República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 9709524-9 B1

BRPI9709524B1

(22) Data do Depósito: 03/06/1997

(45) Data de Concessão: 01/11/2016

(54) Título: PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO PARA CÉLULAS T QUE EXPRESSAM CD4

(51) Int.Cl.: C12P 21/08

(30) Prioridade Unionista: 02/06/1997 US 867149, 03/06/1996 US 657149, 28/02/1997 US 808374

(73) Titular(es): UNITED BIOMEDICAL, INC.

(72) Inventor(es): CHANG YI WANG

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE UM ANTICORPO PARA CÉLULAS T QUE EXPRESSAM CD4".**

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção é dirigida anticorpos monoclonais produzidos pelo uso de linfócitos T que expressam CD4, tais como células mononucleares periféricas do sangue, timócitos, esplenócitos e células de linhagem de célula T derivada de leucemia ou de linfoma tal como HPB-ALL ou SUP-T como o imunógeno de acordo com os protocolos e procedimentos de seleção descritos. Os anticorpos monoclonais da presente invenção são caracterizados por sua capacidade de neutralizar in vitro e in vivo isolados primários do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e de vírus de imunodeficiência relacionados. Os anticorpos são dirigidos contra um complexo de antígeno de célula hospedeira que compreende proteína CD4 em associação com domínios provenientes de receptores de quimiocina e têm amplas atividades neutralizadoras contra isolados primários provenientes de todos os clados de HIV tipo 1 (HIV-1) e isolados primários de HIV tipo 2 (HIV-2) e Vírus da Imunodeficiência Simiana (SIV). A presente invenção é também dirigida a um processo de seleção e de produção de tais anticorpos, hibridomas que secretam tais anticorpos, composições farmacêuticas que compreendem tais anticorpos e e processos para prevenção pré- e pós-exposição de infecção pelo vírus da imunodeficiência em primatas, inclusive seres humanos, por tais anticorpos cujos alvos primários são linfócitos que expressam CD4.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Não obstante a intensiva pesquisa para uma vacina nestes últimos 12 anos desde a descoberta inicial do HIV como o Vírus da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e dez anos desde a clonagem molecular e a caracterização do vírus da AIDS, os principais obstáculos permanecem para a vacina de HIV e desenvolvimento da imunoterapia. Estes obstáculos incluem variabilidade de HIV-1, múltiplas vias/modos de transmissão do vírus e uma falta de compreensão das respostas imunológicas necessárias para a

prevenção da infecção por HIV. Em um artigo publicado em 28 de julho de 1995 (Cell 82: 175-176), David Baltimore pede para todos os cientistas de todo o mundo neste campo que retornem uma etapa e reflitam por que esta infecção pelo vírus, contra o qual estão sendo gastos 10% do orçamento dos U. S. National Institutes of Health (NIH), permanece tão enigmática.

Houve otimismo prematuro por conta das vacinas de subunidade de envoltório de HIV-1 recombinante eficazes (por exemplo, produtos de vacina gp120 e gp160) dado que os soros das vacinas provenientes de diversas experiências clínicas eram capazes de neutralizar isolados em laboratório de HIV-1 in vitro (Belshe e outros, JAMA, 1994, 272: 475; Keefer e outros, AIDS Res Hum Retroviruses, 1994, 10:1713). Este otimismo foi abalado quando verificou-se que os soros dos vacinados eram bastante ineficazes para a neutralização dos isolados primários do paciente com HIV-1 (Hanson, AIDS Res Hum Retroviruses, 1994, 10: 645); Mascola e outros, J Infect Dis, 1996, 173: 340). Estas descobertas desapontadoras levaram o NIH a decidir, em Junho de 1994, adiar as experiências onerosas em grande escala de diversas vacinas de subunidade HIV baseadas em proteína com envoltório recombinante.

Os isolados primários de HIV-1 são obtidos por cultivo limitado de células mononucleares do sangue periférico do paciente (PBMCs) ou plasma com PBMCs não-infectados. Eles se parecem bastante com as cepas de HIV responsáveis pela infecção humana no campo (Sawyer e outros, J Virol, 1994, 68: 1342; Cornelissem e outros, J Virol, 1995, 69: 1810). Os isolados primários podem ser facilmente distinguidos dos vírus T-tropic adaptados em laboratório comumente usados tais como IIIb/LAI, SF2 e MN, que foram passados com o tempo em linhagens de célula T-linfóide humana e são bem adaptados para crescer nestas linhagens de célula T. Primeiro, a maioria dos isolados primários é M-tropic. Eles não crescem facilmente em linhagens de célula T cultivadas, ao contrário, eles são monócitos ou macrófago-tropic, embora eles possam também infectar células T primárias (Cheng-Mayer e outros, Science, 1988, 240: 80). Em segundo lugar, os isolados primários são altamente resistentes à neutralização in vitro por formas

solúveis recombinantes da proteína receptora viral CDA4 (rsCD4) que requerem 200-2700 vezes mais rsCD4 do que as cepas de laboratório para neutralização comparável (Daar e outros, PNAS USA, 1990, 87: 6574-6578), Terceiro, os isolados primários são também resistentes a anticorpos neutralizadores provocados pelo uso de vacinas gp120 (Mascola e outros).

Os isolados primários incluem tanto isolados indutores de sincício (SI) que induzem a formação de sincício em cultura de PBMC como isolados não-indutores de sincício (NSI). Entre os isolados primários SI, a maioria irá se replicar na linhagem de célula T MT2 especialmente sensível a HIV, porém poucos podem se replicar nas linhagens de célula T transformadas menos permissivas tal como CEM ou H9 que são comumente usadas para a cultura de isolados adaptados em laboratório. Os isolados primários não-indutores de sincício (NSI) podem ser cultivados apenas nas células T primárias provenientes de sangue periférico.

O otimismo prematuro por uma vacina contra AIDS também foi gerado pelos estudos sobre preparações de vírus inativado de Vírus da Imunodeficiência Simiana (SIV). Similaridades entre HIV-1 e SIV em morfologia, organização genética, infecção e processos de doença fizeram da infecção por SIV em macacos rhesus um excelente modelo no qual explora diferentes estratégias para vacina contra AIDS. Estudos anteriores neste modo mostraram que as preparações inativadas de SIV cultivadas sobre linhagens de célula T humana e formuladas em adjuvante podem proteger os macacos contra a infecção após inoculação experimental com variantes patogênicas, altamente infecciosas de SIV cultivado em célula humana (Desrosiers e outros, PNAS USA, 1989, 86:6353-6357); Murphey-Corb e outros, Science, 1989, 246:1293). Inesperadamente, esta proteção foi perdida quando o estoque de SIV crescido sobre células homólogas de macaco foi usado apara o teste de animais imunizados.

Posteriormente foi demonstrado por estudos de imunização com SIV cultivado em célula de macaco e células humanas não-infectadas que a proteção contra infecção naqueles estudos anteriores com SIV provavelmente resultou do estímulo de respostas imunológicas a proteínas de célula

hospedeira humana xenogenéica em vez de aos antígenos codificados por vírus (Stott, Nature, 1991, 353: 393). Experimentos de imunização passiva que envolvem SIV forneceram algumas provas para sugerir que certos anticorpos anticélula podem contribuir para a proteção contra infecção por SIV na ausência de imunidade mediada pela célula (Gardner e outros, AIDS Res Hum Retroviruses, 1995, 11: 843-854).

O mecanismo para a imunidade protetora ao teste com SIV fornecido pelos anticorpos anti-célula não foi delineado. Um mecanismo proposto é que a proteção mediada for anti-célula proveniente de infecção com SIV podem envolver as proteínas da células associadas ao vírus. Sabe-se que os vírus da imunodeficiência tais como HIV e SIV incorporam proteínas celulares provavelmente obtidas a partir da célula hospedeira enquanto os vírus surgem da membrana da célula hospedeira. Os anticorpos a algumas das principais proteínas celulares associadas ao complexo de histocompatibilidade (MHC), beta$_2$-microglobulina, HLA-DR e moléculas HLA de classe I, foram implicadas na neutralização in vitro de cepas de laboratório de SIV e HIV-1 (Arthur e outros, Science, 1991, 258: 1935). Além das proteínas superficiais associadas a MHC, Montefiori e outros (Virology, 1994, 205:82; AIDS Res Hum Retroviruses, 1995, 11: 1429) identificaram recentemente três proteínas de controle complementares, CD46, CD55 e CD59, sobre a superfície de SIV e HIV-1 cultivada sobre célula humana surgindo a possibilidade de que estas moléculas de célula hospedeira também podiam ser utilizadas pelos vírus como um mecanismo para evadir a virólise complementar. Um mecanismo alternativo proposto é que a proteção por anticorpos de anti-célula pode ser mediada pelo bloqueio da atividade de vírus da imunodeficiência contra células do sistema imunológico em uma maneira previamente não reconhecida. Parece ser um complexo antígeno de célula hospedeira associado com CD4 sobre a superfície das células T do hospedeiro o que facilita a ligação viral e a entrada e que podem agir como um alvo para os anticorpos anti-célula protetores.

Além do receptor CD4 do complexo antígeno do hospedeiro para ligação de HIV, outros fatores ou co-receptores de HIV que afetam a

replicação, entrada ou fusão do HIV foram relatados recentemente, enquanto o trabalho sobre a presente invenção estava em andamento. Estes incluem três quimiocinas produzidas por células T $CD8^+$ (Cocchi e outros, Science, 1995, 270: 1811-1815) que são relatadas como sendo HIV supressoras; um co-receptor CXC-CKR4 (também denominado fusina ou LESTR) sobre células que expressam CD4 para T-tropic mas não fusão de HIV-1 M-tropic e entrada (Feng e outros, Science, 1996, 272: 873), um receptor beta-quimocina CC-CKR5 que liga as três quimiocinas inibidoras (Cocchi e outros) como um co-receptor para HIV-1 M-tropic, mas não T-tropic (Doranz e outros, Cell, 1996, 85:1149; Dragic e outros, Nature, 1996, 381: 667; Choe e outros, Cell, 1996, 85:1135; Deng e outros, Nature, 1996, 381: 661; Alkhatib e outros, Science, 1996, 272: 1955) e outros receptores de quimiocina (CC-CKR2b e CC-CKR3) como co-receptores para HIV M- e duplo-tropic (Doranz e outros, Cell, 1996, 85:1149). Estes co-receptores são divulgados como sendo receptores acoplados de proteína G previamente descritos com sete segmentos de transmembrana (Loetsher e outros, J Biol Chem, 1994, 264: 232; Samson e outros, Biochemistry, 1996, 35: 3662).

Para identificar mais precisamente a proteína celular putativa que pode ser respostas protetoras estimuladoras e para melhor caracterizar o mecanismo de proteção mediado por anticorpos anti-célula, as atividades HIV-neutralizadoras foram caracterizadas pelo presente inventor para membros de um júri de anticorpos monoclonais dirigidos contra múltiplos antígenos celulares; $beta_2$ microglobulina, proteínas MHC classe I HLA, A, B, C, MHC classe II HLA DR e outros antígenos de célula T associados com uma linhagem de célula T, para identificar aqueles que são capazes de neturalizar os isolados primários de HIV em um ensaio de neutralização microplaca in vitro. Foram conduzidos experimentos para determinar o âmbito de tal atividade neutralizadora, se houver, para os anticorpos que se descobriu possuem tal atividade; e para determinar se tal atividade in vigro pode ser traduzida em eficácia in vitro em um modelo (s) animal (ais) apropriado (s).

Os resultados destes experimentos demonstraram que, exceto

para os anticorpos dirigidos contra um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4, nenhum outro anticorpo de anti-célula que inclua anticorpos exclusivamente CD4-específico, pode neutralizar os isolados primários HIV-1 tão eficazmente em ensaios de neutralização. Os resultados também mostraram que os anticorpos dirigidos contra um complexo antígeno de célula hospedeira compreendendo CD4 em associação com os domínios provenientes de receptores de quimiocina exibem ligação melhorada com rsCD4. Além disso, os anticorpos com as propriedades desejadas são identificados e podem bloquear in vivo a infecção SIV em macacos e a infecção HIV-1 in vivo do sistema imunológico humano reconstituído em camundongos.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece, pela primeira vez, anticorpos e homólogos dos mesmos capazes de: (1) bloquear a ligação de HIV a células que expressam CD4, (2) bloquear a formação de sincícia HIV-induzida entre as células que expressam CD4, (3) neutralizar eficazmente a infecção in vitro de células CD4 positivas por isolados primários provenientes de todos os clados de HIV tipo 1, e provenientes de diversos isolados primários de HIV do tipo 2 e SIV, (4) neutralizar eficazmente a infecção in vitro de células CD4 positivas por isolados primários de HIV-1 pré- e pós-exposição a estes vírus, e (5) evitar a infecção de primatas que inclui macacos rhesus e seres humanos por isolados primários de HIV e SIV quando estes anticorpos são administrados por uma via parenteral, isto é, intravenosa ou intraperitoneal e (6) evitar a infecção de camundongos SCID (hu-PBL-SCID) linfócito-reconstituídos de sangue periférico humano por isolados primários de HIV-1 tanto modos pré- como pós-exposição.

Esta invenção é, portanto, dirigida a anticorpos monoclonais que se ligam a um complexo antígeno de célula hospedeira humana que compreende CD4 sobre a superfície de células que expressam CD4 humano com a capacidade de neutralizar isolados primários de HIV, isto é, isolados do paciente passados não mais do que 3-5 vezes apenas em células mononucleares de sangue periférico (PBMC). Mais especificamente, esta in-

venção refere-se a anticorpos, dirigidos contra determinantes antigênicos presentes sobre um complexo antígeno de célula hospedeira de superfície exposta compreendido da proteína CD4 em associação com domínios provenientes de receptores de quimiocina tal como CC-CKR5, que tem atividades neutralizantes amplas e eficientes contra isolados primários provenientes de todos os clados de HIV-1 e diversos isolados primários de HIV-2 e SIV. A presente invenção é também dirigida a um processo para a produção de anticorpos por imunização, por via intravenosa e/ou intraperitoneal, um mamífero não-humano com 5-10 x 10^6 células que expressam CD4, de preferência células provenientes de uma linhagem de célula derivada de leucemia T ou linforma humano tal como HPB-ALL de um paciente com T agudo linfoblástico leucêmico ou SUP-T de um paciente com linfoma de célula T não de Hodgkin, lavadas e re-suspensas em PBS ou em um adjuvante tal como adjuvante completo de Freund; seguido por mais do que duas injeções intravenosas ou intraperitoneais subseqüentes de 5 - 10 x 10^6 células lavadas re-suspensas em PBS sem adjuvante. Os anticorpos produzidos pelos animais imunizados são reconhecidos pela capacidade de seus anticorpos do soro ligarem-se a:

1. rsCD4;

2. rsCD4 em associação com domínios provenientes de receptores de quimiocina com uma reatividade melhorada;

3. a superfície de células que expressam CD4 inclusive as células HPB-ALL ou SUP-T em uma maneira de "cobertura" como mostrado em um microscópio com fluorescência de alta resolução;

4. qualquer um dos peptídeos: AA_1-AA_{20}, AA_{81}-AA_{92}, AA_{79}-AA_{88}, AA_{60}-AA_{109}, AA_{118}-AA_{165}, AA_{235}-AA_{251}, AA_{297}-AA_{351} ou AA_{361}-AA_{375} derivados de rsCD4 e

5. para neutralizar isolados primários de HIV.

Os anticorpos da presente invenção podem ser ainda caracterizados como fornecedores de imunidade passiva proveniente de infecção por isolados primários de HIV ou SIV a primatas ou a camundongos hu-PBL/SCID, a uma ED_{50} de <50 mg/kg.

A presente invenção também inclui os hibridomas que secretam os anticorpos que têm estas características. Também são consideradas as composições profiláticas pré- e pós-exposição que compreendem estes anticorpos para a prevenção de infecção por vírus da imunodeficiência em primatas, inclusive seres humanos, causadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são linfócitos que expressam CD4. Os anticorpos e homólogos dos mesmos desta invenção reconhecem epítopos "descontínuo difundido conformacional" sobre um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende a molécula CD4 particularmente quando associada a domínios provenientes de outros receptores de quimiocina tal como CC-CKR5 presente nas células que expressam CD4. Os anticorpos ligam-se às imitações sintéticas provenientes de qualquer um dos quatro domínios extracelulares de CD4 humano (Tabela 1; SEQ ID Nº. 1) que compreende os peptídeos: AA_1-AA_{20}, AA_{81}-AA_{92}, AA_{79}-AA_{88}, AA_{60}-AA_{109}, AA_{118}-AA_{165}, AA_{235}-AA_{251}, AA_{297}-AA_{351} e AA_{361}-AA_{375} de CD4.

A presente invenção também se refere a homólogos de anticorpo. Estes incluem anticorpos monoclonais, anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos recombinantes com domínios de anticorpo provenientes de uma espécie de um animal fundido a domínios de anticorpo humano e anticorpos humanizados. Os homólogos de anticorpos da invenção de preferência são moléculas de imunoglobulina intactas que têm cadeias pesadas e leves. Além disso, os homólogos de anticorpos reativos CD4 desta invenção podem estar na forma de fragmentos Fab, de fragmentos Fab', de fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos de F(v) ou qualquer outro fragmento de imunoglobulina que tem as propriedades de ligação descritas acima.

Fornecidos como anticorpos preferidos ou homólogos de anticorpos por esta invenção são os anticorpos monoclonais de camundongo designados B4 ou M2 ou B13. Também são fornecidos os hibridomas que produzem os homólogos de anticorpos desta invenção, um processo para selecionar e produzir os homólogos de anticorpos por cultivo destas células e um processo para a produção dos hibridomas desta invenção.

Tabela 1

Peptídeos CD4 para Experimentos de Mapeamento de Epítopo Anti-CD4

Antígeno de Peptídeo		Antígeno de Peptídeo		Antígeno de Peptídeo		Antígeno de Peptídeo	
Código	Descrição	Código	Descrição	Código	Descrição	Código	Descrição
p1403a	CD4(41-55)	p1483a	CD4(238-249)	p1590a	(C)CD4(104-115)(C)*	p1624a	(C)CD4(36-47)(C)*
p1405a	CD4(81-92)	p1485a	CD4(168-179)	p1608a	CD4(16-25)(C)*	p1687a	(C)CD4(349-353)(C)*
p1460c	CD4(60-109)	p1486a	CD4(126-137)	p1609a	(C)CD4(118-128)(C)*	p1689a	(C)CD4(213-226)(C)*
p1461a	(C)CD4(35-59)(C)*	p1487a	CD4(114-125)	p1610a	(C)CD4(127-141)(C)*	p1693a	(C)CD4(235-251)(C)*
p1462a	CD4(29-59)	p1488a	CD4(118-129)	p1611a	(C)CD4(138-146)(C)*	p1701a	CD4(361-375)
p1468a	CD4(47-64)	p1489a	CD4(102-113)	p1614a	(C)CD4(38-45)(C)*	p1702a	CD4(14-22)
p1a574	CD4(364-375)	p1490a	CD4(94-105)	p1615a	(C)CD4(39-44)(C)*	p1761a	CD4(123-134)
p1476a	CD4(352-363)	p1491a	CD4(90-101)	p1616a	(C)CD4(40-43)(C)*	p1767b	HBVTh-GG-CD4(6-20)‡
p1477a	CD4(340-351)	p1492a	CD4(85-96)	p1617a	(C)CD4(52-54)(C)*	p1768a	CD4(154-165)
p1478a	CD4(324-335)	p1493a	CD4(138-149)	p1618a	(C)CD4(51-55)(C)*	p1768b	HBVTh-GG-CD4(154-165)‡
p1479a	CD4(318-329)	p1494a	CD4(160-171)	p1619a	(C)CD4(48-52)(C)*	p1813b	HBVTh-GG-CD4(79-88)‡
p1480a	CD4(303-314)	p1495a	CD4(206-217)	p1620a	(C)CD4(85-90)(C)*	p1816d	CD4(1-20)
p1481a	CD4(297-308)	p1496a	CD4(218-229)	p1622a	(C)CD4(104-108)(C)*	p1868a	CD4(297-351)*
p1482a	CD4(276-287)	p1589a	(C)CD4(79-96)C)*	p1623a	(C)CD4(108-112)(C)*		

O peptídeo é ciclizado através dos dois resíduos internos de cisteína que estão presentes seja como parte do segmento de peptídeo CD4 ou por projeto adicionado aos terminais N e C do segmento de peptídeo CD4 para facilitar a ciclização.

(c) Uma cisteína adicional adicionada ao fragmento de peptídeo CD4 existente.

HBVTh (FFLLTRILTIPQSLD, SEQ ID Nº. 2) representa o segmento de peptídeo com função auxiliar T promíscua derivada da proteína HBsAg

GG (Gly-Gly) como resíduos espaçadores inseridos entre o sítio CD4 e o epítopo auxiliar T.

BREVE DESCRIÇÃO DAS ILUSTRAÇÕES

A Figura 1 representa a seqüência de aminoácido de CD4 humano (SEQ ID Nº. 1), uma parte do complexo antígeno do hospedeiro, como deduzido da seqüência de ácido nucléico. Os aminoácidos são representados por códigos de letras isoladas como a seguir:

Ala:A	Cys:C	His:H	Met:M	Thr:T
Arg:R	Gln:Q	Ile:I	Phe:F	Trp:W
Asn:N	Glu:E	Leu:	Pro:P L	Tyr:Y
Asp:D	Gly:G	Lys:K	Ser:S	Val:V

Usando o sistema de numeração corrigido de Littman e outros (Cell, 1988, 55:541), AA_1-AA_{110}, AA_{111}-AA_{181}, AA_{182}-AA_{287}, AA_{288}-AA_{375}, AA_{376}-AA_{393}, AA_{394}-AA_{433} representam respectivamente o primeiro, o segundo, o terceiro e o quarto domínio extracelular, o domínio da transmembrana e o domínio citoplásmico da molécula de CD4.

