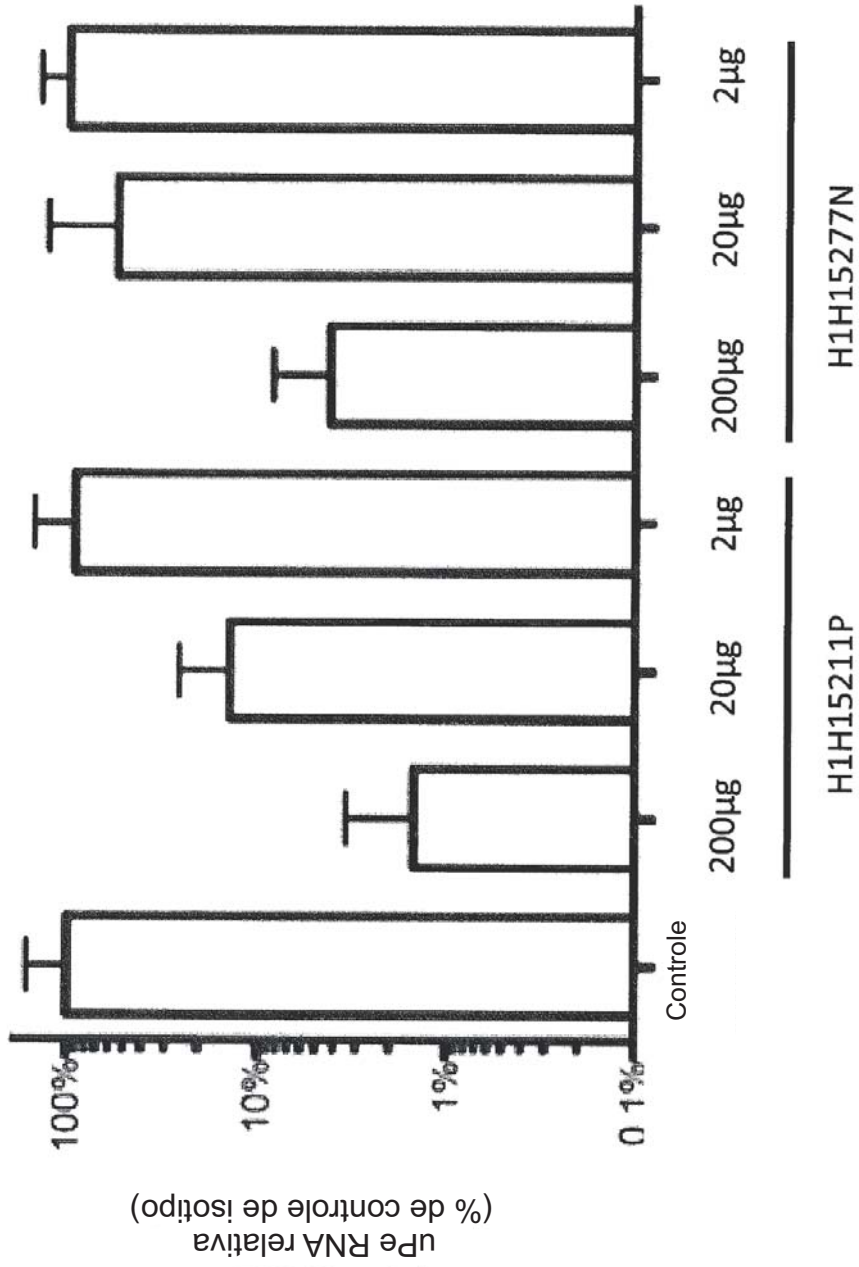


FIG. 7