A Figura 2 apresenta representações esquemáticas das três configurações teoricamente possíveis de epítopo. O anticorpo é representado apenas como um rápido esboço do fragmento de Fv. As caixas cheias indicam que parte do anticorpo que entra em contato com os aminoácidos do epitopo. Os aminoácidos do epítopo são representados por pequenos círculos. Se os aminoácidos do epítopo formam uma seqüência de peptídeo contínua simples, o epítopo é considerado como sendo "linear" (por exemplo, MAbs E31 e E6); se os aminoácidos estiverem espalhados sobre dois ou alguns alinhamentos de peptídeo que são espacialmente adjacentes em virtude da dobra conformacional, o epítopo é denominado "descontínuo" (por exemplo, MAbs J33, H5, D5, E2 e I26). O caso mais extremo foi chamado "difundido descontínuo" em que numerosos sítios descontínuos, derivados de um ou mais do que uma molécula em um complexo, combinam-se por dobra conformacional para formar um epítopo estendido (por exemplo, os epítopos de MAbs B4 e M2) (modificados por Meloen e outros, Ann. Biol Clin, 1991, 49: 231)

A Figura 3 representa em ilustrações esquemáticas três tipos diferentes de ligação a CD4 que expressam células HPB-ALL: coberturas,

emplastros e aglomerados, observados para seis anticorpos anti-CD4 de boa fé, dois anticorpos reconhecendo um complexo de antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 em associação com um receptor de quimiocina e um soro *alfa*rsCD4 de cobaia. Em um ensaio de imunofluorescência, a ligação de B4 ou de M2 a células HPB-ALL é manifestada como pontos fluorescentes no formato de "tampas" (A) sobre as células sob um microscópio com fluorescência de alta resolução. A ligação para cada um dos anticorpos anti-CD4 ou *alfa*rsCD4 de cobaia às células HPB-ALL é manifestada como pontos fluorescentes no formato de "emplastros"(B). A ligação de proteína gp120 de HIV marcado com FITC às células HPB-ALL é manifestada como pontos fluorescentes no formato de "aglomerados" (C).

A Figura 4 representa % de Melhoria da atividade de ligação rsCD4 para vários anticorpos monoclonais exercida pelo peptídeo 3 (p2047a) do domínio CC-CKR5 do receptor de quimiocina em um estudo de dose dependência.

A Figura 5 representa a avaliação quantitativa (IC_{50} rsCD4) da afinidade melhorada de MAb B4 para a mistura de peptídeo 3 do domínio CC-CKR5 do receptor de rsCD4/quimiocina vs rsCD4.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Como usado aqui, "isolados primários de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1)" são obtidos por cultivo limitado de até cinco passagens, de células mononucleares de sangue periférico do paciente (PBMCs) ou plasma com não-infectados. Os isolados primários podem ser distinguidos por três propriedades importantes das cepas adaptadas em laboratório tais como IIIb/LAI, SF2 e MN que foram passadas com o tempo em linhagens de célula T-linfóides humanas. Primeiro, a maioria dos isolados primários não crescem facilmente em linhagens de célula T. Por exemplo, muitos isolados primários que induzem a formação de sincício em cultura PBMC (isolados de SI) irão se replicar nas linhagens de célula MT2 T especialmente sensíveis a HIV, porém poucas replicam em linhagens de célula T menos permissivas tal como CEM ou H9. Os isolados primários não-indutores de sincício (NSI) irão se replicar apenas em células T

primárias. Segundo, eles diferem de cepas adaptadas em laboratório em sua sensibilidade à neutralização in vitro por formas solúveis recombinantes da proteína do receptor viral CD4 (rsCD4) (Daar e outros, PNAS USA, 1990, 87: 6574-6578). Terceiro, as cepas adaptadas em laboratório são sensíveis à neutralização por anticorpos com especificidades para o envoltório viral, enquanto os isolados primários são resistentes (Sawyer e outros, J Virol, 1994, 68: 1342; Mascola e outros, J Infect Dis., 1996, 173:340). Como mostrado no Exemplo 1, Tabela 2, as cepas de laboratório, tal como HIV-1 MN, são bastante sensíveis à neutralização por anticorpos anti-V3, enquanto que dois isolados primários são resistentes, mesmo a uma preparação anti-V3 com um título de neutralização contra HIV-1 MN de 1:203.080.

No entanto, a neutralização das cepas de HIV de laboratório e dos isolados primários por anticorpos anti-célula segue uma tendência diferente do que os anticorpos anti-envoltório. No Exemplo 2, Tabela 3, os anticorpos monoclonais dirigidos contra beta$_2$ microglobulina, MHC classe I HLA A, B, C e MHC classe II HLA DR e outros antígenos de superfície da célula T bem caracterizados não inibiram a infecção por uma das cepas MN de HIV-1 derivado de linhagem de célula de laboratório ou por um isolado primário de clado de HIV-1 B, enquanto um anticorpo monoclonal (MAb B4) produzido contra HPB-ALL que tem uma reatividade moderada contra a proteína rsCD4 e uma forte ligação às células HPB-ALL e à proteína rsCD4 em associação com domínios provenientes de receptores de quimiocina tal como CC-CKR5, verificou-se ser altamente eficaz na neutralização de isolados primários de HIV-1 (Tabelas 3, 7 e 13), porém menos eficaz na neutralização de uma cepa MN de HIV-1 derivada de linhagem de célula de laboratório (Tabela 13). Foi descoberto que B4 neutralizava isolados primários de HIV em um ensaio em microplaca in vitro a uma concentração < 10 µg/mL (Tabelas 3, 7 e 13) a uma eficácia muito maior do que os anticorpos com especificidade a CD4 exclusiva (Tabela 7). Assim, os isolados primários parecem ser preferencialmente sensíveis ao anticorpo complexo antígeno de célula hospedeira que compreende anti-CD4.

Foi também descoberto que a atividade neutralizadora de MAb

B4 estende-se para incluir a neutralização cruzada de HIV-2 e SIV (Tabela 14). Estes resultados (Tabelas 7 e 13) sugerem fortemente que entre as proteínas celulares associadas com HIV, há um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 e co-receptor (es), por exemplo, o receptor de quimiocina CC-CCKR5, que é um alvo para o anticorpo da neutralização cruzada. O (s) co-receptor (es) é (são) delineado (s) como co-receptor (es) para fusão de HIV, fatores de entrada ou supressivos.

O mecanismo para a ampla atividade de neutralização do complexo antígeno que compreende CD4 não está claro. O complexo de antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 pode representar papéis duplos na mediação da infecção por HIV e patogênese: tanto um recipiente de superfície da célula T para ligação a HIV como um recipiente para fusão de célula e entrada por HIV ou um fator HIV supressivo. Como usado aqui, "complexo antígeno de célula hospedeira que compreende proteína CD4" refere-se a um complexo que contém um receptor para ligação com HIV e co-receptor (es) associado (s), por exemplo, CC-CCKR5, para um fator supressivo de HIV ou fusão de célula e entrada por HIV. Este complexo molecular é exclusivamente expresso sobre a superfície de uma célula que expressa CD4. Serologicamente e funcionalmente, é diferente da molécula de proteína CD4 solúvel expressada recombinantemente.

Como usado aqui, "CD4" significa qualquer proteína CD4 codificada por um gene CD4 que ocorre naturalmente.

Como usado aqui, "células que expressam CD4 ou células CD4" são células que a apresentam a glicoproteína CD4 sobre a sua superfície. Tais células incluem CD4 que expressam linfócitos T, por exemplo, células T de sangue periférico, timócitos, esplenócitos etc. e células de linhagem de célula T derivada de leucemia ou de linfoma, por exemplo, células HPB-ALL ou SUP-T1.

Como usado aqui, "CD4 solúvel recombinante" ou "rsCD4" é um polipeptídeo que consiste de AA_1-AA_{375} (Figura 1, SEQ ID Nº. 1) de CD4 humano.

Como usado aqui, "complexo antígeno de célula hospedeira que

compreende CD4" ou "complexo antígeno CD4 da superfície da célula" representa uma estrutura de membrana que compreende CD4 como uma glicoproteína de 50 KD compreendida de quatro domínios extracelulares, um domínio de transmembrana e um domínio citoplásmico (Figura 1, SEQ ID Nº. 1) que é complexado com outras proteínas de célula hospedeira envolvida, tais como domínios provenientes de receptores de quimiocina.

CD4 foi inicialmente descrito como um marcador de superfície da célula para linfócitos T-auxiliares. Foi descoberto subseqüentemente que CD4 é expressado esparsamente sobre monócitos, Langerhans, células microgliais e subconjuntos de células B. Foi descoberto que a molécula de CD4 também participa diretamente na ativação de células auxiliares T antígeno-específicas através de sua função como um receptor para a molécula MHC de classe II. Em 1984, verificou-se que CD4 humano é o receptor para HIV (Dalgleish e outros, Nature, 1984, 312: 763). A ligação de glicoproteína envoltório de HIV, gp120, para CD4 representa a etapa inicial em entrada viral na célula alvo.

A molécula de CD4 tem sido mapeada extensivamente por estudos de ligação com painéis de anticorpos monoclonais específicos CD4 e por deduções negativas tal como correlação de modificações estruturais de CD4, por exemplo, substituições, eliminações ou inserções de aminoácidos, com mudanças funcionais resultantes em CD4 (Sattentau e outros, Science, 1986, 234: 1120; Peterson e Seed, Cell, 1988, 54: 65; Jameson e outros, Science, 1988, 240: 1335; Sattentau e outros, J Exp Med, 1989, 170: 1319; Hasunuma e outros, J Immunol, 1992, 148: 1841; Burkly e outros, J Immunol, 1992, 149: 1779; Davis e outros, Nature, 1992, 358: 76). Aqueles estudos de mapeamento permitiram a construção de um mapa de estrutura-função para a molécula. Foi descoberto que muitos dos anticorpos monoclonais CD4-específicos têm atividades neutralizadoras contra cepas de laboratório de HIV. Nenhum dos anticorpos que se sabe terem atividade neutralizadora de HIV foi avaliado por sua capacidade de inibir a infecção in vivo por isolados primários por meio de um modo de exposição pré- ou pós-HIV. Nenhum destes anticorpos foi relatado como sendo reativo a um com-

plexo de antígeno de célula hospedeira compreendendo CD4, particularmente quando associado com domínios provenientes dos receptores de quimiocina.

O primeiro domínio extracelular de CD4 compartilha homologias com imunoglobulina a três regiões que determinam complementaridade (CDRs) similares àquela de cadeias de imunoglobulina. Foi descoberto que *tanto o domínio 1 como o domínio 2 da região extracelular da molécula* de CD4 contribuem para os sítios de ligação para as moléculas de MHC de classe II enquanto apenas o domínio 1 estava envolvido com a ligação do HIV e a formação de sincícios. Foi descoberto que os sítios de ligação para glicoproteína gp120 envoltório de HIV estavam localizados na alça semelhante a CDR2 do domínio 1 (Peterson e Seed, Cell, 1988, 54:65; Landau e outros, Nature, 1988, 334:159; Clayton e outros, Nature, 1988, 335:363; Arthos e outros, Cell, 1989, 57:469; Sattentau e outros, J Exp Med, 1989, 170:1319). Foi descoberto que uma área discreta que se sobrepõe à região CDR3 no domínio 1 estava envolvida na formação de sincícios (Kalyanaraman e outros, J Immunol, 1990, 145:4072; Camerini e Seed, Cell, 1990, 60:747; Corbeau e outros, J Immunol, 1993, 150:290).

A partir destas referências, pode ser concluído que os anticorpos *específicos para CD4 provavelmente interagem com o sistema imu*nológico de diversas maneiras: primeiro, bloqueiam a interação CD4-classe II entre células T que expressam CD4 e outras células T ativadas, células B ou monócitos; segundo, liberam sinais para as células T, inibindo assim as funções imunorreguladoras normais mediadas por CD4 célula T; terceiro, induz morte celular de célula espressando CD4 por apoptose quando ativada for um encontro simultâneo das moléculas receptoras de células T e quarto, bloqueiam as interações entre CD4 e HIV, para inibir a imunopatologia mediada por HIV. Baseado nestas conclusões, os anticorpos a CD4 parecem ser bons candidatos para evitar e tratar infecção por HIV e doenças associadas a HIV inclusive AIDS. E, em um nível mais geral, os *anticorpos a CD4 podem ser úteis para evitar respostas imunológicas inde*sejáveis, tal como rejeição de transplante ou para curar doenças auto-

imunes tais como artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico ou psoríase. Os anticorpos anti-CD4 têm sido o assunto de muitos estudos. Era de se esperar que os anticorpos que bloqueiam a ligação de gp120 de HIV a CD4 evitassem a formação de sincícios e evitassem a infecção por HIV.

Foi demonstrado que os dois anticorpos anti-CD4 bem caracterizados, Leu3A e OKT4A bloqueiam eficazmente a formação de sincícios induzida por HIV. O epítopo reconhecido por MAb Leu3A foi mapeado precisamente até um alinhamento de 15 aminoácidos AA_{49}-AA_{63} que sobrepõe a região de CDR2 do sítio de ligação gp120 de HIV-1 por Chiba, U.S. 5.171.838. O epítopo reconhecido por MAb OKT4A foi mapeado a um sítio CD4 que se sobrepõe ao sítio de ligação gp120 de HIV-1, entre AA_{16}-AA_{49} (Jameson e outros, Science, 1988, 240:1336, Nota: Há um deslocamento da armação de 9 aminoácidos entre a seqüência de CD4 divulgada na publicação de Jameson e aquela apresentada na SEQ ID Nº. 1, Figura 1 da presente invenção). No entanto, verificou-se que ambos os anticorpos têm aplicações limitadas no tratamento da infecção por HIV porque eles falham em ligar ou agir sobre uma molécula de CD4 que já está ligada a gp120 do HIV (Burkly e outros, WO 92/09305). Parece ser impedimento estérico causado pela proximidade dos epítopos ao sítio de ligação de gp120.

Outros anticorpos anti-CD4 que foram relatados ter algum efeito sobre a formação de sincícios induzida por HIV, inclusive MT151, MT413, 13B8-2, OKT4E, VIT4 e MT321 ((Dalgleish e outros, Nature, 1984, 312: 763; Sattentau e outros, Science, 1986, 234: 1120; Davis e outros, Nature, 1992, 358: 76; Corbeau e outros, J Immunol, 1993, 150:290). Estes anticorpos são relatados para ligar determinantes próximos à região CDR3 do primeiro domínio, que são distintos dos epítopos ligados por OKT4A e Leu3A. No entanto como Leu3A e OKT4A, eles também falham em ligar as moléculas de CD4 já ligadas a HIV gp120, limitando a sua utilidade (Burkly e outros, WO 92/09305).

Foi também demonstrado que um outro grupo de anticorpos monoclonais anti-CD4, inclusive MAb 5A8, como descrito em Burkly e outros, ibid. inibe a formação de sincícios mediada por HIV. Os resultados

dos estudos de mapeamento do epítopo (p. 81-82, WO 92/09305) para caracterizar MAb 5A8 levaram às descobertas de que o 5A8 reconheceu um epítopo conformacional de CD4 que compreende o primeiro e o segundo domínio de CD4 e que ambos são necessários e "suficientes" para a ligação do 5A8. Foi também descoberto que AA_{83}-AA_{105} do filamento beta semelhante a bastão que liga o primeiro e o segundo domínio têm influência e AA_{105}-AA_{131} do segundo domínio são absolutamente necessários para ligação de 5A8 a CD4. Parece não haver envolvimento algum do terceiro e do quarto domínio de CD4 e de outros antígenos da superfície da célula complexada.

*Houve sugestões anteriores para empregar anticorpos mono*clonais CD4-reativos que foram mostrados inibir a ligação de HIV a células CD4 positivas e/ou para inibir formação de sincícios HIV-induzida como agentes imunoprofiláticos passivos para evitar a infecção por exposição acidental e para interromper transmissão vertical da mãe infectada à prole (Rieber e outros, Lancet, 1990, 336:1007; Rieter e outros, PNAS, 1992, 89: 10792; e Attanasio e outros, J Infect Dis, 1993, 168:515). Entretanto, a maioria destes anticorpos foi avaliada simplesmente por suas atividades de neutralização in vitro contra cepas de laboratório de HIV e nenhuma foi avaliada por sua capacidade de inibir infecção in vivo por isolados primários através de uma aplicação pré- ou pós-exposição.

Foi agora descoberto que tais resultados da neutralização viral in vitro não se traduzem em eficácia in vivo contra HIV. A falha de rsCD4 *exercer efeito antiviral em pacientes infectados com HIV-1 (Daar e outros,* PNAS USA, 1990, 87: 6574-6578) a capacidade de neutralização in vitro embora potente é especialmente bem conhecida.

Antes da presente invenção, nenhum dos anticorpos anti-CD4 conhecidos foi relatado como sendo capaz de se ligar a ou entrar em contato íntimo com todos os quatro domínios de CD4, para ser capaz de bloquear a ligação inicial de gp120 do HIV a CD4 humano, enquanto também neutralizando eficazmente a infectividade de diversos isolados primários de HIV tipos 1 e 2 e SIV e que tem a capacidade de agir assim, através de um

mecanismo antiviral de pós-ligação.

De acordo com a presente invenção, são fornecidos anticorpos que se ligam a, ou entram em contato com, todos os quatro domínios de CD4 e ainda têm ligação melhorada quando associados com receptores de quimiocina. Estes anticorpos são capazes de bloquear a ligação inicial de gp120 de HIV a CD4 humano, enquanto também neutraliza eficazmente a infectividade de isolados primários de HIV-1 proveniente de todos os clados e diversos isolados primários de HIV-2 e SIV e agem assim através de um mecanismo antiviral de pós-ligação. O anticorpo monoclonal e homólogos desta invenção marcam a primeira demonstração de eficácia in vivo por um anticorpo contra infecção por isolados primários de vírus da imunodeficiência tanto em primatas como em um sistema imunológico humano reconstituído do modelo do camundongo huPBL/SCID (Exemplos 17 e 18).

Os anticorpos com estas propriedades, por exemplo, MAb B4, claramente oferecem vantagens para intervenção terapêutica em infecção por HIV e em patologias relacionadas a HIV tal como AIDS. Diferentemente os anticorpos anti-CD4 conhecidos anteriormente, B4 ou seus homólogos podiam ser usados para intervir tanto antes como após a ligação do HIV ao complexo de antígeno da superfície da célula que compreende CD4 e irá fornecer proteção eficaz proveniente da infecção por isolados primários divergentes, inclusive proteção clado cruzada.

Os anticorpos monoclonais da presente invenção são os primeiros que se demonstrou serem eficazes in vivo para a neutralização de isolados primários de vírus da imunodeficiência em um modelo primário e no sistema imunológico humano reconstituído. Os resultados da neutralização in vitro e in vivo dos anticorpos da presente invenção como mostrado nos Exemplos 2-18, juntamente com a combinação altamente desejável de propriedades aqui descritas, mostram que eles serão úteis na prevenção da infecção por HIV de seres humanos por cepas em todo o mundo de HIV dos tipos 1 e 2, tanto antes como após a exposição acidental.

As propriedades dos anticorpos úteis para a presente invenção são aqui resumidas baseando-se nos resultados obtidos nos Exemplos 2-16

e 19-20:

1. Ligação a rsCD4 em um ensaio ELISA;

2. Ligação a células que expressam CD4 em um ensaio imunofluorescente em que o padrão de ligação está no formato de "coberturas" (Figura 3) quando examinado com um microscópio com fluorescência de alta resolução;

3. Bloqueio da ligação de gp120 de HIV a células que expressam CD4;

4. Ligação a células que expressam CD4 previamente ligadas com gp120 de HIV e

5. Neutralização de isolados primários em uma dosagem em microplaca in vitro a uma concentração de <10 µg/mL, de preferência a uma concentração na faixa de 0,01 - 10 µg/mL para 50% de neutralização e 0,1 - 35 µg/mL para neutralização de 90%. De preferência, os anticorpos da presente invenção também apresentam

6. Ligação melhorada a rsCD4 em um ensaio ELISA quando rsCD4 foi pré-incubado com peptídeos do domínio receptor de quimiocina;

7. Ligação a qualquer um dos quatro domínios de CD4 representados pelos peptídeos: AA_1-AA_{20}, AA_{81}-AA_{92}, AA_{79}-AA_{88}, AA_{60}-AA_{109}, AA_{118}-AA_{165}, AA_{235}-AA_{251}, AA_{297}-AA_{351} ou AA_{361}-AA_{375} de CD4;

Os anticorpos com estas características são especialmente úteis na profilaxia e no tratamento em seres humanos de doenças causadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são as células CD4 positivas. Conseqüentemente, a presente invenção fornece composições profiláticas e terapêuticas que compreendem o anticorpo ou homólogos do mesmo, úteis para a prevenção e o tratamento em seres humanos de doenças causadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são as células CD4 positivas, por exemplo, as doenças relacionadas a HIV, inclusive todos os estágios de AIDS, assim como métodos que usam estas composições de anticorpo.

Como usado aqui, um "homólogo de anticorpo" é uma proteína que compreende um ou mais polipeptídeos selecionados entre cadeias

leves de imunoglobulina, cadeias pesadas de imunoglobulina e fragmentos de ligação de antígeno das mesmas, que têm as propriedades de ligação e de neutralização relacionadas acima. Os homólogos de anticorpo incluem as imunoglobulinas intactas dos tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (assim como subtipos das mesmas), com cadeias leves kapa ou lambda. Os fragmentos dos anticorpos ou de seus homólogos com as características relacionadas acima, por exemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos F(v), monômeros ou dímeros de cadeia pesada, monômeros ou dímeros de cadeia leve, dímeros que consistem de uma cadeia pesada e uma cadeia leve ou similar estão incluídos no âmbito da presente invenção. Os homólogos de anticorpo também incluem anticorpos recombinantes humanizados e anticorpos quiméricos. Em todo o relatório descritivo, o uso do termo "anticorpos da presente invenção" e similares inclui seus homólogos.

Como usado aqui, o "complexo antígeno positivo de superfície da célula CD4" ou "complexo antígeno positivo de superfície da célula compreendendo CD4" é um sítio de ligação para os anticorpos da presente invenção. O complexo pode compreender CD4 em associação com domínios de receptores de quimiocina, por exemplo, CC-CKR5.

Como usado aqui, o "anticorpo recombinante humanizado" é um anticorpo derivado inicialmente de um mamífero não-humano no qual foi usada tecnologia recombinante para substituir alguns ou todos os aminoácidos não usados para ligação ao complexo da superfície da célula CD4 ou das células que expressam CD4 com aminoácidos provenientes de regiões correspondentes de uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina humana.

Como usado aqui, um "anticorpo recombinante quimérico" é um anticorpo derivado inicialmente de um mamífero não-humano, no qual foi usada tecnologia recombinante de DNA para substituir todas ou parte das regiões de dobradiças e constantes da cadeia leve, da cadeia pesada ou de ambas, com regiões correspondentes provenientes de uma cadeia leve ou de uma cadeia pesada de imunoglobulina de um mamífero de uma espécie diferente, de preferência um ser humano.

Como usado aqui, "Leu3A" é o anticorpo monoclonal murino

anti-CD4 comercialmente disponível em uma forma conjugada FITC proveniente de Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, sob o número do catálogo 340133.

Como usado aqui, "OKT4A" é o anticorpo monoclonal do camundongo anti-CD4 comercialmente disponível em uma forma conjugada FITC proveniente de Ortho Diagnostic Systems, Raritan, NJ sob o número do catálogo OK704010.

Como usado aqui, 5A8 é o anticorpo monoclonal do camundongo anti-CD4 descrito em PCT WO 92/09305.

Como usado aqui, um "agente B4-mimético" é um composto que causa pelo menos uma redução de 30% na ligação de anticorpo monoclonal B4 ao CD4 solúvel recombinante humano (rsCD4) ou ao complexo antígeno CD4 da superfície da célula humana sobre células que expressam CD4.

Anticorpos de Acordo Com Esta Invenção

Os anticorpos ou homólogos de anticorpo da presente invenção ligam-se especificamente a um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4. O complexo pode compreender CD4 em associação com domínios de receptores de quimiocina tal como CC-CCKR5. Isto é mostrado por sua ligação a células que expressam CD4 em um padrão característico de "coberturas" em um ensaio indireto por imunofluorescência como observado por microscópio com fluorescência de alta resolução.

Os anticorpos desta invenção ligam-se especificamente a epítopos descontínuos difundidos sobre um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4. O complexo pode compreender CD4 em associação com domínios de receptores de quimiocina tal como a molécula de CC-CCKR5, bloquear a ligação de gp120 de HIV às células que expressam CD4, ligarem-se ao complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 após ligação anterior por gp120 de HIV e inibir a infecção de células que expressam CD4 por diversos isolados primários de HIV.

São preferidos aqueles que bloqueiam a ligação de gp120 de HIV ao CD4 da superfície e que inibem a infecção de células de CD4 por todos os isolados primários de HIV tipos 1 e 2 por ambas as modalidades de

ligação pré- e pós-viral.

Os anticorpos mais preferidos de acordo com a presente invenção incluem os anticorpos monoclonais de camundongo designados B4 (IgG 2a), M2 (IgG1) e B13 (IgG2a), descritos abaixo.

Os anticorpos e seus homólogos desta invenção são profiláticos e terapêuticos para infecção por HIV e para todos os estágios de AIDS porque eles evitam infecção replicativa de célula hospedeira tanto antes como depois que o gp120 de HIV se ligou a um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 sobre a superfície de linfócitos CD4 positivos, assim eles são capazes de evitar infecção por HIV e retardar o espalhamento do vírus a células não-infectadas. Os anticorpos e os homólogos de anticorpo desta invenção são unicamente úteis proque eles inibem a infecção após a ligação de HIV a células que expressam CD4.

Ensaios de Seleção Para Anticorpos da Presente Invenção

O perito na técnica pode facilmente determinar, usando processos bem conhecidos, se os anticorpos particulares ou seus homólogos têm as características descritas acima para identificar anticorpos ou seus homólogos de acordo com a presente invenção.

Para determinar se os anticorpos em particular ligam-se a CD4 humano, pode ser usado qualquer ensaio de ligação convencional que empregue a proteína rsCD4 como o antígeno em fase sólida. Ensaios de ligação de rsCD4 úteis podem ser convenientemente realizados por formatos ELISA e similares, pelo uso de um anticorpo secundário marcado por enzima específico para imunoglobulinas de espécies das quais era derivado o homólogo de anticorpo.

A ligação de anticorpos ou de seus homólogos a um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 sobre células que expressam CD4 humano pode ser detectada corando-se as células com um anticorpo secundário marcado com fluorescência específico para imunoglobulinas da mesma espécie das quais é derivado o anticorpo ou seu homólogo que está sendo testado ou por formatos ELISA que empregam a proteína rsCD4 em combinação com peptídeos, por exemplo, peptídeo

2047, a partir de receptores de quimiocina. É usado um dispositivo para escolher célula ativada por fluorescência ("FACS") ou um microscópio com fluorescência de alta resolução para determinação da percentagem de células reativas com anticorpo e para avaliar a intensidade. O anticorpo que se liga às células pode ser observado por microscopia com fluorescência de alta resolução para mostrar o padrão de "cobertura" característico. As células que expressam CD4 úteis para esta finalidade são os linfócitos T que expressam CD4, tais como células T de sangue periférico, timócitos e esplenócitos ou uma linhagem de célula T de leucemia que expressa CD4 tal como HPB-ALL ou SUP-T. As células são separadas por métodos bem conhecidos. Por exemplo, os linfócitos T normais podem ser separados por centrifugação de Ficoll-Hypaque e células T malignas podem ser separadas por centrifugação.

Para determinar se um anticorpo em particular bloqueia a ligação de gp120 de HIV a CD4 humano, pode ser usado qualquer ensaio de competição adequado. Os ensaios úteis incluem, por exemplo, ELISA, ensaios indiretos de imunofluorescência e similares. De preferência, é medida a capacidade de gp120 de HIV marcado para se ligar a CD4 sobre células que expressam CD4 por incubação anterior das células com o anticorpo.

A capacidade que tem o gp120 de HIV de bloquear a ligação de um anticorpo monoclonal reativo CD4 à célula que expressa CD4 é avaliada por pré-incubação de gp120 de HIV com células que expressam CD4 e avaliar o grau até o qual o gp120 de HIV pré-ligado inibe a ligação do anticorpo às células. A ligação do anticorpo às células que expressam CD4 é avaliada por análise FACS ou por microscopia com fluorescência de alta resolução usando um anticorpo secundário marcado fluorescentemente contra a espécie a partir da qual é derivado o anticorpo a ser testado.

O gp120 de HIV usado nos ensaios acima pode ser fornecido por células infectadas com HIV, pelo próprio HIV, por células hospedeiras transformadas com o gene para gp120 de HIV, por células hospedeiras infectadas com vírus recombinante que expressa gp120 ou por gp120 isolado. É preferido o gp120 de HIV produzido recombinantemente. Um tal produto é

comercialmente disponível como um gp120 de HIV recombinante, purificado (American Biotechnologies, Inc., Cambridge, MA).

Para avaliar a capacidade de um anticorpo em particular para bloquear a formação de sincícios HIV-induzida entre as células que expressam CD4, pode ser usado qualquer ensaio para sincícios conhecido. De preferência, um isolado primário ou células de cultura de tecido que expressam CD4 infectadas com HIV (por exemplo, H9) são adicionadas a culturas de células MT-2. São então adicionadas quantidades variáveis dos anticorpos. Os controles negativos são suplementados com meio de cultura regular ou com um anticorpo irrelevante na presença de HIV. Também pode ser usado um controle positivo com cepas que induzem sincícios gigantes. Após incubação, todas as culturas são avaliadas por avaliação quantitativa visual de sincícios ou formação de placa. Desta maneira, é avaliada a capacidade que tem um anticorpo de bloquear a formação de sincícios ou de reduzir o número de placas formadas em uma cultura.

Para determinar se um anticorpo em particular inibe a infecção de células que expressam CD4 por HIV, qualquer indicação de infecção por HIV podia ser monitorada. Úteis em indicadores in vitro de infecção por HIV incluem, por exemplo, secreção de antígeno p24 de núcleo de HIV. De preferência, a inibição da infecção por HIV é determinada comparando-se os níveis de p24 de HIV na presença e na ausência do anticorpo em culturas de células que expressam CD4 infectadas.

Para avaliar a capacidade de um anticorpo em particular para bloquear a infecção por HIV de células que expressam CD4, pode ser usado ensaio quantitativo de antígeno viral p24. É preferido um ensaio de neutralização de antígeno p24 para a determinação da atividade de neutralização de anticorpo às diluições indicadas contra entrada de vírus (Wrin e outros, J Virol, 1995, 69: 39-48). Desta maneira a dosagem viral de p24 de HIV, a infectividade do vírus e a neutralização são avaliadas quantitativamente por determinação do antígeno p24 acumulado pelas culturas de PMBC por p24 ELISA (Coulter Immunology, Hialeah, FL).

Para determinar se um anticorpo em particular tem uma pro-

priedade melhorada de ligação a um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 sobre a ligação a uma molécula de rsCD4, é útil ELISA ou similar. Em tais ensaios, a capacidade do anticorpo de se ligar ao complexo antígeno, que compreende CD4, pode ser detectada pelo uso de um anticorpo secundário marcado específico para imunoglobulinas de cuja espécie foi derivado o anticorpo que emprega o rsCD4 que tinha sido pré-incubado com um peptídeo derivado de um domínio de um receptor suspeito de estar em associação com CD4. Os peptídeos são selecionados dos peptídeos provenientes do domínio 3 de $IL8R_{alfa}$ (p2029a), domínios 2 e 3 de CC-CKR2b (p2087a, p2088a), domínios 1 e 4 de CC-CKR3 (p2079a e 2082a) e domínio 3 de CC-CKR5 (p2047a).

Para determinar se um anticorpo em particular liga-se a um peptídeo humano CD4-derivado, é útil ELISA ou similar. Em tais dosagens, a capacidade do anticorpo se ligar a estes peptídeos pode ser detectada pelo uso de um anticorpo secundário marcado específico para imunoglobulinas da espécie da qual era derivado o anticorpo.

Para determinar se um anticorpo em particular se liga a um peptídeo humano derivado de receptor de quimiocina, é útil ELISA ou similar. Em tais dosagens, a capacidade do anticorpo se ligar a estes peptídeos pode ser detectada pelo uso de um anticorpo secundário marcado específico para imunoglobulinas da espécie da qual era derivado o anticorpo.

De preferência, a ligação de um anticorpo a um peptídeo é determinada por estudos de inibição em um rsCD4 ELISA primeiro incubando o anticorpo rsCD4 reativo com os peptídeos CD4 relacionados acima ou na Tabela 1, seguido por uma segunda incubação do complexo anticorpo-peptídeo com as microcavidades revestidas com rsCD4 ou revestidas com rsCD4/peptídeo receptor de quimiocina.

Tipos de Homólogos de Anticorpo desta Invenção e Sua Produção

Os anticorpos da presente invenção incluem tanto anticorpos como homólogos de anticorpo que apresentam a nova combinação de propriedades de B4, descritas acima, como caracterizadas pelos procedimentos descritos acima e nos Exemplos 2-18. Os anticorpos desta invenção podem

ser anticorpos monoclonais intactos, anticorpos recombinantes intactos, anticorpos recombinantes quiméricos intactos, anticorpos recombinantes humanizados intactos ou porções de ligação de antígeno dos mesmos que apresentam as propriedades de ligação e de neutralização de B4, M2 e B13.

A. Anticorpos Monoclonais

O tipo de anticorpo mais preferido da presente invenção é o dos anticorpos monoclonais intactos produzidos pelos hibridomas da presente invenção. A tecnologia para a produção de anticorpos monoclonais é bem conhecida (Ver geralmente, Kennett e outros, "Methods for Production and Characterization of Monoclonal Antibodies", em Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A new Dimension in Biological Analyses, Plenum Press, pp 363-419, 1980).

Preparações úteis de complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 úteis para fazer surgir anticorpos da invenção incluem células que expressam CD4 humanas, por exemplo, linfócitos de sangue periférico que expressam CD4. timócitos ou células provenientes de linhagens de célula T humana que expressam CD4.

Isto é contrário aos ensinamentos de Kung e outros, U.S. 4.381.295, que afirmaram: "In fact, the present applicants have discovered that using a T cell malignant cell line as the antigen caused formation of hybridomas which did not produce the desired (T4) antibody." (De fato, a presente Requerente descobriu que usando um linhagem de célula maligna de célula T como o antígeno causou a formação de hibridomas que não produziu o anticorpo desejado [T4]) (Coluna 4, linhas 54-56). Evidentemente, Kung e outros não relataram reatividade alguma de OKT4 observada com 8 entre 8 casos de leucemia linfática T-aguda (Coluna 14, linha 45) e a maioria das linhagens de célula T (linha 51) e assim concluiu que as linhagens de célula T malignas eram imunogênios indesejáveis.

O imunogênio para gerar o anticorpo da presente invenção é proveniente de uma fonte confiável de células que expressam CD4, de preferência, de uma linhagem de célula T tal como HPB-ALL que é derivada de um paciente com leucemina linfoblástica T-aguda (T-ALL) ou SUP-T1 que é

derivada de um paciente com linfoma de célula T não de Hodgkin (T-NHL).

Embora não se deseje ficar preso à teoria, acredita-se que usando células que expressam CD4 tal como HPB-ALL, células SUP-T ou MT-2 como o imunogênio, em vez de CD4 isolado ou formas solúveis recombinantes de CD4 (por exemplo, rsCD4), evoca a geração de anticorpos da presente invenção. O uso de células que expressam CD4 fornece a conformação mais favorável sobre a superfície de células para o CD4 que compreende complexo antígeno de célula hospedeira que não pode ser fornecido pela molécula CD4 sozinha.

A imunização pode ser realizada usando procedimentos padronizados. A dose unitária e o regime de imunização dependem da espécie de mamífero imunizado, de seu estado imunológico, do peso do corpo do mamífero e da quantidade do CD4 que compreende complexo antígeno de célula hospedeira na preparação administrada.

Na modalidade preferida, cada dose da preparação de célula que expressa CD4 usada para imunização de camundongos contém pelo menos aproximadamente 5-10 x 10^6 células. Tipicamente, o camundongo é imunizado intraperitonealmente no dia 0 com as células T que expressam CD4, lavado muito bem em PBS para ficar livre de quaisquer proteínas no meio de cultura, com ou sem adjuvante. Ao camundongo é então fornecido um primeiro reforço intraperitonealmente com as células T que expressam CD4 lavadas e re-susepnsas em PBS 14 dias até 6 meses após a imunização inicial e de preferência 15 a 30 dias após a primeira imunização, na ausência de qualquer adjuvante. Podem ser administrados reforços adicionais. Hiperimunização com reforços múltiplos sem adjuvante é preferida.

Três dias antes da fusão, é administrado intravenosamente o reforço final (células T que expressam CD4 em PBS sem adjuvante). O soro do mamífero imunizado é selecionado de acordo com a estratégia descrita acima e mais especificamente na Tabela 12 para a presença de anticorpos da invenção. Os esplenócitos são isolados de mamíferos imunizados cujos soros são reativos com rsCD4. Qualquer um dos muitos protocolos bem conhecidos úteis para fusão de esplenócitos e linhagens de célula imortali-

zadas é então usado para a finalidade de gerar hibridomas desta invenção.

Tipicamente, a linhagem de célula imortal (por exemplo, uma linhagem de célula de mieloma) e os esplenócitos são derivados das mesmas espécies de mamíferos. Os mamíferos úteis incluem camundongos, ratos e macacos rhesus. De preferência os esplenócitos são derivados de um camundongo endógamo (parente consangüíneo) de cepa BALB/c ou de um camundongo parente não-consangüíneo de raça cd1 (Jackson Labs, Bar Harbour, ME). As linhagens de célula imortais preferidas são linhagens de célula de mieloma de camundongo que são sensíveis a meio de cultura que contém hipoxantina, aminopterina e timidina ("meio HAT"). A linhagem de célula de mieloma de camundongo mais preferida é P3X63-AG8.653 (ATCC, Rockville, MD, nº. do catálogo CRL 1580). Tipicamente, as células de mieloma de camundongo HAT-sensíveis estão fundidas a esplenócitos de camundongo usando polietileno glicol ("PEG"). As células de hibridoma que resultam da fusão são então selecionadas usando meio HAT, que elimina células de mieloma não-fundidas e improdutivamente fundidas, enquanto os esplenócitos não fundidos morrem naturalmente após vários dias.

As células de hibridoma que produzem um anticorpo de acordo com a presente invenção são detectadas por seleção dos sobrenadantes de cultura de hibridoma que usam os ensaios de seleção descritos acima. De preferência, a seleção primária irá selecionar anticorpos que têm uma atividade "preferencial" de ligação a rsCD4 que foi pré-incubado com um peptídeo (por exemplo p2047) derivado do terceiro domínio externo do receptor quimiocina CC-CKR5 sobre sua atividade de ligação a rsCD4 apenas. A ligação melhorada é detectada por comparação dos resultados de ELISA obtidos pelo complexo rsCD4/p2047 correspondente vs. rsCD4. Esta seleção primária dupla simples (rsCD4/p2047 vs. rsCD4) irá eliminar uma maioria (>90%) de anticorpos que têm reatividades para não-CD4 compreendendo antígenos de superfície. Os anticorpos selecionados para sua reatividades preferenciais a rsCD4 em associação com o terceiro domínio externo da molécula de CC-CKR5 sobre rsCD4 são sujeitos a uma seleção secundária para ligação ao complexo antígeno de superfície da célula que

compreende CD4 por caracterização de sua ligação a células que expressam CD4, por exemplo, as células HPB-ALL ou SUP-T. Tal ligação é detectada por anticorpos secundários marcados fluorescentemente específicos para imunoglobulinas da espécie da qual foi derivado o anticorpo e avaliada por análise FACS ou por um microscópio com fluorescência e observada por microscopia com fluorescência. Os anticorpos que têm reatividade de ligação às células que expressam CD4 são ainda testados para sua capacidade de neutralizarem isolados primários de HIV-1, por exemplo, 23135, por um ensaio de neutralização em microplaca MT-2 para a media da inibição de formação de sincícios ou um ensaio de neutralização de antígeno p24 para a medida de inibição de replicação viral.

Aqueles clones que secretam anticorpos que exibem ligação preferencial a rsCD4/p2047 e/ou atividade de ligação a rsCD4 por ELISAs, que coram com brilho para células que expressam CD4 por um ensaio com imunofluorescência indireta e que apresentam atividades de neutralização contra isolado primário de HIV a uma concentração de <10 µg/mL são selecionados para clonagem e sub-clonagem finais.

Para produzir anticorpos desta invenção, que são anticorpos monoclonais intactos, os hibridomas testados positivos nos ensaios de seleção acima são cultivados em um meio nutriente sob condições bem conhecidas e durante um tempo suficiente para permitir que as células de hibridoma secretem os anticorpos monoclonais para dentro do meio de cultura. As técnicas de cultura de tecido e os meios de cultura adequados para as células de hibridoma são bem conhecidas (Ver, por exemplo, Kennett e outros, Monoclonal Antibodies, acima). São coletados os sobrenadantes de cultura de hibridoma condicionados que contêm os anticorpos desejados.

Alternativamente, o anticorpo desejado pode ser produzido por injeção das células selecionadas de hibridoma na cavidade peritoneal de um camundongo não-imunizado. As células de hibridoma se proliferam na cavidade peritoneal. secretando o anticorpo, que se acumula como fluidos ascites (Kennett e outros, Monoclonal Antibodies, acima). O anticorpo é colhido por retirada do fluido de ascites proveniente da cavidade peritoneal

com uma seringa.

Será entendido pelo perito da técnica que os anticorpos monoclonais de acordo com esta invenção podem ser purificados com facilidade a partir do sobrenadante de cultura de hibridoma condicionado ou a partir de fluido de ascites.

B. Anticorpos Recombinantes e DNA que Codifica os Mesmos

Os homólogos de anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser anticorpos monoclonais recombinantes produzidos por células hospedeiras transformadas com DNA que codifica as cadeias leves e pesadas de imunoglobulina de acordo com esta invenção. Os anticorpos recombinantes podem ser produzidos por técnicas de engenharia genética bem conhecidas.