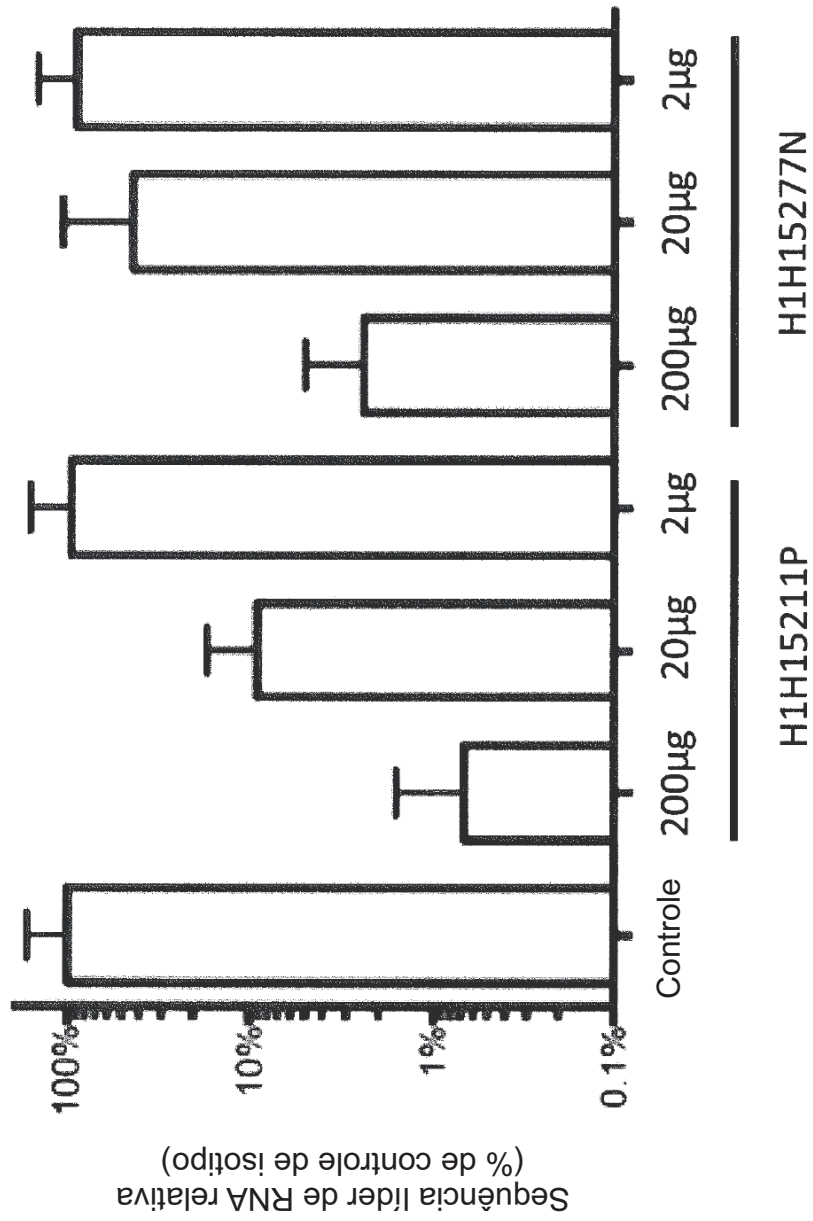


FIG. 8

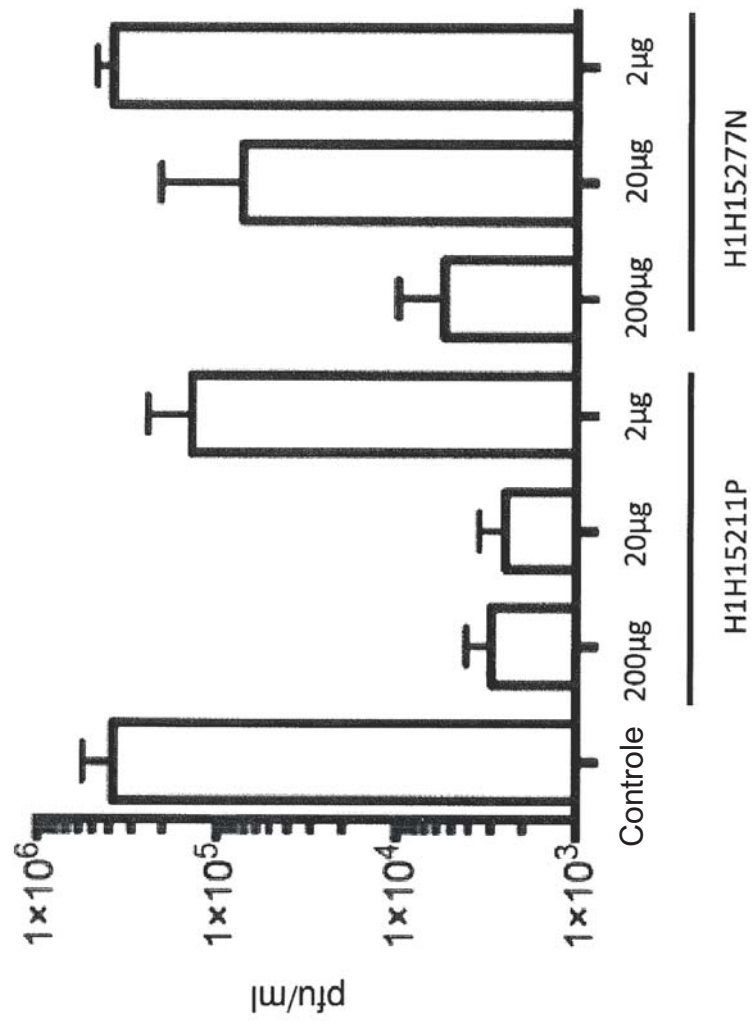