Por exemplo, anticorpos recombinantes podem ser produzidos por clonagem de cDNA ou DNA genômico que codifica as cadeias leves e pesadas de imunoglobulina do anticorpo desejado a partir de um hibridoma que produz um anticorpo de acordo com esta invenção. O cDNA ou o DNA genômico que codifica aqueles polipeptídeos é então inserido em vetores de expressão recombinantes de modo que ambos os genes estão ligados operativamente a suas próprias seqüências reguladoras, para controle de transcrição e de tradução. O vetor de expressão e as seqüências reguladoras para controle de expressão são escolhidos para serem compatíveis para expressão na célula hospedeira selecionada. Tipicamente, tanto os genes de cadeia pesada como de cadeia leve são inseridos no mesmo vetor de expressão de modo que a expressão de ambos é operativamente ligada.

Podem ser usadas células procarióticas ou eucarióticas como hospedeiros de expressão. A expressão em células hospedeiras eucarióticas é preferida porque tais células são mais propensas do que as células procarióticas a se reunir e a secretar um anticorpo apropriadamente dobrado e imunologicamente ativo.

Será entendido que variações no procedimento acima estão dentro do âmbito da presente invenção.

É possível que as células hospedeiras produzam porções de

anticorpos intactos, tais como dímeros de cadeia leve ou dímeros de cadeia pesada, que também são homólogos de anticorpo de acordo com a presente invenção. Por exemplo, pode ser desejado transformar uma célula hospedeira com DNA que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada (mas não ambas) de um anticorpo desta invenção. Também pode ser usada tecnologia de DNA recombinante para remover parte ou todo o DNA que codifica uma ou ambas as cadeias leve e pesada que não é necessário para ligação a CD4, por exemplo, DNA que codifica fragmentos Fab'. As moléculas expressadas a partir de tais moléculas de DNA truncadas são homólogos de anticorpo de acordo com esta invenção.

C. Anticorpos Recombinantes Quiméricos e Humanizados e DNA que Codifica os Mesmos

O DNA que codifica os anticorpos recombinantes descritos acima pode ser usado como o ponto de partida para produzir anticorpos recombinantes quiméricos ou humanizados. Os anticorpos recombinantes quiméricos são produzidos por transformação de uma célula hospedeira com um vetor de expressão adequado que compreende DNA que codifica as cadeias leves e pesadas desejadas de imunoglobulina em que todas ou algumas das regiões dobradiça e constantes da cadeia pesada e/ou leve foram substituídas com DNA proveniente da região correspondente de uma cadeia de imunoglobulina leve ou pesada de uma espécie diferente. Quando o anticorpo recombinante original for não-humano, é preferida a substituição com seqüências humanas que codificam as regiões dobradiça e constantes. Um exemplo de anticorpo recombinante quimérico tem regiões de camundongo variáveis e regiões dobradiça e constantes humanas. Ver geralmente, US 4.816.397 e Morrison e outros, "Chimeric Human Antibody Molecules: Mouse Antigen-Binding Domains With Human Constant Region Domains", Proc Nat'l Acad Sci USA, 1984, 81: 6851-55.

São produzidos anticorpos recombinantes humanizados por transformação de uma célula hospedeira com um vetor de expressão adequado que compreende DNA que codifica as cadeias de imunoglobulina leves e pesadas não-humanas desejadas em que todo ou parte do DNA que

codifica os aminoácidos não envolvidos em complexo antígeno de CD4, incljusive seqüências de armação interspersas entre as regiões que determinam complementaridde (CDRs), foram substituídas com DNA provenientes das regiões correspondentes de uma cadeia leve ou pesada de imunoglobulina humana desejada. Ver geralmente, P. T. Jones e outros "Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse", Nature, 1986, 321: 522-25.

Os anticorpos recombinantes humanizados mais preferidos desta invenção têm os B4 "CDRs" interspersos entre seqüências de armação humana.

D. Homólogos de Anticorpo De Acordo Com Esta Invenção que são Gerados em Mamíferos Transgênicos

Hibridomas provenientes de camundongos homozigóticos para um locus de imunoglobulina endógeno inativado e contendo seqüências de transgene que codifica uma seqüência de cadeia pesada humana e uma seqüência de cadeia leve humana, secretam homólogos de anticorpo que compreendem uma seqüência de cadeia pesada humana e uma seqüência de cadeia leve humana. Estes homólogos de anticorpo transgênicos, que ligam-se à molécula de CD4 solúvel em água recombinante e mais preferencialmente a rsCD4 em associação com um peptídeo (por exemplo, p2047) derivado do terceiro domínio externo do receptor de quimiocina CC-CKR5 pelos respectivos ELISAs e a um complexo de antígeno de célula hospedeira humano que compreende a proteína CD4 por formação de mancha com imunofluorescência indireta de células que expressam CD4, que têm uma atividade neutralizadora dirigida contra isolados primários provenientes de todos os clados de HIV-1 e diversos isolados primários de HIV-2 e SIV e têm propriedades de ligação de anticorpo similares àquela de anticorpo monoclonal B4, podem ser gerados por esquemas de imunização e de seleção como aquele descrito na seção A, de subtítulo Anticorpos Monoclonais.

Mais especificamente, é usado um camundongo transgênico caracterizado seja pelo fato de ter genótipo HC1 ou HC2 como descrito em

Smith e outros, WO 93/12227, homozigótico para um locus J_H funcionalmente rompido e que prende um transgene capaz de se rearranjar para codificar uma cadeia pesada de seqüência humana e um transgene capaz de se rearranjar para codificar uma cadeia leve de seqüência humana como o hospedeiro para imunização em vez de camundongo BALB/c ou CD1 normal.

E. Homólogos de Anticorpo De Acordo Com Esta Invenção que Não São Anticorpos Intactos

Os homólogos também incluem fragmentos dos anticorpos da presente invenção. Tais fragmentos podem ser derivados de qualquer um dos anticorpos intactos descritos acima. Por exemplo, os fragmentos de ligação de complexo antígeno de célula hospedeira, assim como os polipeptídeos *monoméricos ou diméricos de comprimento total derivados dos anti*corpos descritos acima são eles mesmos homólogos de anticorpo de acordo com a presente invenção. Os homólogos de anticorpo úteis deste tipo incluem fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos F(v), monômeros ou dímeros de cadeia pesada, monômeros ou dímeros de cadeia leve, dímeros que consistem de uma cadeia pesada e uma leve e similares. Os fragmentos anteriores geralmente são homólogos de anticorpo úteis de acordo com a presente invenção.

Os fragmentos de anticorpo podem ser produzidos por processos químicos, por exemplo, por clivagem de um anticorpo intacto, com uma protease, tal como pepsina ou papaína e opcionalmente tratando o produto clivado com um agente redutor. Alternativamente, os fragmentos úteis podem ser produzidos usando células hospedeiras transformadas com genes de cadeia pesada ou leve truncada ou fusões de genes de cadeia pesada ou leve truncada. Os monômeros de cadeia pesada ou leve podem ser produzidos por tratamento de um anticorpo intacto com um agente redutor, tal como ditiotreitol, seguido por purificação para separar as cadeias. Os monômeros de cadeia pesada e leve podem também ser produzidos por células hospedeiras transformadas com DNA que codifica a cadeia pesada ou a cadeia leve desejada, mas não ambas. (Ver Sastry e outros, Proc Nat'l

Acad Sci USA, 1989, 86: 5728-32.

Células Que Produzem Anticorpos da Presente Invenção

A presente invenção também fornece células e culturas de célula que produzem os anticorpos desta invenção. Tais células incluem hibridomas que produzem anticorpos monoclonais desta invenção.

Além disso, a presente invenção fornece um processo de produção dos anticorpos da presente invenção por cultivo das células que produzem os anticorpos. Os processos de cultivo de tais células e isolamento dos anticorpos produzidos são bem conhecidos. Estes processos incluem técnicas de cultura de célula, assim como a geração de ascites.

É também fornecido um processo para a produção de hibridomas desta invenção que compreende a etapa de imunização de um mamífero não-humano com células que expressam CD4.

As células a serem usadas como um imunogênio para este processo são as células provenientes de uma fonte confiável de linhagem de célula que expressa CD4, por exemplo, uma linhagem de célula T derivada de leucemia ou linforma humano tal como HPB-ALL derivado de um paciente com leucemia linfoblástica T-aguda (T-ALL) ou SUP-T derivada de um paciente com T-célula linfoma não de Hodgkin (T-NHL) que é liberado intraperitonealmente em PBS ou adjuvante completo de Freund para a primeira imunização e administrado isento de qualquer adjuvante, intraperitonealmente ou intravenosamente para reforços subseqüentes.

Composições Farmacêuticas E Processos Desta Invenção

O anticorpo e homólogos dos mesmos desta invenção são úteis em composições profiláticas e terapêuticas para evitar doenças causadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são linfócitos que expressam CD4. Tais doenças incluem infecção por HIV e doenças associadas inclusive AIDS.

As composições farmacêuticas preferidas desta invenção para administração em seres humanos incluem os anticorpos da presente invenção, tal como um ou mais dos anticorpos monoclonais de camundongo B4 ou M2 ou B13 e homólogos dos mesmos tais como anticorpos recombi-

nantes quiméricos de camundongos/humanos, anticorpos recombinantes humanizados ou porções de ligação com antígeno daqueles anticorpos. As composições farmacêuticas qeu compreendem os anticorpos recombinante quiméricos de camundongos/humanos com propriedades de ligação similares exibidas por B4 ou M2 ou B13 ou anticorpos recombinantes humanizados com propriedades similares de ligação exibidas por B4 ou M2 ou B13 são as mais preferidas.

As composições farmacêuticas desta invenção também podem compreender outros agentes terapêuticos para a profilaxia da infecção por HIV. Por exemplo, os homólogos de anticorpo desta invenção podem ser usados em combinação com agentes anti-retrovirais que bloqueiam a transcritase reversa, tal como AZT ou com agentes que inibem a protease HTV. Adicionalmente, as composições farmacêuticas desta invenção podem também conter agentes antivirais tais como interferons ou agentes imunossupressores tal como ciclosporina.

Além disso, podem ser usados um ou mais homólogos de anticorpo em combinação com dois ou mais dos agentes terapêuticos anteriores. Tal combinação de terapias pode vantajosamente utilizar dosagens inferiores dos agentes terapêuticos administrados, evitando desse modo possível toxidez ou efeitos adversos associados a várias monoterapias.

As composições farmacêuticas desta invenção compreendem uma quantidade imunoterapeuticamente eficaz de um ou mais homólogos de anticorpo de acordo com esta invenção ou forma (s) derivatizada (s) dos mesmos e, de preferência, um veículo farmaceuticamente aceitável. Por "quantidade imunoterapeuticamente eficaz" entende-se uma quantidade capaz de evitar os efeitos imunocomprometedores de infecção por HIV ou AIDS ou de outras doenças causadas por agentes infecciosos cujos alvos primários são os linfócitos que expressam CD4. Por "veículo farmaceuticamente aceitável" entende-se um veículo que não provoque uma reação alérgica ou outro efeito desfavorável em pacientes aos quais ele é administrado.

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis adequados incluem,

por exemplo, um ou mais de água, soro fisiológico, soro fisiológico tamponado com fosfato, dextrose, glicerol, etanol e similares, assim como combinações dos mesmos.

Os veículos farmaceuticamente aceitáveis podem ainda compreender quantidades mínimas de substâncias auxiliares tais como agentes umidificadores ou emulsificadores, conservantes ou tamponadores, que melhoram o prazo de validade ou a eficiência do homólogo de anticorpo.

As composições desta invenção podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, formas de dosagem sólidas, semi-sólidas e líquidas, tais como comprimidos, pílulas, pós, soluções líquidas, dispersões ou suspensões, lipossomos, supositórios, soluções injetáveis e infusíveis. A forma preferida depende do modo de administração pretendido e da aplicação profilática ou terapêutica. As composições preferidas estão na forma de soluções injetáveis ou infusíveis.

As composições farmacêuticas preferidas desta invenção são similares àquelas usadas para imunização passiva de seres humanos com outros anticorpos. O modo de administração preferido é o parenteral.

Será evidente para os peritos na técnica que a quantidade imunoterapeuticamente eficaz de homólogo de anticorpo desta invenção irá depender do horário de administração, da dose unitária do homólogo de anticorpo administrado, se o homólogo de anticorpo for administrado em combinação com outros agentes terapêuticos, o status imunológico e a saúde do paciente e a atividade antiviral do homólogo de anticorpo em particular administrado.

A imunoterapia para profilaxia de infecção por HIV, isto é, quantidades imunoterapeuticamente eficazes por dose unitária de um homólogo de anticorpo que é um anticorpo intacto, na faixa de desde aproximadamente 1 até 100 mg/kg de peso do paciente, de preferência 5 mg/kg até 50 mg/kg de peso do paciente e mais preferivelmente 5 mg/kg de peso do paciente. As doses unitárias deviam ser administradas uma vez de duas em duas semanas e de preferência uma vez imediatamente após uma exposição acidental tal como uma picada de agulha. O efeito antiviral pode ser

medido por uma variedade de métodos, inclusive carga viral. Será reconhecido, no entanto que podem ser empregadas doses mais baixas ou mais altas e outros horários de administração.

Os regimes de tratamento para homólogos de anticorpo que não são anticorpos intactos podem diferir, dependendo de seu tamanho e das propriedades farmacêuticas.

De maneira que esta invenção possa ser melhor entendida, são apresentados os seguintes exemplos. Estes exemplos são apenas para a finalidade de ilustração e não devem ser considerados como limitativos do âmbito da invenção de alguma maneira.

EXEMPLO 1

Comparação da Suscetibilidade de Cepas de Laboratório e de Isolados Primários de HIV-1 a Neutralização in vitro por Anticorpos Dirigidos Contra gp120 de HIV-1

Procedimentos específicos para a determinação de neutralização de vírus por anticorpo.

Células. A linhagem de célula T humana MT-2 (Nº. 237, NIH AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog) foi mantida em meio Eagle modificado de Dulbecco suplementado com 15% de soro fetal bovino como descrito anteriormente (Hanson e outros, J Clin Microbiol, 1990, 28: 2030-2034). Células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) de doadores soronegativos de HIV-1 foram isoladas de unidades de camada leucócita fresca por gradiente de separação de Ficoll-Hypaque (Organon Teknika Corp., Durham, NC). As PBMCs resultantes foram estimuladas com PHA-P a 0,5% (Difco Laboratories, Detroit, MI). Após 3 a 4 dias, o meio que contém PHA-P foi removido e as células mantidas em RPMI com 15% de soro fetal bovino, 900 µg/mL de glutamina, antibióticos e 5% de interleucina-2 (Cellular Products, Inc., Buffalo, NY).

Vírus. HIV-1 MN é uma cepa adaptada em laboratório disponível como e mantida como uma cultura de célula H9 persistentemente infectada proveniente dos National Institutes of Health, Bethesda MD (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog nº. 402), da qual foram

preprados estoques concentrados sem célula. Os isolados primários de HIV-1 foram preparados a partir das PBMCs do paciente por co-cultivo de PBMC. Culturas em estoque de isolados primários foram preparadas por não mais do que 3-5 passagens através das PBMCs e clarificadas por centrifugação (Sawyer e outros, J Virol, 1994, 68:1342-1349). Elas foram fornecidas por Carl Hanson do California Departmen of Health Services, Berkeley CA.

Ensaio de Neutralização de Microplaca MT-2. A determinação título de anticorpo neutralizador de HIV emprega a pré-incubação de soros diluídos em série ou anticorpo com uma quantidade fixa de HIV seguida por infecção de células MT-2 sensíveis a HIV e formação de uma monocamada de célula que apresenta microplacas HIV-induzidas. Os resultados são avaliados quantitativamente das microplacas. O ensaio é adequado para isolados de SI apenas, sejam isolados adaptados em laboratório ou primários, porque as microplacas representam sincícios gigantes formados por células MT-2 fundindo-se aos focos de células infectadas por HIV; e, o ensaio é apropriado para avaliação da inibição tanto da transmissão do vírus para a célula como de célula a célula porque a inibição de formação de sincícios resulta da ação de anticorpo sobre partículas de HIV ou sobre células infectadas com HIV, isto é, o ensaio mede tanto a inibição da fusão de vírus para célula como da fusão de célula para célula induzida por HIV. A neutralização é então observada por redução de microplacas como observado por enumeração de placas coradas com iodeto de propídio uma semana depois (Ver, Hanson e outros, J Clin Microbiol, 1990, 28: 2030-2034). Neste ensaio, tanto vírus como soro ou anticorpo são diluídos em plasma humano normal desfribinado 50% reunido, para negar qualquer efeito melhorador não-específico ou inibidor.

Soros e Anticorpo. GP anti-gp120 N-terminal V3MN é soro reunido de cobaias que tinham sido hiperimunizadas (Wang e outros, Science, 1991, 254: 285-288) com um antígeno de peptídeo sintético correspondente à porção N-terminal do domínio V3 hipervariável de gp120 proveniente de HIV-1 MN (anti-N-terminal V3 MN). Os soros da coleção GP

anti-gp120 N-terminal V3 são anti-soros reunidos provenientes de três cobaias hiperimunizadas com uma mistura complexa de peptídeos que representam uma coleção de aproximadamente $1x10^{13}$ possíveis seqüências HIV-1 N-terminal V3 (coleção anti-N-terminal V3). Os imunogênios N-terminal V3 MN e N-terminal V3 usados para imunizações de cobaia foram imunogênios de peptídeo sintético N-terminal V3 multi-ramificado que podem ser usados para gerar anticorpo policlonal com atividade neutralizadora para diversas cepas de laboratório de HIV-1, como descrito em Walfield e outros (Koff e outros, ed., AIDS Research Reviews, Capítulo 18, Marcel Dekker: Nova York, 1993). Um outro anticorpo anti-gp120 é um anticorpo monoclonal humano recombinante (Mab) designado IgG1 b12 com especificidade pelo sítio de ligação gp120 para CD4 (anti gp120 CD4-BS) (Burton e outros, Science, 1994, 266: 1024-1027). IgG1 b12 foi gerado como um fragmento Fab a partir de uma coleção anticorpo-fago preparada a partir de medula óssea de um doador HIV-1 soropositivo assintomático a longo termo e foi convertido a um anticorpo humano integral por clonagem em um vetor de expressão IgG1 de DNA recombinante. Ele é considerado como o padrão de ouro de anticorpos para neutralização de diversos isolados primários de HIV (Burton e outros, acima).

Resultados:

Uma comparação das atividades de neutralização de HIV-1 de anti-soro de cobaia anti-N-terminal V3 MN, anti-soros de cobaia anti-N-terminal V3 e IgG1 b12 (anti-gp120 CD4-BS), é apresentada na Tabela 2.

As atividades de neutralização para os dois soros anti-N-terminal V3 foram determinadas sobre a cepa de laboratório HIV-1 MN e sobre dois isolados primários de HIV-1 (23135 e BR014). A atividade de neutralização foi determinada para o anticorpo de sítio de ligação anti-gp120 CD4 sobre os dois isolados primários, 23135 e BR014. As atividades de neutralização foram determinadas pelo Ensaio de Neutralização em Microplaca de MT-2 e são expressas na Tabela 2 nos pontos finais indicados (50% e 90%) como títulos de diluição para os anticorpos de soro policlonal e como concentrações (µg/mL) para o anticorpo monoclonal.

HIV-1 MN, a cepa adaptada em laboratório cultivada sobre a linhagem de célula T H9, era bastante sensível a neutralização tanto por anti-soros anti-N-terminal V3, com anti-N-terminal V3 MN sendo quatro vezes mais potente do que os anti-soros de coleção anti-N-terminal V3 cepa-específicos. Os isolados primários cultivados em PBMC eram refratários a neutralização por um dos soros anti-N-terminal V3. Entretanto, pelo menos um dos isolados primários era moderadamente neutralizável pelo sítio de ligação anti-gp120 CD4, IgG1 b12. Estes resultados são o reflexo das diferenças entre HIV-1 adaptado em laboratório e isolados primários em suscetibilidade a neutralização. Eles indicam a sensibilidade de cepas de NIV-1 adaptadas em laboratório a anticorpos anti-gp120 N-terminal V3 cepa-específicos, a resistência de isolados primários a tais anticorpos e a sensibilidade de alguns isolados primários a neutralização por anticorpos dirigidos contra a ligação de gp120 ao receptor de célula hospedeira CD4.

Tabela 2

Atividades de Neutralização de Anticorpos anti-gp120 Contra Cepa de Laboratório de HIV-1 e Isolados Primários de HIV-1 (Ensaio de Neutralização de Microplaca MT-2)

Amostra	Cepa de HIV			
	Cepa de Laboratório		Isolado de Campo Primário	
	50% de inibição	90% de inibição	50% de inibição	50% de inibição
GP α gp120 N-terminal V3 MN [G.P. Nº 4276-4280; 12 wpi*]	1:203,080	1:39,840	<1:10	<1:10
GP α gp120 N-terminal V3 cole-ção de [P. Nº 6546-6547; 8 wpi*]	1:23, 968	1:6,182	<1:10	<1:10
Mab IgG1 b12 (α gp120)	-	-	12,8 µg/mL	>50 µg/mL

*wpi: semanas após a imunização inicial

EXEMPLO 2

Caracterização das Atividades de Neutralização in vitro de Anticorpos Anti-Célula Hospedeira Contra Isolados Primários de HIV-1

Os anticorpos monoclonais foram purificados a partir de fluidos ascites e os anticorpos policlonais anti-gp120 N-terminal V3 de cobaia foram purificados do soro por cromatografia de afinidade com Proteína A. Os anticorpos foram reconstituídos como soluções estéreis em Soro Fisiológico Tamponado com Fosfato (PBS) a 1 mg/mL e foram preparados como diluições em série em PBS para ensaios de neutralização de HIV-1. Os anticorpos foram dosados individualmente e foram combinados às misturas dos grupos 7-15 de modo a mostrar interações sinergísticas entre anticorpos de diferentes especificidades ou falta dos mesmos. As atividades de neutralização contra HIV-1 foram determinadas sobre dois isolados primários pelo Ensaio de Neutralização em Microplaca MT-2 e são expressas nos pontos finais indicados (50% e 90%) como concentrações de anticorpo (µg/mL).

Resultados:

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostram as atividades de neutralização contra dois isolados primários de campo (23135 e BR014) de HIV-1 clado B de uma coleção de anticorpos que inclui anticorpos monoclonais murinos com especificidades para vários antígenos da superfície da célula (grupos 1 e 2, MAbs ID1 e 80A para HLA DR; grupo 3, MAb A1.4 para HLA A,B,C cadeia pesada; grupo 4, MAb H28 para beta$_2$ microglobulina; e gruopo 5, B4 para um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende a proteína CD4), uma preparação de anticorpo policlonal anti-gp120 N-terminal V3 MN proveniente de uma cobaia imunizada com um peptídeo sintético retirado do domínio N-terminal V3 de gp120 de HIV-1 MN (grupo 6), misturas destes anticorpos (grupos 7-15) e cinco anticorpos monoclonais adicionais dirigidos contra antígenos de célula T bem caracterizados (grupo 16, MAb para receptor de roseta E; grupo 17, MAb para antígeno T3; grupo 18, MAb para Leu1; grupo 19, MAb para antígeno T8; e, grupo 20, MAb C37 para receptor antígeno de célula-T) (Wang e outros,

Hybridoma 1986, 5:179-190).

Dos 11 anticorpos individuais testados no experimento da Tabela 3, apenas um MAb derivado de camundongo imunizado com linhagem de célula T HPB-ALL, B4 (grupo 5), que é uma modalidade preferida da presente invenção com uma única atividade de ligação em relação a um receptor complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4, demonstrou forte neutralização dos isolados primários. As misturas do anticorpo grupos 7-15 apresentaram atividades de neutralização somente se eles incluíam B4. Comparar os resultados para os grupos 7-10 e 15 dos grupos 11-14. Além disso, a comparação das atividades de neutralização do grupo 5, grupos 9, 10, 15 e grupos 7 e 8 mostram que a atividade de neutralização das misturas é contribuída somente por B4. Os outros anticorpos servem apenas para diluir a atividade de neutralização de B4 e há provas de alguma interação sinergística entre o anticorpo dirigido contra o complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 da invenção (MAb B4) e os outros anticorpos anticelulares ou o anticorpo anti-gp120 N-terminal V3. Nenhum dos anticorpos monoclonais dirigidos contra outros antígenos de célula T, que se sabe ser expressado sobre as células HPB-ALL, neutralizou os isolados primários de HIV até algum nível detectável.

Tabela 3

Neutralização de Isolados Primários de Campo de HIV-1 B Clado por Anticorpos Monoclonais Dirigidos Contra Antígenos de Célula Hospedeira (Ensaio de Neutralização em Microplaca MT-2)

Grupo		Tipo de Anticorpos		Cepa de HIV	
		23135		BR014	
		50% de inibição	90% de inibição	50% de inibição	90% de inibição
1	Mab α HLA DR (ID1)	> 100 μg/mL	>100 μg/mL	71,4 μg/mL	>100 μg/mL
2	Mab α HLA DR (80A)	> 100 μg/mL	>100 μg/mL	>100 μg/mL	>100 μg/mL
3	Mab α HLA A, B, C cadeia pesada (A1.4)	> 100 μg/mL	>100 μg/mL	47,6 μg/mL	>100 μg/mL
4	Mab α β_2 microglobulina (H28)	> 100 μg/mL	>100 μg/mL	>100 μg/mL	>100 μg/mL
5	Mab B4 (α HPB-ALL)	0,21 μg/mL	1,54 μg/mL	0,19 μg/mL	1,63 μg/mL
6	Policlonal IgG α N-terminal V3 MN	> 100 μg/mL	> 100 μg/mL	> 100 μg/mL	> 100 μg/mL
7	Ab mistura gps 1+2+3+4+5 [razão eq.]	1,05 μg/mL	4,37 μg/mL	0,75 μg/mL	4,13 μg/mL
8	Ab mistura gps 1+2+3+4+5+6 [razão eq.]	1,17 μg/mL	5,75 μg/mL	1,17 μg/mL	8,08 μg/mL
9	Ab mistura gps 1+5 [razão eq.]	0,51μg/mL	0,96 μg/mL	0,49 μg/mL	2,52 μg/mL

Tabela 3 (continuação)

Grupo		Tipo de Anticorpos		Cepa de HIV	
		23135		BR014	
10	Ab mistura gps 1+5+6 [razão eq.]	0,60 μg/M	3,51 μg/mL	0,75 μg/mL	3,32 μg/mL
11	Ab mistura gps 1+6 [razão eq.]	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M
12	Ab mistura gps 2+6 [razão eq.]	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M
13	Ab mistura gps 3+6 [razão eq.]	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M
Grupo		Tipo de Anticorpos		Cepa de HIV	
		23135		BR014	
14	Ab mistura gps 4+6 [razão eq.]	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M	> 100 μg/M
15	Ab mistura (Fr. gps 5+6 [razão eq.]	0,46 μg/M	2,52 μg/M	0,67 μg/M	3.14 μg/M
16	Mab α E receptor de roseta	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M
17	Mab α T3	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M
18	Mab α Leu 1	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M
19	Mab α T8	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M
20	Mab α T receptor antígeno de célula (C37)	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M	> 50 μg/M

EXEMPLO 3

Anticorpos Monoclonais Dirigidos Contra um Complexo Antígeno de Célula Hospedeira que Compreende CD4 Desenvolvidos Por Imunização de Camundongos BALB/c com Células HPB-ALL

Procedimentos Específicos para a determinação de reatividades de anticorpo monoclonal com rsCD4 e com células que expressam CD4

rsCD4. Foi obtido CD4 recombinante solúvel (rsCD4) purificado a partir de uma fonte comercial (American Bio-Technologies, Inc. Cambridge, MA) e proveniente de NIH (USA) AIDS Research and Reference Reagent Program/

Determinação de Reatividade anti-CD4 por ELISA rsCD4. ELISA rsCD4 foi conduzido por revestimento de placas de microtítulo com 96 cavidades por incubação durante toda a noite a 4°C com rsCD4 a 0,25 µg/mL usando 100 µL por cavidade em tampão $NaHCO_3$ 10 mM, pH 9,5. As cavidades revestidas com rsCD4 foram incubadas com 250 µL de 3% em peso de gelatina em PBS a 37°C durante uma hora para bloquear os sítios de ligação de proteína não-específicos, lavadas três vezes com PBS contendo TWEEN 20 a 0,05% em volume e então secas. Amostras teste (anticorpos monoclonais ou um soro anti-rsCD4 de cobaia) foram diluídas com PBS contendo 20% em volume de soro normal de bode, 1% em peso de gelatina e 0,05% em volume de TWEEN 20 a diluições de 1:20 volume para volume a não ser se for indicado de outra maneira. Foram adicionados 100 µL da amostra diluída a cada uma das cavidades e deixado reagir durante uma hora a 37°C. As cavidades foram então lavadas seis vezes com TWEEN 20 a 0,05% em volume em PBS para remover anticorpos marcados não ligados. 100 µL de IgG anti-camundongo de bode marcado com peroxidase de raiz forte ou IgG anticobaia de bode a uma diluição de 1:1000 em em soro de bode normal 1% em volume, 0,05% em volume de TWEEN 20 em PBS foi adicionado a cada cavidade e incubado a 37°C durante 15 minutos. As cavidades foram lavadas seis vezes com 0,05% em volume de TWEEN 20 em PBS para remover conjugado de anticorpo marcado não-ligado e reagido com 100 µL da mistura de substrato contendo 0,04% em peso de ortofenilenodiamina

(OPD) e 0,12% em volume de peróxido de hidrogênio em tampão de citrato de sódio pH 5,0, durante 15 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 100 µL de H_2SO_4 1,0 M e foi medida a absorbância a 492 nm (A_{492}).

Determinação de reatividade a células que expressam CD4 por formação indireta de mancha imunofluorescente. 0,5 x 10^6 células que expressam CD4 (por exemplo, células de linhagem de célula HPB-ALL ou SUP-T1) por cavidade foram lavadas duas vezes em PBS contendo 1% de BSA antes de sua incubação com o anticorpo monoclonal designado ou com o soro anti-rsCD4 de cobaia durante 45 minutos à temperatura ambiente. Após incubação das células com o primeiro anticorpo formador de mancha, as células foram lavadas durante umas duas vezes adicionais na mesma solução tamponadora de lavagem e foram incubadas com um reagente IgG anticamundongo de bode (FITC)-conjugado isotiocianato de Fluoresceína secundário ou IgG anti-cobaia de bode (FITC)-conjugado a uma diluição 1:500 (Cappel, Malvern PA) durante uns 45 minutos adicionais à temperatura ambiente. As células coradas foram lavadas de novo na mesma solução tamponadora de lavagem e as células processadas para análise com fluorescência por citofluorógrafo e/ou microscopia por imunofluorescência para determinação de percentagem de células coradas, intensidade de formação de mancha e mais preferivelmente o padrão de formação de mancha de antígeno por cada um dos anticorpos.

RESULTADOS:

A linhagem de célula HPB-ALL é uma linhagem de célula T humana maligna derivada de um paciente com leucemia linfoblástica aguda que tem o seguinte fenótipo de membrana revelado por imunofluorescência indireta: CD5+(T1/Leu1+), (T4/Leu3A+) que expressa CD4, CD8 + (T8/Leu2/C8+), CD3 + (T3/Leu4+), CD6+(T6/Leu6+), CD2+(T11/Leu5/D9+), CD25+(Tac+), HLA-A,B,C e beta$_2$microglobulina+, e HLA-DR- (Wang e outros, 1986, acima). Camundongos BALB/c foram imunizados intraperitonealmente com 5-10 x 10^6 células HPB-ALL que crescem exponencialmente lavadas com PBS em adjuvante completo de Freund para a imunização ini-

cial seguida por reforços intraperitoneais semanalmente a bi-semanalmente com 5-10 x 10^6 células que crescem exponencialmente lavadas com PBS suspensas em PBS sem adjuvante algum durante um total de três meses. Foi realizada esplenectomia 3 dias após a imunização intravenosa final com 5 x 10^6 células HPB-ALL lavadas com PBS e foi preparada uma suspensão de célula mononuclear. Os esplenócitos mononucleares foram tratados com polietileno glicol ou fusão a células de mieloma e hibridização somática de célula. As células de fusão foram distribuídas nas cavidades de placas microtítulo de 96 cavidades, incubadas e foram selecionadas as cavidades que continham anticorpos específicos para rsCD4, como detectado pelo ELISA rsCD4 descrito acima. Os hibridomas rsCD4-reativos foram colhidos e clonado em uma célula simples por um processo de diluição limitativo na presença de células alimentadoras em placas de cultura de tecido do fundo plano de 96 cavidades. Estes hibridomas subclonados foram subseqüentemente re-selecionados primeiro por sua reatividade com rsCD4 por rsCD4 ELISA e então, clones rsCD4 reativos foram ainda selecionados para as atividades de formação de mancha de seus anticorpos com células HPB-ALL. Apenas dois clones, designados como B4 e M2, tendo moderada reatividade rsCD4 e corando brilhantemente as células HPB-ALL foram selecionadas para reclonagem subseqüente e mantidas como ascites por injeção i.p. de 1 x 10^7 células em camundongos nu/nu escorvados com pristano. As propriedades de ligação e de neutralização dos anticorpos secretados por estes dois clones foram caracterizadas, juntamente com outros anticorpos monoclonais CD4-reativos, como mostrado nos Exemplos 4-13.

EXEMPLO 4

Anticorpos Monoclonais CD4 Específicos *De boa fé* Desenvolvidos por Imunização de Camundongos BALB/c com rsCD4

Resultados:

Camundongos BALB/c foram imunizados intraperitonealmente com 10 µg de rsCD4 em Adjuvante Completo de Freund (CFA) no dia 0 e reforçados com 10 µg de rsCD4 em Adjuvante Incompleto de Freund (ICFA) nos dias 21, 42 e 137 com um reforço final de 10 µg de rsCD4 em PBS in-

jetado intravenosamente no dia 145. Foram realizadas esplenectomia e fusão 3 dias após o último reforço. As cavidades que continham anticorpos reativos com rsCD4 foram selecionadas por rsCD4-ELISA. Quatro hibridomas, designados E6, E31, H5 e J33, foram colhidos e clonado sem célula única. Estes hibridomas foram subseqüentemente reclonados e mantidos para desenvolvimento de ascites. Como um controle, uma cobaia foi imunizada com 100 µg de rsCD4 em Adjuvante Completo de Freund no dia 0 e reforçado com 100 µg de rsCD4 em Adjuvante Incompleto de Freund nos dias 14 e 28. O soro proveniente deste animal foi obtido durante os dias 28 e 42 para servir como um controle positivo para anti-rsCD4.

Estes quatro hibridomas e sua ligação com anticorpo e as propriedades de neutralização foram caracterizadas e comparadas àquelas de MAbs B4 e M2, como mostrado nos Exemplos 6-10.

EXEMPLO 5

Anticorpos Monoclonais Específicos CD4 De boa fé desenvolvidos por Imunização de camundongos BALBA/c com Células HPB-ALL Seguida por Reforços com um Complexo gp120-rsCD4

Resultados:

Camundongos BALB/c foram imunizados intraperitonealmente com 5-10 x 10^6 células HPB-ALL em CFA no dia 0, reforçados com 5-10 x 10^6 células HPB-ALL em ICFA no dia 28, seguido por três reforços semanais com complexo HIV-1 gp120 rsCD4 (10 µg cada um) em ICFA começando no dia 56. Foram realizadas esplenectomia e fusão 3 dias após o reforço final. As cavidades que continham anticorpos reativos com rsCD4 foram identificadas. Três hibridomas, designados D5, E2 e I126, foram selecionados, clonados e reclonados e mantidos para desenvolvimento de ascites.

Estes três hibridomas e sua ligação com anticorpo e as propriedades de neutralização foram caracterizados e comparados àqueles de MAbs B4 e M2, como mostrado nos Exemplos 6-10.

EXEMPLO 6

Caracterização de Anticorpos Monoclonais e Policlonais CD4 Reativos por

sua Ligação Individual e Atividades de Neutralização de Isolado Primário de HIV

Procedimentos Específicos para a determinação de reatividades de anticorpo monoclonal com rsCD4, rsCD4 em associação com um peptídeo derivado da molécula superficial CCKR5, peptídeos CD4 sintéticos e com células que expressam CD4.

O procedimento para a determinação de neutralização do vírus por anticorpo é descrito no Exemplo 1, e os procedimentos para a determinação de ligação de anticorpo a rsCD4 e à superfície da célula de células que expressam CD4 são descritos no Exemplo 3. Somente procedimentos específicos para a determinação de reatividades de anticorpo com peptídeos CD4 sintéticos e ensaios de inibição de ELISA para confirmar os resultados do mapeamento de epítopo são fornecidos neste exemplo.

Peptídeos CD4 sintéticos. Os peptídeos relacionados na Tabela 1 foram sintetizados pela técnica de síntese em fase sólida de Merrifield em sintetizadores automatizados de peptídeo da Applied Biosystems (Modelos 430, 431 e 433A) usando química Fmoc. Após montagem completa do peptídeo desejado, a resina foi tratada de acordo com procedimento padronizado usando ácido trifluoroacético para clivar o peptídeo da resina e desbloquear os grupos protetores sobre as cadeias laterais de aminoácido. Para peptídeo cíclico, o peptídeo clivado foi dissolvido em 15% DMSO em água durante 48 horas para facilitar a formação de ligação de intradissulfeto entre cisteínas. Os peptídeos marcados na Tabela 1 por * foram assim cicli-zados. Outros peptídeos são lineares. Os peptídeos marcados com ‡ também contêm um espaçador gly-gly e um epítopo auxiliar de célula T proveniente do vírus da hepatite B (HBV). Os peptídeos clivados, extraídos e lavados foram purificados por HPLC e caracterizados por espectrometria de massa e HPLC em fase reversa.

ELISAs à base de peptídeo CD4 sintético. Os ELISAs à base de peptídeo CD4 sintético foram realizados essencialmente da mesma forma que o rsCD4 ELISA descrito aqui antes exceto para a etapa de revestimento de antígeno, em que as cavidades de microtítulo foram revestidas durante

uma hora a 37°C com o peptídeo CD4 designado a 5 µg/mL, em vez de rsCD4 a 0,25 µg/mL a 4 °C.

Ensaios de Inibição ELISA. A inibição induzida por peptídeo de ligação de anticorpo no rsCD4 ELISA foi medida por pré-incubação de amostras diluídas, a um ponto final diluição de ligação de rsCD4, com o peptídeo competidor à concentração indicada na faixa de desde 1,67 mg/mL até 16,7 µg/mL durante uma hora a 37 °C. A amostra pré-incubada e a mistura de peptídeo foram usadas diretamente no procedimento rsCD4 ELISA padronizado descrito aqui antes. Foi calculada inibição percentual em relação ao anticorpo monoclonal apropriado identicamente diluído que foi pré-incubado na ausência de peptídeo. A inibição induzida por rsCD4 de ligação de anticorpo no rsCD4 ELISA foi similarmente medida por pré-incubação de amostras diluídas, em um ponto final diluição de ligação de rsCD4, com o peptídeo competidor à concentração indicada.

Ensaio de inibição de imunofluorescência indireta

Para ensaios de inibição competitivos que empregam a técnica de formação de mancha por imunofluorescência indireta, foram incubadas células com vários reagentes que interferem a uma etapa especificada e lavados duas vezes na mesma solução tamponadora de lavagem entre quaisquer duas incubações.

Resultados:

Nove anticorpos monoclonais CD4-reativos selecionados dos experimentos de fusão acima descritos nos Exemplos 3, 4 e 5 foram ainda caracterizados por (1) seu padrão de reatividade com células que expressam CD4 por ensaio de imunofluorescência indireta, (2) seus determinantes antigênicos sobre CD4, determinados por ligação direta e ELISAs de inibição indireta usando como antígenos em fase sólida os peptídeo CD4 sintéticos cuidadosamente projetados apresentados na Tabela 1 e (3) sua capacidade de neutralizar isolados primários de HIV pelo Ensaio de Neutralização em Microplaca MT-2.

Caracterização de anticorpo. Com exceção do anticorpo monoclonal B4 que é uma imunoglobulina murina do tipo gama2a, kapa, todos os

outros anticorpos monoclonais são do tipo gama1, kapa (Tabela 7) como determinado pelo Murine Hybridoma Subisotyping Kit (Calbiochem, San Diego, CA, N°. do Cat. 386445). Dos nove anticorpos monoclonais CD4 reativos selecionados, todos mostraram imunoreatividade com a proteína rsCD4 como demonstrado pelo rsCD4 ELISA (Tabela 4) com MAbs J33, H5, E6, E2 e I26 que tem reatividades de ligação relativamente fortes, com D5 tendo reatividade de ligação relativamente fraca e com MAbs B4, M2 e E31 tendo reatividades de ligação moderadas. Foi descoberto que o soro anti-rsCD4 de cobaia obtido do sangramento no 28° dia de um animal previamente imunizado duas vezes com 100 µg de rsCD4 em adjuvantes completos e incompletos tem reatividade extremamente alta com rsCD4 por rsCD4 ELISA com um título de ponto final de $>10^5$. Foi demonstrado que este soro tem reatividades com domínios múltiplos de rsCD4 e é assim usado como um controle positivo anti-CD4 de boa fé em subseqüentes experimentos de caracterização de anticorpo. Ver, Tabelas 4, 7, 8.