FIG. 9

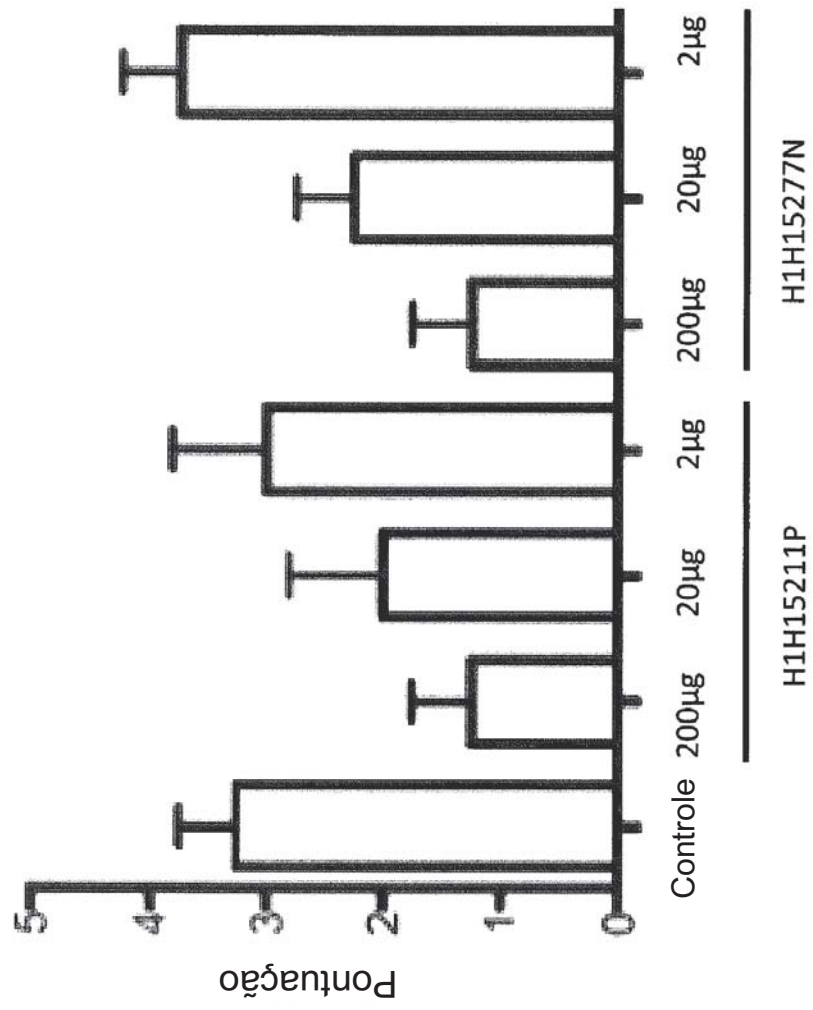


FIG. 10