Tabela 4

Mapeamento de Determinantes Antigênicos para Vários MAbs CD4 Reativos Usando Peptídeos Sintéticos Projetados provenientes de Domínios Extracelulares 1-4 da Molécula de CD4

MAb	A492nm de peptídeo individual ELISA													
	D1 (1-111)							D2 (112-181)		D3 (182-286)		D4 (297-375)		sCD4
	1816d (1-20)	1858 HBVTh- (1-20)	1403a (41-55)	1461a (35-59*)	1852 (68-92) (1-20)	1589a (79-96*)	1460c (60-109)	1612a (133-151*)	1817b (118-165*)	1689a (213-226*)	1693a (235-251*)	1868a (297-351*)	1701a (361-375*)	
B4	0,125	0,166	0,115	0,117	0,285	0,180	0,165	0,101	0,295	0,155	0,226	0,257	0,217	1,424
M2	0,201	0,189	0,084	0,081	0,192	0,129	0,159	0,090	0,179	0,113	0,168	0,158	0,185	0,871
E6	0,065	0,094	2,046	2,195	0,082	0,052	0,069	0,053	0,085	0,054	0,074	0,064	0,067	2,007
E31	0,062	0,088	0,062	0,071	0,080	0,064	0,069	0,077	1,936	0,060	0,085	0,063	0,065	0,936
H5	0,065	0,087	0,058	0,065	0,115	1,972	2,003	0,244	0,211	0,057	0,088	0,064	0,073	1,984
J33	0,132	0,138	0,067	0,083	1,046	0,063	0,100	2,348	2,022	0,063	0,087	0,116	0,081	2,059
D5	1,095	0,175	0,061	0,059	0,084	0,058	0,057	0,069	0,063	0,067	1,972	0,061	0,064	0,335
E2	0,088	0,182	0,058	0,058	0,060	0,054	0,054	0,063	0,069	2,169	0,063	0,056	0,055	2,083
I26	0,197	0,292	0,060	0,057	0,063	0,056	0,057	0,060	0,056	0,054	2,310	0,058	0,062	2,182
Gpα rsCD4 A492nm#	2,140#	1,936	0,180	2,027	1,995	0,241	0,498	2,027	1,965	0,164	0,336	1,921	0,126	1,935
Título (Log10)	>5	>5	<2	4,472	4,779	2,046	2,419	>5	>5	<2	2,168	>5	<2	>5

Amostras com A_{492} maior do que 0,150 são consideradas reativas e as reatividades estão sublinhadas (e sombreadas) com a finalidade de reconhecimento do padrão.

\# Leitura A492nm para soro anti-rsCD4 de cobaia (4 wpi) a diluição de 1:100.

Identificação de determinantes antigênicos para cada um dos anticorpos monoclonais. Esforços foram feitos para identificar os determinantes antigênicos na molécula de CD4 reconhecida por cada um dos anticorpos monoclonais por estudos diretos de ligação com a coleção de peptídeos CD4 sintéticos apresentada na Tabela 1. Estes peptídeos foram projetados de acordo com a estrutura tri-dimensional (3-D) disponível para os primeiros dois domínios de CD4 humano (Wang e outros, Nature, 1990, 348: 411) e a estrutura para o terceiro e o quarto domínios da molécula como projetada a partir de uma análise de homologia da estrutura 3-D de rato disponível (Brady e outros, Science, 1993 (260: 979) de modo a maximizar a reatividade cruzada serológica entre o CD4 sintético e nativo. A ligação aos fragmentos é comparada à ligação a rsCD4. A ligação para cada um dos anticorpos foi determinada por imunoensaios de enzima em diluições em série começando a uma concentração de anticorpo de 50 µg/mL para detecção de anticorpo murino ligado, usando os peptídeos indicados ou rsCD4 como antígenos em fase sólida. Os resultados de ligação são expressos como Absorbâncias no peptídeo e nos ELISAs à base de rsCD4. Para simplicidade de reconhecimento de padrão, foram apresentados para cada um dos anticorpos apenas os resultados obtidos à concentração mais alta de anticorpo na série de diluição que dá origem aos sinais de reatividade máxima de 50 µg/mL. As amostras de A_{492} maior do que 0,150 são consideradas reativas. A ligação positiva é representada na Tabela 4 pela palavra sublinhada. Este esforço intensivo de mapeamento resultou na identificação de sítios de ligação de peptídeo e localizações de seus epítopos em referência à seqüência primária de CD4 (Tabela 4) para todos os anticorpos monoclonais.

Os padrões de reatividade de peptídeo apresentados na Tabela 4 separaram os nove anticorpos em três grupos (Figura 2). Os anticorpos do primeiro grupo reconheceram epítopos lineares e incluíram dois anticorpos monoclonais designados como E6 e E31. Estes foram verificados para reconhecer epítopos lineares apresentados por um peptídeo sintético (Tabela 4). Mais especificamente, verificou-se que anticorpo monoclonal E6 recon-

hece um epítopo que foi localizado exclusivamente em uma região especificada por tão poucos quanto 15 aminoácidos (AA_{41}-AA_{55}) provenientes do primeiro domínio que se sobrepõe à região de ligação CDR2 HIV gp120 e E31 reagiu com peptídeo cíclico maior AA_{118}-AA_{165}.

Foi descoberto que os anticorpos do segundo grupo, que consistem de cinco anticorpos monoclonais H5, J33, E2, D5 e I26 reagem com peptídeos lineares derivados de duas regiões de CD4, com reatividade preferencial ocasional com um (Tabela 4), qualificando assim estes anticorpos como epítopos conformacionais descontínuos de reconhecimento. Mais especificamente, verificou-se que H5 reage primariamente com a região CDR3 (AA_{79}-AA_{96}) proveniente do primeiro domínio da molécula de CD4 enquanto tem uma reatividade modesta com o segundo domínio de CD4 caracterizado por dois peptídeos cíclicos AA_{133}-AA_{151} e AA_{118}-AA_{165}; verificou-se que J33 reage primariamente com o centro do segundo domínio de CD4 caracterizado por um peptídeo cíclico AA_{133}-AA_{151} enquanto tem uma reatividade moderada com o primeiro domínio, caracterizado por um dímero artificial de peptídeos (AA_1-AA_{20}) e (AA_{68}-AA_{92}) (P1852, Tabela 4) proveniente das regiões CDR1 e CDR3 respectivamente com ambas contribuindo para a formação de uma ligação de intradomínio dissulfeto; D5 reconheceu dois alinhamentos de aminoácidos provenientes tanto do primeiro como do terceiro domínios caracterizados por peptídeos cíclicos AA_1-AA_{20} e AA_{235}-AA_{251} respectivamente; E2 reconheceu principalmente um alinhamento de aminoácidos proveniente do terceiro domínio caracterizado por um peptídeo cíclico AA_{235}-AA_{251} enquanto tem uma reatividade modesta com a porção N-terminal (AA_1-AA_{20}) da molécula CD4 caracterizada por um peptídeo híbrido 1858; e I26 reconheceu uma área que se sobrepõe largamente àquela de D5 para reatividade preferencial com o terceiro domínio caracterizado por um peptídeo cíclico AA_{235}-AA_{251}.

Os anticorpos dos primeiros dois grupos obtidos a partir de camundongos imunizados com um rsCD4 purificado ou um complexo de rsCD4-gp120 bem definido, que demonstrou fortes reatividades com o rsCD4 nativo e reatividades definitivas com vários domínios da molécula de

CD4, são considerados anticorpos anti-CD4 de boa fé.

E finalmente, verificou-se que os anticorpos monoclonais B4 e M2, do terceiro grupo, reagem moderadamente com o rsCD4 nativo até mesmo a uma concentração de saturação (50 µg/mL) como mostrado pelo rsCD4 ELISA (Tabela 4), enquanto tem apenas fracas reatividades com peptídeos provenientes de diversas regiões AA_1-AA_{20}, AA_{79}-AA_{96}, AA_{118}-AA_{165}, AA_{213}-AA_{226}, AA_{235}-AA_{251}, AA_{297}-AA_{351} e AA_{361}-AA_{375} de CD4. Curiosamente, a reatividade de B4 para a região CDR2 do domínio 1, em que foi relatado que os anticorpos anti-CD4 bem conhecidos Leu3A e OKT4A se ligam, estava conspicuamente faltando quando comparada com suas reatividades com outros peptídeos. Os dois anticorpos deste terceiro grupo são qualificados como de reconhecimento de epítopos conformacionais difundidos descontínuos.

Identificação de peptídeos miméticos que interferem com as interações B4-rsCD4 e M2-rsCD4.

De maneira a decifrar melhor os sítios potenciais de contato sobre a molécula de CD4 tanto para B2 como para M2, foram testados em um ELISA os peptídeos de regiões próximas àquelas apresentadas como sendo responsáveis para as ligações B4-rsCD4 e M2-rsCD4 (Tabela 4) por sua capacidade de inibir as interações B4-rsCD4 e M2-rsCD4.

O sinal gerado na concentração do ponto final (por exemplo, 10 µg/mL para b4 e 20 µg/mL para M2) em um rsCD4 ELISA foi empregado como um controle positivo para os estudos competitivos de ligação de peptídeo.

A Tabela 5 representa resultados de por cento de inibição obtidos no rsCD4 ELISA quando os peptídeos CD4 projetados foram diluídos em série e individualmente incubados com 0,1 mL de B4 a 10 µg/mL antes da ligação de B4 a rsCD4 ligado em fase sólida. Os peptídeos foram empregados para inibição competitiva a concentrações de 1,67 mg/mL, 167 µg/mL e 16,7 µg/mL (conc 1, conc 2 e conc 3, respectivamente). Somente os resultados provenientes daqueles peptídeos que demonstram forte inibição ou melhoria de interação B4-rsCD4 são apresentados para comparação.

A melhoria é expressa por valores negativos para inibição.

A Tabela 6 representa os resultados obtidos da percentagem de inibição no rsCD4 ELISA quando os peptídeos CD4 projetados foram diluídos em série como na Tabela 5 e foram individualmente incubados com 0,1 *mL de M2 a 20 µg/mL antes da ligação de M2 a rsCD4 ligado em fase* sólida. Somente os resultados provenientes daqueles peptídeos que demonstram forte inibição ou melhoria de interação M2-rsCD4 são apresentados para comparação.

Como mostrado na Tabela 5, verificou-se que a ligação de B4 a rsCD4 é fortemente inibida por peptídeos CD4 provenientes das regiões AA_1-AA_{20}, AA_6-AA_{20}, AA_8-AA_{92}, AA_{79}-AA_{88}, AA_{154}-AA_{165} e AA_{297}-AA_{351}, indicando o envolvimento destas regiões na formação do epítopo conformacional associado a CD4. Contrariamente aos relatórios de Y. Chiba, acima para Leu3A monoclonal e Jameson e outros, acima para OKT4A, foi observada melhoria significativa para a ligação de B4-rsCD4 com peptídeos provenientes das regiões de AA_{36}-AA_{47}, sugerindo desse modo proximidade espacial porém não-envolvimento direto da AA_{30}-AA_{47} à ligação de B4. Os sítios de inibição são freqüentemente localizados ao redor das ligações intra-dissuleto (Tabela 5). Foi observado um padrão similar de inibição e de melhoria pelos vários peptídeos CD4 com apenas diferenças mínimas para M2 (Tabela 6).

Tabela 5

Inibição Competitiva ou Melhoria de Interação de "B4-rsCD4" por Peptídeos

Código do peptídeo	Descrição do peptídeo (CD4 Projetados)	% de inibição de interação "B4-rsCD4" de concentrações de peptídeo		
		Conc 1	Conc 2	Conc 3
1816d	CD4 (1-20)	64	53	29
1767b	HBVTh-CD4 (6-20)	76	68	35
1405b	HBVTh-CD4 (81-92)	89	52	20
1813b	HBVTh-CD4 (79-88)	93	69	32
1768a	CD4 (154-165)	82	37	6
1768b	HBVTh-CD4 (154-165)	76	44	11
1868a	CD4 (297-351*)	38	30	19
1624a	CD4 (36-47)	-215	-207	-108

* Peptídeo cíclico

Tabela 6

Inibição Competitiva ou Melhoria de Interação de "M2-rsCD4" por Peptídeos CD4 Projetados

Código do peptídeo	Descrição do peptídeo (CD4 Projetados)	% de inibição de interação "M2-rsCD4" de concentrações de peptídeo		
		Conc 1	Conc 2	Conc 3
1816d	CD4 (1-20)	74	60	17
1767b	HBVTh-CD4 (6-20)	82	72	43
1405b	HBVTh-CD4 (81-92)	88	53	16
1813b	HBVTh-CD4 (79-88)	92	70	37
1768a	CD4 (154-165)	86	36	19
1768b	HBVTh-CD4 (154-165)	85	45	25
1868a	CD4 (297-351*)	56	43	17
1624a	CD4 (36-47)	-261	-251	-141

* Peptídeo cíclico

EXEMPLO 7

Propriedades de Ligação dos Anticorpos Monoclonais para a Superfície da Célula de Células que expressam CD4

Os nove anticorpos monoclonais CD4-reativos juntamente com o soro anti-rsCD4 de cobaia foram usados em vários ensaios de imunofluorescência indireta para detecção de superfície de expressão de seus epítopos sobre as células HPB-ALL e para determinação da relação espacial entre a ligação de HIV-1 gp120 e os epítopos Cd4 reconhecidos pelos vários anticorpos CD4-reativos.

Resultados:

A Tabela 7 resume resultados obtidos para os anticorpos monoclonais murinos desenvolvidos a partir de três experimentos de fusão que se referem a (1) seus isotipos; (2) suas reatividades com rsCD4 por rsCD4 ELISA; (3) suas reatividades com CD4 superficial por um ensaio de imuno-

fluorescência indireta que registra por cento de reatividade de célula, grau de formação de mancha (0-3+) e padrões de ligação; (4) a capacidade de HIV gp120 ligado anterior de interferir com a ligação dos anticorpos ao complexo antígeno da célula hospedeira que compreende CD4; (5) a capacidade dos anticorpos ligados anteriores de inibir a ligação de HIV gp120 ao complexo antígeno da célula hospedeira de superfície que compreende CD4 e (6) capacidade dos anticorpos neutralizarem os isolados primários de HIV-1, por exemplo, 23135.

As representações das relações espaciais entre os sítios de ligação HIV gp120 sobre CD4 ligado à membrana da célula e os epítopos de CD4 reconhecidos pelos vários anticorpos monoclonais CD4 reativos são especificamente controladas pelos ítems (3), (4) e (5) da Tabela 7. Os padrões de ligação a CD4 são apresentados por formação de mancha por imunofluorescência indireta de células HPB-ALL usando isotiocianato de Fluoresceína IgG anti-camundongo marcado com (FITC), IgG anti-cobaia marcado com (FITC) ou gp120 marcado com (FITC). Os padrões são apresentados para ligação de anti-CD4 monoclonais murinos na ausência de gp120 (3), para a ligação de gp120 marcado com (FITC) na presença de anticorpos monoclonais pré-ligados (5) e ligação de anticorpos monoclonais na presença de gp120 pré-ligado (4). A singularidade da atividade de neutralização dos anticorpos monoclonais B4 e M2 comparada às atividades de neutralização de sete outros anticorpos monoclonais anti-CD4 que têm sítios de ligação sobre CD4 distintos daquele de B4 ou M2, mas em alguns casos próximos àquele de B4, é tratada nos itens (5) e (6).

Tabela 7

Reatividadesde MAbs com rsCD4 e Complexo Receptor de CD4 em Superfície e Inibição de Ligação de HIV gp120 a Células de CD4 por MAbs

Clone	(1) Isotípo Ig Murino	Imunogênio	(2) Reatividade a rsCD4	(3) Padrão de ligação de superfície HPB-ALL	(4) Reatividade de ligação de MAb a HPB-ALL após ligação anterior de gp 120 às células	(5) ligação gp 120-FITC a HPB-ALL após ligação anterior com inibição de MAB Sim ou Não	(6) 50% ponto final para neutralização de isolado primário de HIV-1
B4	γ2a,	HPB-ALL (PBS)	1,424	>90%; 3+(A)	>90%; 2+(A); Sim, parcial	0; Sim	0.21 μg/mL
M2	γ1,	HPB-ALL (PBS)	0,871	>90%; 3+(A)	>90%; 2+(A); Sim, parcial	0; Sim	0.38 μg/mL
E6	γ1,	rsCD4 (CFA, ICFA)	2,007	>90%; 2+(B)	0; Sim	0; Sim	59 μg/mL
H5	γ1,	rsCD4 (CFA, ICFA)	1,984	>90%; 1+(B)	>90%; 1+(B); Não	>90%; 1+(C); No	45,5 μg/mL
E31	γ1,	rsCD4 (CFA, ICFA)	0,936	>90%; 1+(B)	>90%; 1+(B); Não	>90%; 1+(C); No	>100 μg/mL
J33	γ1,	rsCD4 (CFA, ICFA)	2,059	>90%; 1+(B)	>90%; 1+(B); Não	>90%; 1+(C); No	>100 μg/mL
D5	γ1,	HPB-ALL (CFA,ICFA) + gp120 rsCD4 complexo	1,930	>90%; 1+(B)	0	>90%; 1+(C); No	>10 μg/mL
E2	γ1,	HPB-ALL (CFA,ICFA) + gp120 rsCD4 complexo	2,020	10%; 1+(B)	0	>90%; 1+(C); No	>10 μg/mL
I26	γ1,	HPB-ALL (CFA,ICFA) + gp120 rsCD4 complexo	0,793	0	0	>90%; 1+(C); No	>10 μg/mL
PBS	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	>90%; 1+(C); No	N/A
gpα rsCD4	N/A	rsCD4 (CFA,ICFA)	Log_{10} Título= 5	>90%; 1+(B)	>90%; 1+(B); Não	ND	<1:10 diluição

Foi verificado que o anticorpo monoclonal E6, que reconhece um determinante linear apresentado por um alinhamento de 15 aminoácidos derivados do primeiro domínio AA_{41}-AA_{55}) que se sobrepõe à região CDR2 do sítio de ligação CD4 gp120 (Wang e outros, Nature, 1990, 348: 411 e Ryu e outros, Nature, 1990, 348: 419) reage fortemente tanto com a proteína rsCD4 como com as células HPB-ALL indicando uma natureza da superfície mais exposta para este sítio de ligação de HIV.

Entretanto, apesar das reações relativamente fortes exibidas pelos anticorpos monoclonais anti-CD4 de boa fé J33, H5 e E2 à molécula de rsCD4, como demonstrado pelos resultados rsCD4 ELISA, foi observada apenas uma moderada formação de mancha das células HPB-ALL. A avaliação de 1+ para estes MAbs indica um status muito menos exposto para seus epítopos sobre o complexo antígeno CD4 de superfície da célula. Além disso, o soro anti-rsCD4 de cobaia caracterizado anteriormente (Exemplo 6) para alto reconhecimento de epítopos imunodominantes provenientes dos domínios 1, 2 e 4 assim como rsCD4, apresentou formação de mancha apenas moderada das células HPB-ALL pelo ensaio de imunofluorescência indireta, de novo indicadno uma exposição inferior global para a molécula de CD4 sobre a superfície de células CD4 positivas. Em contraste, ambos os anticorpos monoclonais B4 e M2 coraram intensamente as células apesar de sua reatividade relativamente moderada com rsCD4, indicando que o contato com o (s) sítio (s) sobre os co-receptor (es) sem ser CD4 estão envolvidos, co-receptor (es) que juntamente com CD4 formam complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4. Isto é também demonstrado pela inibição da interação de B4-rsCD4 por diversos peptídeos CD4-derivados (Tabela 5), indicativa de um maior complexo de antígeno que compreende a proteína CD4 sobre a superfície da célula (Figura 3) e sobre diferença estrutural entre rsCD4 e o complexo antígeno de superfície da célula que compreende CD4.

Inibição da ligação de gp120 a células de CD4 pelos anticorpos monoclonais. As características de ligação para estes anticorpos monoclonais foram também avaliadas por sua capacidade de inibir a ligação de HIV

às células que expressam CD4 (Tabela 7(5)) sob a condição de incubação anterior das células com um anticorpo monoclonal individual (100 µL a uma concentração de saturação de 50 µg/mL) ou PBS como um controle negativo, seguido por incubação subseqüente das células com 100 µL de HIV-gp120 a uma diluição 1:200. As células foram lavadas duas vezes entre incubações com anticorpos primários e secundários marcados.

Para células primeiro incubadas com PBS seguido por incubação subseqüente com o FITC-gp120, foi obtido um padrão de formação de mancha característica de pequenos aglomerados com um escore de brilho de 1+ (Tabela 7 e a Figura 3). Um tal padrão característico de formação de mancha FITC-gp120-HPB-ALL foi também obtido para células primeiro incubadas com anticorpo monoclonal H5, E31, J33, D5, E2 ou I26 seguido por formação de mancha FITC-gp120, demonstrando desse modo uma falta de inibição de ligação de FITC-gp120 por estes anticorpos e sugerindo uma falta de associação entre o sítio de ligação gp120 e os sítios de ligação gp120 destes anticorpos anti-CD4. No entanto, a formação de mancha anterior com anticorpo monoclonal B4, M2 ou E6 aboliu completamente o padrão característico de formação de mancha de FITC-gp120, indicando a forte natureza inibidora destes anticorpos sobre a ligação de CD4-gep120 e sugerindo associações entre o sítio de ligação gp120 e os sítios de ligação B4, M2 e E6. Como diferentemente de E6, o anticorpo B4 ou M2 não reconhece o sítio de ligação de HIV (isto é, a região CDR2) sobre o CD4, esta atividade inibidora de B4 ou M2 foi interpretada como impedimento estérico.

Inibição da ligação de anticorpo monoclonal a células que expressam CD4 por gp120. O efeito da ligação anterior de gp120 às células que expressam CD4 sobre a ligação subseqüente das células por estes anticorpos monoclonais CD4 reativos também foi avaliado.

10×10^6 células HPB-ALL foram primeiro incubadas com uma quantidade excessiva de gp120, 10 µg, da cepa IIIB de HIV (American Biotechnologies, Inc., Cambridge, MA), A 37°C durante 45 minutos. As células HPB-ALL tratadas com gp120 foram lavadas duas vezes no tampão de lavagem e então incubadas com o anticorpo monoclonal especificado de

acordo com o procedimento de formação de mancha por imunofluorescência indireta descrito aqui antes.