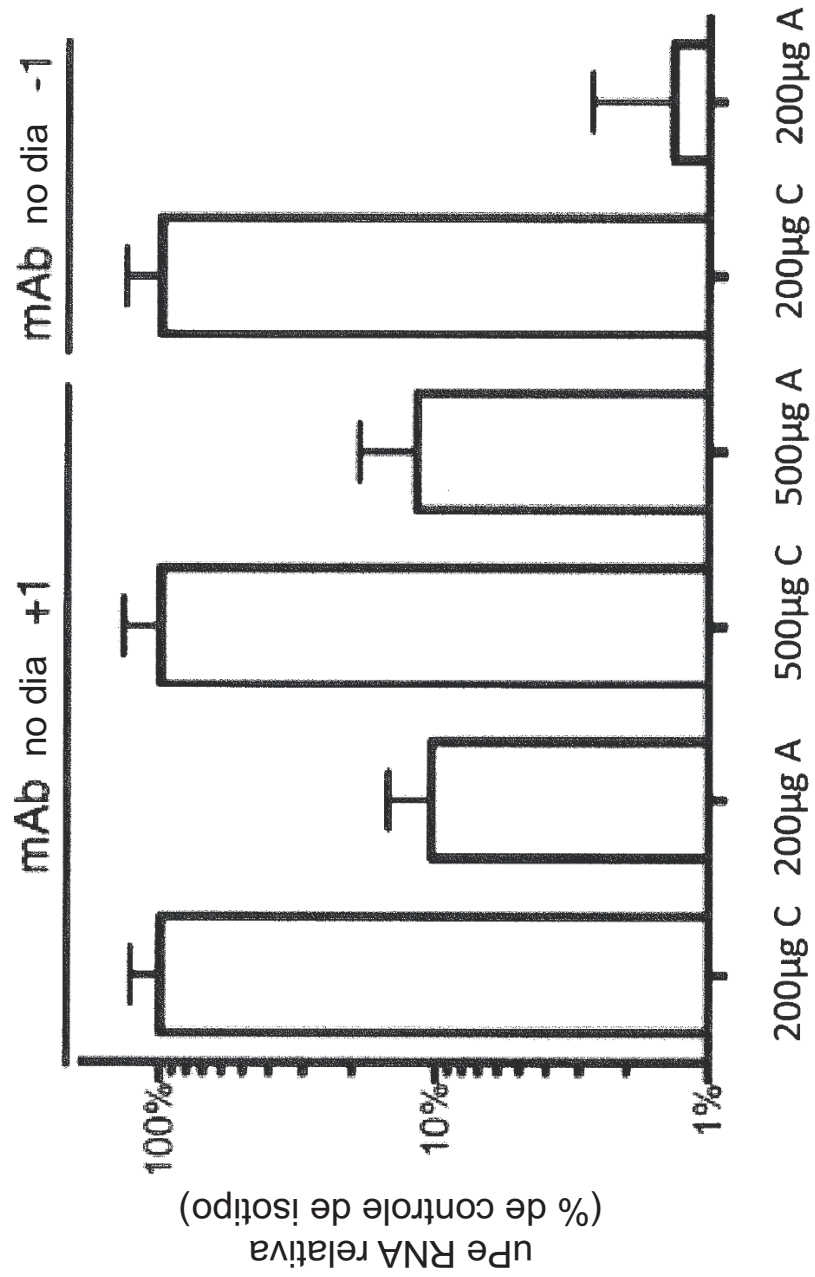


FIG. 11