Foi verificado que apenas a ligação de E6 a células que expressam CD4 é completamente abolida por ligação anterior de gp120 (Tabela 7, (4)). O epítopo reconhecido por E6 (Tabela 4) foi mapeado próximo daqueles reconhecidos por OKT4A e Leu3A. A ligação de anticorpos monoclonais B4 e M2 às células que expressam CD4 não foi afetada significativamente pela ligação anterior de gp120 às células que expressam CD4, indicando que estes dois anticorpos podem se ligar às células que expressam CD4 após a ligação com HIV. Esta observação fornece um mecanismo possível para a capacidade de neutralização in vitro de anticorpo B4 a um nível de ligação pós-viral no Exemplo 16 (ver Tabelas 16 e 17) e a eficácia in vivo de B4 em prevenção pós-exposição de infecção por HIV como demonstrado no modelo de camundongo hu-PBL-SCID (Ver Exemplo 18, Tabela 20).

EXEMPLO 8

Neutralização de Isolado Primário de HIV pelos Anticorpos Monoclonais

Resultados:

Quando os nove anticorpos monoclonais CD4 reativos e o soro anti-rsCD4 de cobaia foram testados para sua capacidade de neutralizar isolado primário de HIV-1 23135 por um ensaio de microplaca MT-2 como descrito aqui (Exemplo 1), apenas B4 e M2 demonstraram atividade inibidora potente dando origem a uma inibição de 50% a concentrações de 0,21 e 0,28 µg/mL, respectivamente (Tabela 7, (6)). O anticorpo E6, que identifica um sítio próximo ao sítio de ligação HIV gp120, próximo aos sítios reconhecidos por OKT4A e Leu3A e H5 que reconhece principalmente um sítio localizado na região CDR3 do primeiro domínio de CD4, porém forneceu apenas neutralização marginal com concentrações 50% no ponto final de 59 e 45,5 µg/mL, respectivamente. Diferentemente de anticorpos monoclonais B4 e M2, os outros anticorpos monoclonais anti-CD4 de boa fé não apresentam uma atividade de neutralização do isolado primário como

medida por inibição de formação de microplaca (isto é, inibição de fusão de célula e infecção pelo isolado primário de HIV-1). Apesar da forte reatividade do soro anti-rsCD4 de cobaia com o rsCD4, este soro não inibiu a fusão de célula induzida por HIV e infecção até mesmo a uma alta anticoncentração de diluição de soro <1:10.

EXEMPLO 9

Imunização Ótima e Estratégia de Seleção para Seleção de Hibridoma

Baseado no informação obtida na Tabela 7, é concluído aqui e na Tabela 12 que a hiperimunização de camundongos com células que expressam CD4 sem adjuvante recém-lavadas conduz a geração bem-sucedida de hibridomas que secretam anticorpos altamente reativos com um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4. Para melhorar a freqüência de geração de clones de hibridoma reativos para células que expressam CD4, as células HPB-ALL ou SUPT1 podem ser primeiro incubadas com uma mistura de anticorpos monoclonais dirigidos contra antígeno da superfície da célula T, inclusive anticorpos dirigidos a HLA A-B, C, CD3, receptor de célula T, antígenos CD8, CD6, CD2 e CD5, para mascarar os antígenos de superfície HPB-ALL sem ser o complexo antígeno que compreende CD4 a partir da exposição ao imunossistema do hospedeiro, direcionando desse modo preferencialmente a imunorresposta do hospedeiro para o complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 da superfície da célula que contém tanto o receptor como o co-receptor (es) para HIV. Uma estratégia de seleção direta em três etapas que inclui primeiro a seleção de hibridomas que têm reatividade positiva com rsCD4 e/ou uma reatividade preferencial com rsCD4 pré-incubado com p2047, um peptídeo derivado do terceiro domínio externo do receptor de quimiocina CC-CKR5, sobre aquele com rsCD4, por ELISAs; seguido por seleção entre o rsCD4/p2047 e os clones rsCD4-reativos para aqueles que têm forte reatividade com células que expressam CD4 tal como células HPB-ALL ou SUP-T1 por ensaio de imunofluorescência indireta, seguido por seleção entre os hibridomas CD4-reativos em superfície para aqueles que

secretam anticorpos com atividades de neutralização para um isolado primário de HIV-1, como testado por um ensaio de redução de microplaca MT2 padronizado, é útil.

EXEMPLO 10

Seleção de Anticorpos Monoclonais CD4-Reativos com Propriedades de Ligação Similares Àquela de B4

Anticorpos Monoclonais com propriedades de ligação similares àquela de B4 podem ser facilmente identificados entre anticorpos CD-reativos pelo emprego de imunoensaios competitivos de inibição que detectam sinais B4 positivos gerados por meio de (1) anticorpo monoclonal B4 HRP-conjugado preparado como descrito aqui a seguir em um sistema rsCD4 ELISA ou (b) B4 biotinilado preparado como descrito aqui a seguir acompanhado por formação de mancha avidino FITC das células HPB-ALL em um sistema de ensaio de imunofluorescência indireta, como os métodos de comparação.

Procedimentos específicos para a biotinilação ou conjugação de enzima de anticorpo monoclonal B4

Biotinilação de anticorpo monoclonal B4 usando o éster de succinimida. O anticorpo monoclonal B4 foi purificado por cromatografia por afinidade de Proteína A e ajustado até 1 mg/mL em PBS. 0,71 mg de N-hidroxissuccinimida biotina (Biotin-X-NHS, Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN. Nº do Cat. 1008960) foi dissolvido em 0,31 mL de DMSO (Boehringer Mannheim Biochemicals, Nº do Cat. 1418165) seguido por adição de 5 mg de B4 em 5 mL de PBS resultando em uma razão molar de 50 para 1 para biotina e B4. A mistura foi agitada durante duas horas à temperatura ambiente seguido por diálise extensiva a 2-8°C contra PBS resultando em uma concentração final de B4 a 0,71 mg/mL. O B4 biotinilado foi usado como o traçador em um ensaio de formação de mancha com imunofluorescência competitiva para inibição de interação de "células que expressam B4-CD4" por vários anticorpos monoclonais.

Conjugação de peroxidase de raiz forte (HRP) a anticorpo monoclonal B4 pelo processo de periodato. O procedimento de conjugação

de enzima-anticorpo foi realizado essencialmente como descrito por Wilson e Nakane, (Knapp e outros, eds, 1978 Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Immunofluorescence and Related Staining Techniques, p215) a uma razão molar de enzima para anticorpo de 0,48 para 1. O conjugado peroxidase de raiz forte (HRP)-B4 foi dialisado extensivamente em PBS após conjugação com uma concentração resultante de anticorpo de 0,18 mg/mL. Este conjugado foi usado a 50 µg/mL em um ELISA comparativo para inibição da interação de "B4-rsCD4" por vários anticorpos monoclonais anti-CD4.

Detecção e inibição competitiva. A Tabela 8 representa os resultados obtidos de um estudo que envolve inibição competitiva de interação de "complexo que compreende CD4 B4-superfície biotinilado" com nove anticorpos monoclonais anti-CD4 (MAbs, B4, M2, E6, H5, J33, E31, D5, E2 e I26) e um soro anti-rsCD4 de cobaia. O estudo de inibição competitiva foi realizado por um ensaio de imunofluorescência indireta, em que 0,5 x 10^6 células HPB-ALL que expressam CD4 foram incubadas com anticorpos individuais a uma concentração de saturação de 10 µg/mL a 100 µL por teste ou o soro de cobaia a uma diluição de 1:50 também a 100 µL por teste, lavado muito bem, seguido por uma segunda formação de mancha com 100 µL do B4 biotinilado (a uma diluição de 1:1000 de uma solução de estoque de 0,71 mg B4/mL), lavadas muito bem, seguido por uma formação de mancha terciária com 100 µl de um traçador avidino FITC (Pierce Chemical Co., Rockford IL, Nº de Cat. 21221) a uma diluição de 1:250 em PBS (pH 8,2).

A Tabela 9 representa os resultados obtidos em um estudo que envolve a inibição competitiva de estudo de interação de "HRP B4-rsCD4" com nove anticorpos monoclonais anti-CD4 (MAbs, B4, M2, E6, H5, J33, E31, D5, E2 e I26). O estudo de inibição competitiva foi realizado por um rsCD4 ELISA em que as cavidades em fase sólida revestidas com rsCD4 foram pré-tratadas com peptídeo CD4 1624a para melhorar sinais de ligação B4. As cavidades revestidas com rsCD4 foram incubadas com 30 µL de anticorpos individuais (50 µg/mL a 100 µl por cavidade) na presença de an-

ticorpo monoclonal B4 HRP-conjugado 50 µg/mL a 120 µl.

Resultados:

Como mostrado na Tabela 8, entre todos os anticorpos monoclonais e o soro anti-rsCD4 de cobaia testados, apenas B4 ou M2 inibiu eficazmente a tiotina-B4 (a uma diluição de 1:1000) e FITC avidina (Pierce Chemical Co., a uma diluição de 1:250) formação de mancha das células HPB-ALL em um sistema de ensaio de imunofluorescência indireta. Similarmente como mostrado na Tabela 9, de todos os anticorpos monoclonais testados, somente anticorpos monoclonais M2 e B4 exerceram mais do que 45% de inibição sobre a ligação de HRP-B4 à molécula de rsCD4 no rsCD4 ELISA. Assim, pode ser realizada seleção eficaz de anticorpos que secretam hibridoma tendo propriedades de ligação similares àquela de B4, inclusive sua atividade de neutralização contra isolados primários de HIV, por imunoensaios de competição usando B4 HRP-conjugado ou biotinilado como o traçador, um processo de seleção que é significativamente mais fácil do que seleção por ensaios funcionais in vitro tal como o ensaio de neutralização em microplaca MT-2 padronizado. Mais notavelmente, nenhum dos sete anticorpos monoclonais anti-CD4 de boa fé (isto é, MAbs, E6, H5, J33, E31, D5, E2 e I26) pode competir eficazmente com B4 para reatividade a rsCD4 e sítios de ligação complexo de receptor CD4 em superfície (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8

Inibição de "Complexo Receptor de Biotin MAb B4-Superfície CD4" Interação por Anticorpos Monoclonais Reativos

Mab (10 μg/mL)	Imunofluorescência indireta		
	% de Células positivas	Intensidade de formação de mancha	Inibição
PBS + Biotinilado b4 + Avidino FITC	>95	2,0	Controle positivo
PBS + Avidino FITC	0	0	N/A
B4	0	0	Sim
M2	0	0	Sim
E6	>95	2,0	Não
H5	>95	2,0	Não
E31	>95	2,0	Não
J33	>95	2,0	Não
D5	>95	2,0	Não
E2	>95	2,0	Não
I26	>95	2,0	Não
G.P. αrsCD4 soro	>95	2,0	Não

Tabela 9

Inibição de Interação "HRP MAb B4-rsCD4" por Anticorpos Monoclonais Reativos

MAb a 50 µg/mL	$A_{492\ nm}$	% de Inibição
PBS	1,658	0
Blank	0,049	N/A
B4	0,338	80
M2	0,884	47
E6	1,262	24
H5	1,222	26
E31	1,494	10
J33	1,105	33
D5	1,468	11
E2	1,533	8
I26	1,530	8

1. Competição ELISA foi realizada com placa revestida com rsCD4 a 0,25 µg/mL e 0,1 mL por cavidade, a 4°C durante toda a noite. A placa foi tratada com um peptídeo CD4 sintético 1624 (Tabela 1) a 50 µg/mL e 100 µL por cavidade, a 37°C durante uma hora para melhorar a reatividade.

2. Anticorpos monoclonais foram testados individualmente para inibição competitiva de anticorpo monoclonal peroxidase-conjugado B4 (B4-HRP) ligação a rsCD4. 120 µL de B4-HRP a 50 µg/mL foram misturados com 30 µL de um anticorpo monoclonal testado a 50 µg/mL. Foram usados 30 mL em vez de um anticorpo monoclonal testado como um controle. 100 µL por cavidade da mistura foram transferidos para a placa revestida com rsCD4 para testar a interatividade "B4-HRP-rsCD4".

3. A % de inibição foi calculada como:
[(A492nm de controle de PBS - A492nm de Amostra contendo MAb em competição) + A492nm de Controle de PBS] x 100

EXEMPLO 11

Inibição de "B4-rsCD4" mas não "Complexo Compreendendo B4-superfície CD4" Interação por rsCD4: MAb é Reativo com um Complexo Antígeno de Célula Hospedeira que compreende CD4

Resultados:

A Tabela 10 representa os resultados obtidos de um estudo que envolve inibição competitiva de interação de "B4-rsCD4" em um sistema indireto rsCD4 ELISA que emprega rsCD4 como antígeno de fase sólida (0,25 µg/mL, 0,1 mL/cavidade, 4 °C, revestimento durante toda a noite) e B4 purificado a 2 µgmL, 0,1 mL/cavidade dando origem a uma leitura A492 nm de 0,679 como o controle positivo. As concentrações crescentes de rsCD4 desde as faixas de 0,008 até 25 µg/mL foram pré-incubadas com o B4 purificado durante uma hora à temperatura ambiente antes da incubação com o rsCD4 em fase sólida. Como mostrado na Tabela 10, a pré-mistura de 1 µg/mL de rsCD4 com 2 µg/mL de B4 inibiirá 50% da interação entre B4 e rsCD4 em fase sólida.

A Tabela 11 representa os resultados obtidos em um estudo que envolve inibição competitiva de interação de "Complexo que compreende CD4 B4-superfície biotinilado" em um ensaio de imunofluorescência indireta que emprega HPB-ALL (0,2-0,5 x 10^6 células por teste em 0,1 mL) como as células alvo e B4 biotinilado a 0,71 µg/mL, 0,1 mL por teste, que forneceu uma taxa positiva de 95% de células a uma intensidade de formação de mancha de 3+. Aumentando as concentrações de rsCD4 desde as faixas de 0,005 até 50 µg/mL foram pré-incubadas com o B4 biotinilado durante uma hora à temperatura ambiente antes de incubação com as células HPB-ALL que expressam CD4. Como mostrado na Tabela 11, em contraste com o sistema rsCD4 ELISA, não foi observada inibição para a formação de mancha B4 de células HPB-ALL quando foi adicionado rsCD4 até mesmo até 50 µg/mL de concentração. Esta reatividade demonstra um novo sítio de

reconhecimento para B4 o complexo de antígeno da superfície da célula compreendendo CD4, em comparação com o sítio CD4 não complexado de anticorpos anti-CD4 de boa fé. Este resultado foi confirmado pela formação de mancha por imunofluorescência de células HPB-ALL pelos monoclonais anti-CD4 de boa fé que foi completamente removida por pré-absorção com rsCD4 (os dados não são apresentados).

Todas as observações a respeito das reatividades de ligação dos monoclonais reativos com rsCD4, peptídeos sintéticos CD4-derivados e as células HPB-ALL que expressam CD4, podem ser resumidas nas seguintes quatro descobertas principais:

(1) como mostrado na Tabela 4, Mabs B4 e M2 reagiram moderadamente com o rsCD4 que se parece com uma reatividade parcial com a molécula enquanto cinco (isto é, E6, H5, J33, E2 e I26) dos sete monoclonais anti-CD4 de boa fé e o soro anti-rsCD4 de cobaia reagiu mais fortemente com rsCD4 em um rsCD4 ELISA;

(2) como mostrado na Tabela 7, todos os monoclonais anti-CD4 de boa fé e o soro anti-CD4 de cobaia reagiram fracamente com células HPB-ALL com um padrão de ligação de "emplastros" característico (padrão B), distintos do padrão de "coberturas" de Mabs B4 e M2 (padrão A);

(3) como mostrado na Tabela 8, a pré-incubação de células HPB-ALL que expressam CD4 com os monoclonais anti-CD4 de boa fé a uma concentração de saturação de 20 µg/mL ou do soro anti-rsCD4de cobaia a uma diluição de saturação de 1:50 não inibiu a ligação subseqüente de B4 biotinilado a células HPB-ALL enquanto Mabs B4 e M2 inibiam e

(4) como mostrado nas Tabelas 10 e 11, foi alcançada uma inibição de 50% do "B4-rsCD4" com 2 µg/mL de B4 a uma concentração de 1 µg/mL de rsCD4 enquanto não era observada inibição de interação do "complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4" com 0,71 de B4 biotinilado mesmo a uma concentração de 50 µg/mL de rsCD4.

Baseado nas quatro verificações acima, foi concluído que as especificidades de ligação de Mabs e M2 são facilmente distinguidas daquelas de anticorpos anti-CD4 de boa fé ou inclusão de sítios que se

estendem além daquela da proteína CD4 sozinha para incluir um complexo antígeno da superfície de célula hospedeira que compreende CD4, com CD4 constituindo apenas uma parte daquele complexo antígeno de célula hospedeira.

Tabela 10

Inibição de Interação "B4-rsCD4" por rsCD4

rsCD4 µg/mL	$A_{492\ nm}$	% de Inibição
25	0,055	91,9
5	0,061	91,0
1,0	0,340	49,9
0,2	0,633	6,7
0,04	0,637	6,1
0,008	0,711	-4,7
0	0,679	0

a Mab B4 purificado = 2 µg/mL

b rsCD4 revestido a 0,25 µg/mL durante toda a noite a 4°C

c % de inibição = [(A_{492nm} Controle - A_{492nm} Conc de inibição)/A_{492nm} Controle] x 100

Tabela 11

Inibição de "Complexo[b] que Compreende "B4[a]-Superfície CD4 Interação por rsCD4

	Formação de mancha HPB-ALL		Inibição
rsCD4 (µg/mL)	% de células positivas	Padrão de formação *de mancha*	
50	>95	3+	Não
5	>95	3+	Não
0,5	>95	3+	Não
0,05	>95	3+	Não
0,005	>95	3+	Não
0	>95	3+	N/A

a B4 biotinilado a 0,71 µg/mL a 100 µL por teste foi usado para formação de mancha.

b 0,2-0,5 x 10^6 células em 100 µL foram usados por teste.

c 100 µL de rsCD4 a 2 x a concentração designada foram pré-incubados com 100 µL do B4 biotinilado durante uma hora à temperatura ambiente antes da incubação com as células HPB-ALL.

EXEMPLO 12

Geração de Anticorpos Monoclonais Ig Humanos Derivados de HC1 e/ou HC2 Camundongos Transgênicos Imunizados com Células provenientes de uma Linhagem de Célula T Humana que expressa CD4

Este exemplo descreve a geração de hibridomas humanos provenientes de camundongos homozigóticos para um locus de imunoglobulina endógena inativada e que contém seqüências humanas de transgene que codificam uma cadeia pesada humana e uma cadeia leve humana. Os híbridomas gerados a partir destes camundongos transgênicos imunizados com uma linhagem de célula T humana que expressa CD4 de acordo com o esquema de imunização descrito no Exemplo 3 secretam anticorpos monoclonais que compreendem uma cadeia pesada de seqüência humana e uma cadeia leve de seqüência humana. Entre estes hibridomas estão seleciona-

dos clones, de acordo com o algoritmo descrito na Tabela 12, que secretam anticorpos que ligam-se a um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende a proteína CD4 com uma ampla atividade de neutralização cruzada dirigida contra isolados primários de HIV-1 provenientes de todos os clados e diversos isolados primários de HIV-2 e SIV e que têm propriedades similares de ligação com anticorpo àquela de anticorpo monoclonal B4.

Tabela 12

Imunização Preferida e Esquemas de Seleção para Geração Confiável de Hibridomas que Secretam Anticorpos a Complexo Antígeno de Célula Hospedeira que Compreende CD4 Eficaz na Neutralização de Isolados Primários de HIV-1

Esquema de Imunização Preferido	Esquema de Seleção
células T que expressam CD4 (por exemplo, linhagem de célula T HPB-ALL ou SUP-T1), 2-10 x 10^6 [1ª munização: i/p/, CFA ou PBS; reforços adicionais: i.p. e/ou i.v. (≥4x); PBS]	1) Positivo por rsCD4 ELISA 2) Positivo em células HPB-ALL que expressam CD4 ou SUP-T e 3a) Inibição de isolado primário de HIV-1 por MT2 Ensaio de Neutralização de Microplaca ou 3b) Inibição de interação de B4-sCD4" por incubação anterior de um anticorpo reativo rsCD4 individual com células HPB-ALL seguida por formação de mancha das células com B4 biotinilado (por exemplo, Tabela 8) ou 3c) Inibição de interação de B4-rsCD4" por incubação simultânea de um anticorpo rsCD4 individual com B4 HRP-conjugado (por exemplo, Tabela 9)

Mais especificamente, um camundongo transgênico caracterizado pelo fato de ter genótipo HC1 ou HC2 como descrito em Smith e outros, WO 93/12227, homozigótico para um locus J_H funcionalmente rompido e que prende um transgene capaz de rearranjo para codificar uma cadeia pesada de seqüência humana e um transgene capaz de rearranjo para codificar uma cadeia leve de seqüência humana, é imunizada com células provenientes de uma linhagem de célula T leucêmica humana que expressa CD4, HPB-ALL. Aproximadamente 5-10 x 10^6 células em 100 µL de PBS são introduzidas no camundongo por injeção via intraperitoneal ou, mais preferivelmente intravenosa ou ambas, no Dia 0. A imunização é repetída toda semana durante pelo menos quatro vezes com a última imunização realizada três dias antes da fusão. O baço é removido e aproximadamente 150 x 10^6 células de baço são fundidas a aproximadamente 30 x 10^6 células parceiras de fusão (linhagem de célula P3x63Ag8.653; ATCC) por métodos padronizados (fusão PEG) de acordo com Kohler e Milstein, Nature, 1975, 256: 495-97. Múltiplas fusões em semanas subseqüentes, cada uma após reforços subseqüentes bissemanalmente e/ou mensalmente e sendo três dias após um reforço intravenoso final, também podem ser realizadas.