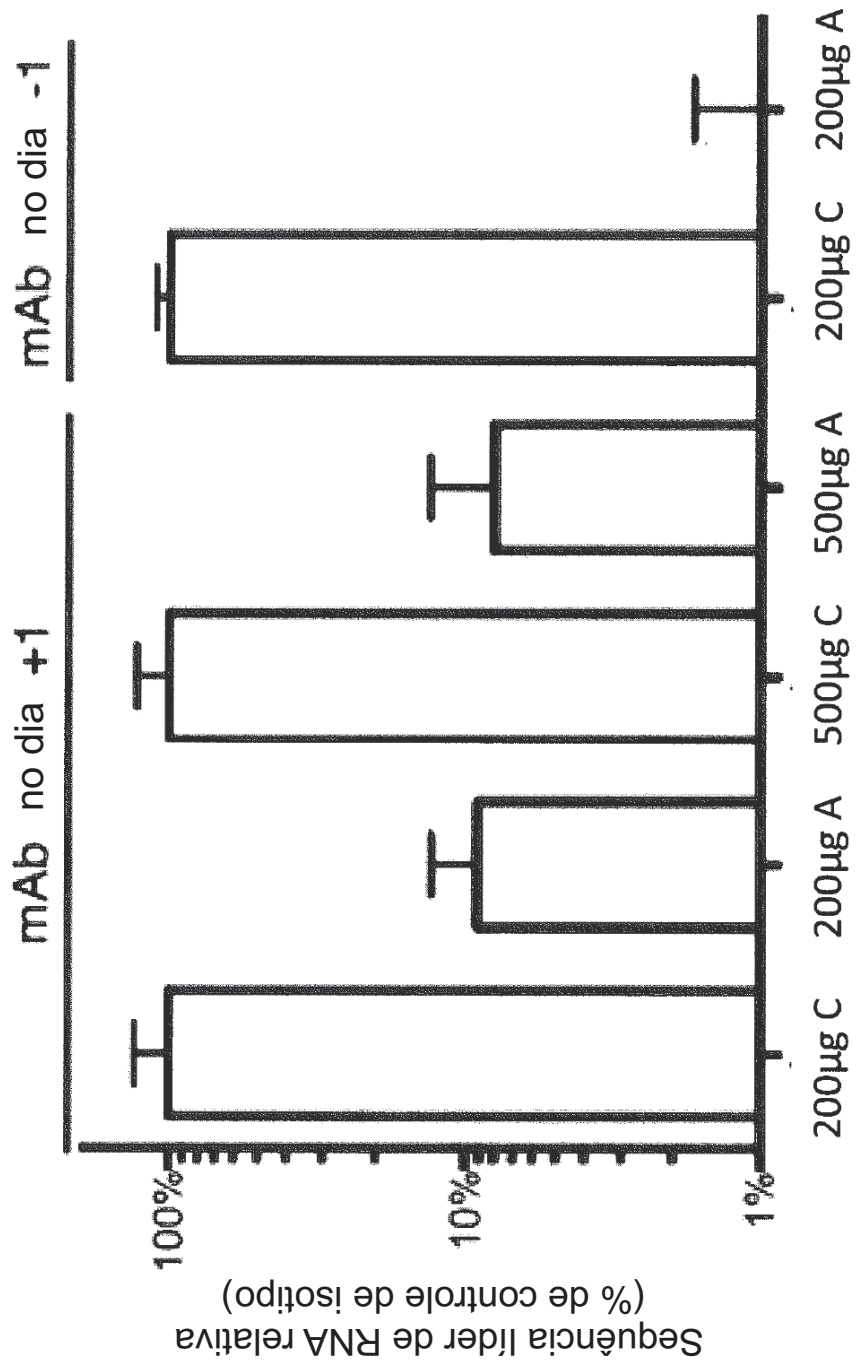


FIG. 12

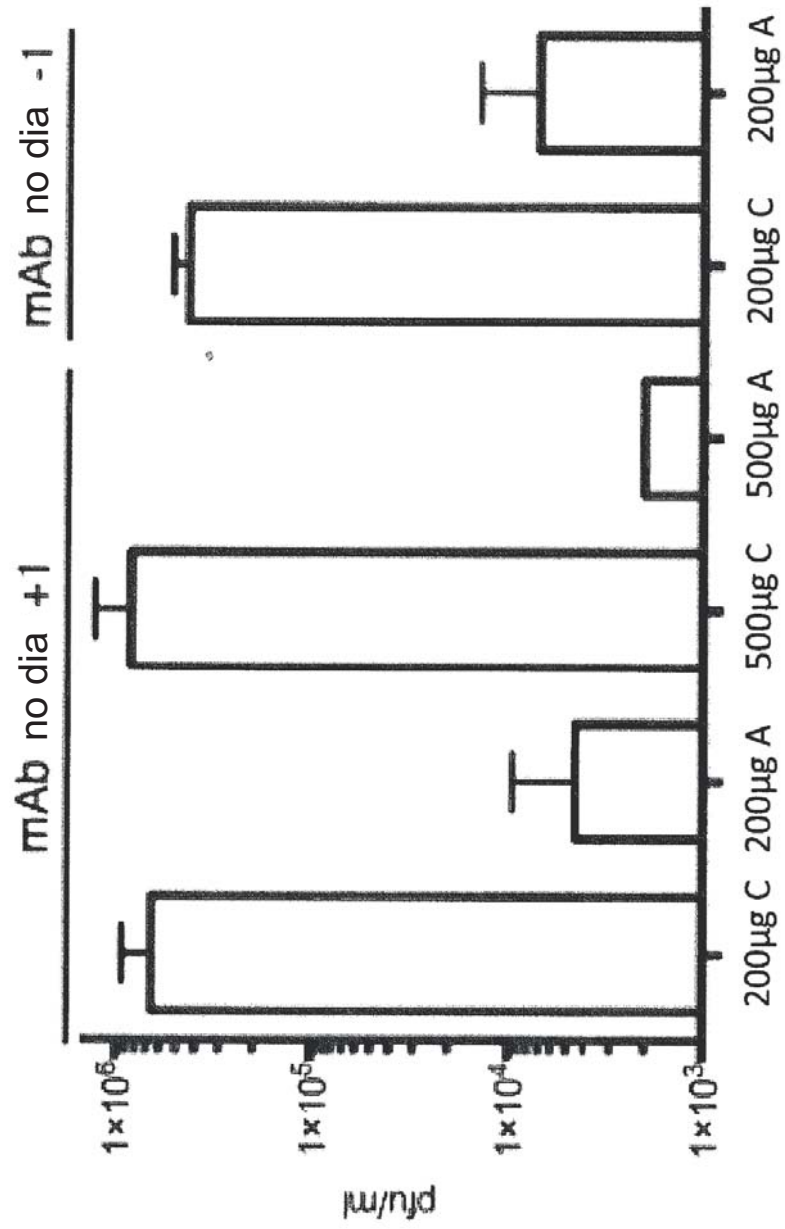


FIG. 13

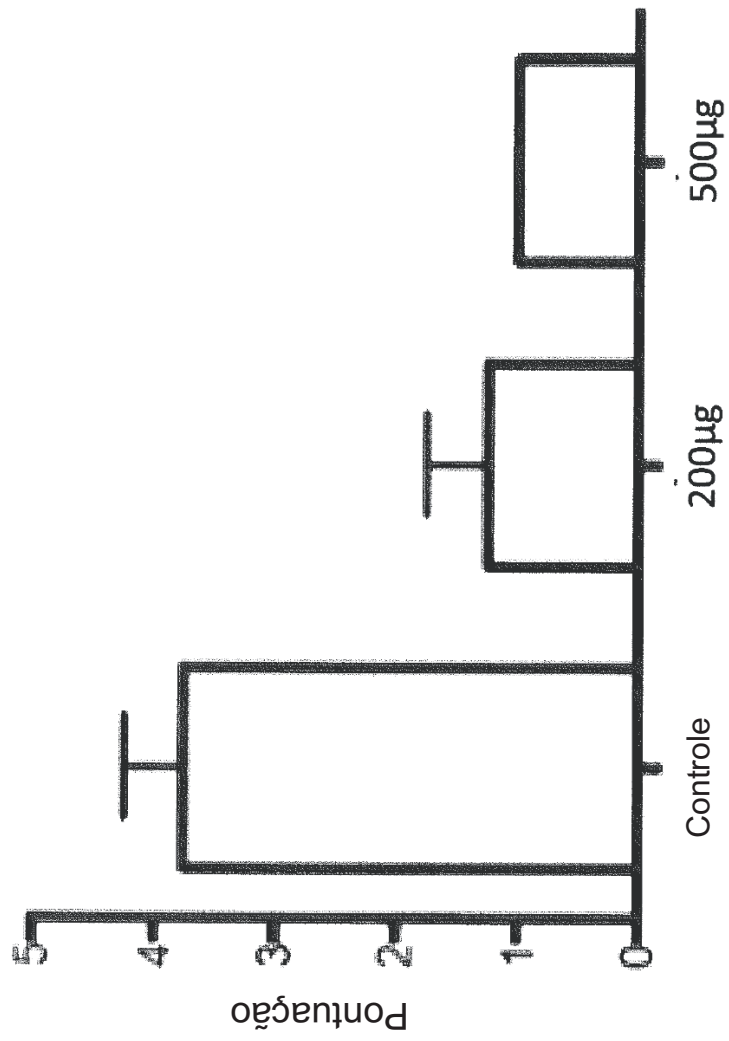


FIG. 14