Os hibridomas são crescidos e os sobrenadantes são testados por ELISA para ligação a rsCD4 como descrito no Exemplo 3. Os anticorpos humanos são detectados com anticorpos secundários peroxidase conjugados dirigidos contra imunoglobulinas humanas.

Os hibridomas primários são clonados em célula única por limitação de diluição e avaliados para secreção de anticorpos monoclonais reativos com rsCD4. Para determinar se estes anticorpos monoclonais também reconhecem o complexo antígeno de célula hospedeira que compreende a proteína CD4, os sobrenadantes provenientes de clones reativos com rsCD4 são testados para reatividade similar àquela de B4 com células provenientes de linhagem de célula HPB-ALL ou SUP-T por formação de mancha com imunofluorescência indireta.

Bom crescimento e altos níveis de produção de anticorpo mono-

clonal são também fatores importantes para esolher uma linhagem de célula de hibridoma clonal para desenvolvimento.

Entre os clones que secretam anticorpos reativos tanto com rsCD4 como com células que expressam CD4 e que crescem bem e secretam altos níveis de anticorpo, os sobrenadantes provenientes destes clones são ainda testados para sua atividade de neutralização dirigida contra isolados primários de HIV. Mais especificamente, eles são testados em um ensaio de neutralização de microplaca MT2 como descrito anteriormente para ambas as diluições de ponto final 50% ou 90% que começam a diluição 1:2 contra, por exemplo, isolado primário HIV-1 clado B 23135. Apenas aqueles que demonstram forte atividade de neutralização de HIV-1 são selecionados para subclonagem adicional. Os hibridomas selecionados secretam imunoglobulinas humanas com atividades de ligação específicas para epítopos conformacionais difundidos descontínuos sobre um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4 tendo potente atividade de neutralização contra isolados primários de HIV e de SIV. Estes anticorpos monoclonais são anticorpos candidatos para uso em profilaxia de pré- e pós-exposição de infecção por HIV.

EXEMPLO 13

Demonstração da Ampla Atividade de Neutralização de HIV-1 de Clado Cruzada Contra um Complexo Antígeno de Célula Hospedeira que Compreende CD4

Resultados:

As atividades de neutralização dos anticorpos foram comparadas sobre cepa de laboratório MN nos isolados primários indicados que representam HIV-1 clados A, B, C, D e E. Estes isolados primários foram cultivados sobre PBMCs, enquanto que HIV-1 foi cultivado sobre células H9 como descrito no Exemplo 1. Os ensaios de neutralização foram pelo método de Microplaca MT-2 (Exemplo 1) e os resultados são apresentados na Tabela 13.

A Tabela 13 compara as atividades de neutralização de HIV clado cruzada dos anticorpos monoclonais provenientes dos grupos 5, 9 e

15 do Exemplo 4 (Tabela 3) do anticorpo monoclonal alfa gp120 CD4-BS IgG1 *b12 descrito no Exemplo 1 (Tabela 2), do anticorpo policlonal do grupo* 6 anti-gp120 N-terminal V3 do Exemplo 2 (Tabela 3) e de um anticorpo monoclonal anti-gp120 N-terminal V3 murino comercialmente disponível com especificidade pelas seqüências V3 N-terminais da maioria das cepas de HIV-1 clado G, MAb 50.1. MAb 50.1 (Repligen Corporation, Cambridge MA) foi cultivada contra um imunogênio de peptídeo sintético derivado da ponta da alça gp120 N-terminal V3 de HIV-1 MN. O epítopo reconhecido por este MAb foi definido como Lys-Arg-Ile-X-Ile-Gly-Pro (Wrin e outros, J. Virol, 1995, 69; 39-48).

Tabela 13

Neutralização de Isolados Primários# de HIV-1 Clados A, B, C, D e E (Ensaio de Neutralização de Microplaca MT-2)

Grupo *	Tipo de Anticorpos	Lab cepa		UG029 (Clado A)		23135 PBL (Clado B)		BRO14 PBL (Clado B)		ZIM 748 (Clado C)		UG266 (Clado D)		TH036 (Clado E)	
		50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
5	MAb B4	20.4 µg/mL	66.7 µg/mL	1.17 µg/mL	6.76 µg/mL	0.21 µg/mL	1.54 µg/mL	0.19 µg/mL	1.63 µg/mL	0.54 µg/mL	2.82 µg/mL	2.52 µg/mL	25.6 µg/mL	0.54 µg/mL	3.32 µg/mL
6	G.P. Ig α N-terminal V3 MN	0.2 µg/mL	2.1 µg/mL	-	-	>100 µg/mL	>100 µg/mL	>100 µg/mL	>100 µg/mL	-	-	-	-	-	-
9	Anticorpos de gps 1-5	>100 µg/mL	>100 µg/mL	1.38 µg/mL	7.14 µg/mL	0.51 µg/mL	0.98 µg/mL	0.49 µg/mL	2.52 µg/mL	0.94 µg/mL	4.37 µg/mL	6.76 µg/mL	50 µg/mL	0.84 µg/mL	4.37 µg/mL
15	Anticorpos de gps 5 6	0.2 µg/mL	1.9 µg/mL	2.26 µg/mL	9.43 µg/mL	0.46 µg/mL	2.52 µg/mL	0.67 µg/mL	3.14 µg/mL	0.80 µg/mL	4.61 µg/mL	3.51 µg/mL	31.3 µg/mL	0.94 µg/mL	4.13 µg/mL
IgG1 b12	mAb α gp120	-	-	11.9 µg/mL	38.5 µg/mL	16.7 µg/mL	41.7 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	6.94 µg/mL	>50 µg/mL	50 µg/mL	>50 µg/mL
MAb 50.1	mAb α gp120 (N-terminal V3)	0.004 µg/mL	0.02 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL	>50 µg/mL

*: Mistura de anticorpo com composição idêntica de anticorpo como os grupos correspondentes descritos na Tabela 2.

-: Não realizada

#: isolados primários de HIV-1 de vários clados foram gentilmente fornecidos pelo WHO Global Program on AIDS.

O anticorpo B4 único (grupo 5) neutralizou fortemente os isolados primários de HIV-1 clados A-E enquanto apresenta atividade de neutralização mais fraca contra MN, a cepa adaptada em laboratório. A combinação de B4 com outros anticorpos anticelulares e com anti-N-terminal V3 servia apenas para diluir a atividade de neutralização de B4 contra os isolados primários (grupos 9 e 15). O outro anticorpo que é eficaz contra os isolados primários, IgG1 b12, que se liga ao sítio de ligação de gp120, apresentou um padrão mais fraco de neutralização cruzada de clado para isolados primários do que B4 (grupo "IgG1 b12"), apresentando atividade de neutralização relativamente fraca apenas para isolados primários de clados A, B e D. Ele neutralizou apenas um dos dois isolados primários clado B. Em contraste, os anticorpos anti-N-terminal V3, tanto MAb 50.1 e policlonal anti-N-terminal V3 MN (grupos 6 e "MAb 50.1") foram potencialmente neutralizadores para a cepa adaptada em laboratório enquanto havia pequena neutralização dos isolados primários, inclusive o isolado primário homotípico clado B. Potente neutralização tanto da cepa de laboratório como dos isolados primários foi obtida apenas por combinação do único anticorpo B4 com anticorpo anti-N-terminal V3 (grupo 15).

Em conclusão, os anticorpos anti-gp120 N-terminal apresentaram neutralização preferencial para a cepa adaptada em laboratório enquanto o anticorpo B4 único da invenção apresentou neutralização preferencial para isolados primários dos clados A-E. Além disso, em comparação com o anticorpo alfa gp120 CD4-BS, que é um dos poucos anticorpos que se demonstrou terem atividade de neutralização cruzada do clado contra certos isolados primários de HIV-1, o anticorpo da invenção foi o único a ter apresentado forte atividade de neutralização através de todos os isolados primários que representam HIV-1 clados A, B, C, D e E.

EXEMPLO 14

Demonstração da Atividade de Neutralização de HIV-2 e SIV do Anticorpo Único

Procedimentos específicos para a determinação do vírus pelo anticorpo.

Ensaio de Neutralização de Antígeno p27. Estoques de vírus

titulado são misturados com diluições em série de anticorpo e então usados para infectar PBMCs humanas mitogênio-estimuladas e as células infectadas são cultivadas durante cinco dias (Gardner e outros, AIDS Res Hum Retroviruses, 1995, 11:843-854). A infectividade máxima do vírus e a neutralização são avaliadas quantitativamente por determinação do antígeno SIV p27 acumulado pelas culturas de PBMC por p27 ELISA (Coulter SIV p27 EIA, Coulter Immunology, Hialeah, FL). A atividade de neutralização é expressa como concentrações de anticorpo que resultaram nas reduções percentuais indicadas em acúmulo de p27 comparadas à concentração de p27 em culturas não tratadas (máxima).

Ensaio de Redução de Infectividade (IRA). IRA foi realizado (White-Scharf e outros, Virology, 1993, 192: 197-206). As determinações de neutralização IRA são conseguida por variação da carga viral usada para infectar PBMCs, na presença de uma quantidade fixa de anticorpo, neste caso 10 µg/mL. Os resultados do IRA são expressos como unidades infecciosas >95% inativadas por 10 µg/mL de anticorpo.

Vírus. HIV-2_{ROD} é uma cepa clonada cultivadas sobre células H9 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program nº do catálogo 207). O HIV-2_{287}, um isolado primário, foi obtido a partir do plasma de um macaco infectado experimentalmente, SIV_{251}, SIV_{239} e HIV-1/SIV recombinantes $SHIV_{IIIB}$ e $SHIV_{89,6}$ são cepas de laboratório passadas em linhagens de célula T humanas, fornecidas por David Montefiori (Duke University, Durham, NC). Um estoque de SIV_{251} foi passado em PBMCs de primata. $SHIV_{IIIB}$ e $SHIV_{89,6}$ são SIV com envoltórios de HIV-1 derivados das cepas de HIV-1 clado B indicadas.

Resultados:

O experimento apresentado na Tabela 14 compara as atividades de neutralização de B4 (grupo 5 da Tabela 3, Exemplo 4) e policlonal anti-N-terminal V3 MN (grupo 6 da Tabela 3) contra vários isolados de HIV-2, SIV e SHIV recombinante. As designações de isolado são como apresentadas na tabela. As determinações de neutralização sobre HIV-2_{287} foram por Infectivity Reduction Assay (IRA) (White-Scharf e outros, Virology,

1993, 192: 197-206). Os resultados de IRA são expressos como unidades infecciosas >95% inativadas por 10 µg/mL de anticorpo. As atividades de neutralização sobre HIV-2_{ROD} foram determinadas por ensaio MT-2 como descrito no Exemplo 1. Os ensaios de neutralização sobre SIV_{251}, SIV_{239} e HIV-1/SIV recombinantes $SHIV_{IIIB}$ e $SHIV_{89,6}$ foram determinados por p27 Antigen Neutralization Assay (Gardner e outros, AIDS Res Hum Retroviruses, 1995, 11:843) das culturas PBMC infectadas até o 50% ponto final, exceto para um conjunto de determinações de neutralização para B4 sobre SIV_{251} cultivado em PBMC que foram realizadas até um 80% do ponto final. 50% e 80% dos pontos finais são as frações de p27 detectável em culturas tratadas com anticorpo comparadas com culturas não tratadas.

Tabela 14

Neutralização de SIV, SHIV e HIV-2 por Anticorpo Monoclonal B4

Grupo	Tipo de Anticorpos	$HIV\text{-}2_{287}$*	$HIV\text{-}2_{ROD}$#		SIV_{251}@	SIV_{239}@	SHIV@ IIIB	SHIV@ 89,6	SIV_{251}@ (huPBMC)
		PBMC IRA	50%	90%	50%	50%	50%	50%	80%
5	MAb B4	5^{7} (1,5 logs killed	0,7 µg/mL	8,5 µg/mL	2,0 µg/mL	1,3 µg/mL	0,679 µg/mL	0,088 µg/mL	1,0 µg/mL
6	GP Ig α gp120 N-terminal V3 MN	5^{95}(i.e. 0 log killed)	-	-	-	-	>10,0 µg/mL	>10,0 µg/mL	-

* Por Ensaio de Redução de Infectividade com MAb B4 a 20 µg/mL.

Por Ensaio de Neutralização de Microplaca

@ Por Ensaio de Neutralização de Antígeno p27

B4 exibiu neutralização para todas as cepas de HIV-2, SIV e SHIV apresentadas na Tabela 14. Em comparação, a neutralização pelo anticorpo anti-N-terminal V3 MN que foi demonstrado, que, como sendo eficaz sobre HIV-1 MN, adaptado em laboratório (Exemplos 1 e 13, Tabelas 2 e 13) não era evidente para um dos SHIV recombinantes apesar do status de adaptado em laboratório destas cepas recombinantes. Assim, é evidente que a atividade de neutralização cruzada de um anticorpo único e potentemente neutralizador que se estende a HIV-2 e SIV, seja adaptado em laboratório ou isolado primário, seja cultivado sobre linhagens de célula T ou PBMCs, é uma propriedade distinta da invenção.

Esta observação mostra que os anticorpos da invenção podem ser usados utilmente no modelo de infecção animal de macaco rhesus SIV e os modelo de infecção animal de macaco com rabo de porco SIV e HIV-2, para testar os anticorpos para eficácia protetora.

EXEMPLO 15

Demonstração da Atividade de Neutralização de um Único Anticorpo para HIV-1 Adaptado para Chimpanzé

Resultados:

As atividades de neutralização do B4 e do IgG1 b12 previamente caracterizado (sítio de ligação anti-gp120 CD4) foram comparadas sobre um isolado primário de campo de HIV-1 de clado B, HIV-1 DH-2, cultivado sobre PBLs de chimpanzé e os resultados apresentados na Tabela 15.

A neutralização foi determinada por ambos os métodos MT-2 e IRA para B4 e somente pelo método IRA para IgG1 b12. Os resultados de IRA são expressos como unidades infecciosas >95% inativadas por 10 µg/mL de anticorpo para B4 e como unidades infecciosas >95% inativadas por 25 µg/mL de anticorpo para IgG1 b12.

A comparação dos presentes resultados de ensaio MT-2 com os resultados das Tabelas 3 e 13 (grupo 5) mostram que um único anticorpo reativo CD4, B4, apresentou atividade de neutralização comparável contra HIV-1 chimp-adaptado como para as cepas primarias humanas cultivadas em PBMC. A comparação dos resultados do IRA sugere que B4 apresenta

mais do que uma ordem de grandeza mais atividade de neutralização contra HIV-1 chimpanzé-adaptado do que o anticorpo IgG1 b12 do sítio de ligação atni-gp120 CD4. Portanto, um anticorpo da invenção é distintamente mais ativo contra HIV-1 chimpanzé-adaptado do que é o melhor dos anticorpos monoclonais previamente conhecidos que têm atividade de neutralização de isolado primário.

Estes resultados indicam que um anticorpo da invenção pode ser testado utilmente no modelo de chimpanzé in vivo para infecção por HIV-1, para testar a eficácia protetora.

Tabela 15

Neutralização de MAbs de Isolado Primário de Campo de HIV-1 Chimp PBL-Cultivado DH-12 (Clado B)

Mab	DH-12 (Clado B)	DH-12 (Clado B)	
	PBMC IRA*	50% de Inibição#	90% de Inibição#
Mab B4	3,0 logs eliminados a 10 μg/mL por cultura	0,33 μg/mL	2,1 μg/mL
IgG1 b12 (α gp120)	3,0 logs eliminados a 10 μg/mL por cultura	-	-

* por Ensaio de Redução de Infecção

por Ensaio de Microplaca MT-2

EXEMPLO 16

Cinética de Neutralização por B4 de Isolados Primários de HIV-1

Resultados:

As Tabelas 16 e 17 representam a cinética de neutralização por B4 de HIV-1 23135, um isolado primário de campo clado B. A Tabela 16 apresenta a cinética de neutralização para duas concentrações de B4, 2 e 20 μg/mL, como adicionado durante intervalos de 0 a 24 horas após adição de vírus, usando o Ensaio de Microplaca MT-2. A neutralização é expressa

como por cento de sobrevivência das diluição indicadas de vírus. A Tabela 17 representa a cinética de neutralização de HIV-1 23135 por 20 µg/mL de B4, como adicionado durante um período de tempo de 0 a 96 horas após a adição de vírus às células. O período de tempo estendido necessitou o uso de um p24 Ensaio de Neutralização de Antígeno para a determinação da atividade de neutralização contra vírus de entrada das diluições indicadas (Wrin e outros, J Virol, 1995, 69: 39-48). Neste ensaio p24, são usadas diluições em série de vírus titulado para infectar PBMCs e as células infectadas são cultivadas durante quatro dias. É adicionado o anticorpo às concentrações indicadas nos tempos indicados. A infectividade do vírus e a neutralização são avaliadas quantitativamente por determinação do antígeno p24 acumulado pelas culturas PBMC por p24 ELISA (Coulter Immunology, Hialeah FL). Os resultados são expressos como por cento de p24 detectável em culturas tratadas com anticorpo comparadas à concentração de p24 em culturas não-tratadas, isto é, os resultados são equivalentes a por cento de sobrevivência do vírus por contagem de microplaca embora a detecção de p24 sofra mais impacto pelo fundo.

A Tabela 16 mostra que o B4 neutraliza completamente o vírus de entrada a uma concentração de 2 µg/mL até uma hora após a infecção. A uma concentração de 20 µg/mL, o anticorpo é eficaz além de 24 horas. A Tabela 17 apresenta os resultados quando o período de tempo foi estendido até 96 horas e apresenta neutralização eficaz por 20 µg/mL de B4 para entrada de anticorpo até 48 horas após a infecção. Estes resultados demonstram que um único anticorpo pode evitar o estabelecimento da infecção in vitro até mesmo depois que as células foram expostas ao vírus e sugerem que um tal anticorpo pode ser eficaz para tratamento profilático após exposição a HIV.

Tabela 16

Cinética (0-24 horas) de Neutralização MAb B4-Mediada de Isolado Primário de Campo de HIV 23135 (Clado B) (Ensaio de Neutralização de Microplaca MT2)

Tempo de Adição de MAb (Após a Inoculação do Vírus)	Concentração de MAb (µg/mL)	Por cento de Sobre-vivência do Vírus		
		Diluição do Vírus		
		1:75	1:150	1:300
0	2	0,0	0,0	0,0
	20	0,0	0,0	0,0
0,5	2	0,0	0,0	0,0
	20	0,0	0,0	0,0
1,0	2	0,0	0,0	0,0
	20	0,0	0,0	0,0
2,0	2	4,2	1,9	2,2
	20	0,0	0,0	0,0
6,0	2	17,2	15,9	29,2
	20	0,0	0,0	0,0
24,0	2	87,0	64,1	59,4
	20	0,0	0,0	0,0

Tabela 17

Cinética (0-96 horas) de Neutralização MAb B4-Mediada de Isolado Primário de Campo de HIV 23135 (Clado B) (Ensaio de Neutralização de Antígeno p24)

Tempo de Adição de mAb (Após a Inoculação do Vírus)	Diluição do Vírus	p24 Médio (pg) (com 20 µg/mL B4)	p24 Médio (pg) (controle do vírus, sem B4)	Por cento de Sobrevivência do Vírus
0 horas	1:75	37	2367	1,6
	1:150	17	1292	1,3
	1:300	36	922	3,9
24 horas	1:75	168	2499	6,7
	1:150	112	2061	5,4
	1:300	64	1626	3,9
48 horas	1:75	189	2230	8,5
	1:150	60	1845	3,3
	1:300	35	1125	3,1
72 horas	1:75	654	2220	29,5
	1:150	353	1994	17,7
	1:300	295	1565	18,8
96 horas	1:75	2023	1747	115,8
	1:150	913	2358	38,7
	1:300	672	1976	34,0

EXEMPLO 17

Imunização Passiva de Macacos Rhesus Contra Infecção com SIV_{mac251}

Procedimentos específicos para determinação de proteção contra infecção por SIV

Os estudos acima sobre a atividade de neutralização dos anticorpos da presente invenção caracterizam a concentração, cinéica e a amplitude estendida de B4 para a neutralização de isolados primários de HIV-2

e SIV, assim como isolados primários provenientes de todos os clados de HIV-1. Aquelas caracterizações in vitro, juntamente com o alto grau de conservação entre as seqüências CD4 da espécie primata, sugere uma alta probabilidade para eficácia da proteção in vivo para a modalidade B4 da invenção contra infecção por 3 vírus da imunodeficiência. Portanto, a eficácia protetora da invenção foi avaliada por uma experiência de estímulo de B4 contra a infecção experimental de macacos rhesus com SIV, um excelente modelo animal para AIDS humana.

Estoque de vírus e teste com SIV in vivo. O estoque de vírus usado para estímulo era o protótipo SIV_{mac251} cepa obtida por R. Desrosiers (New England Regional Primate Research Center, Southborough MA). Todos os estímulos foram inoculações i.v. com aproximadamente 10 AID_{50} do isolado SIV_{mac251} não-lonado produzido em PBMCs de Rhesus (Desrosiers e outros, PNAS USA, 1989, 86: 6353-6357). A ambos os macacos não-munizados do grupo de controle foi dada a mesma dose i.v. deste estoque de vírus e verificou-se que estavam persistentemente infectados. Os animais foram sangrados periodicamente após o estímulo e monitroados para estabelecimento da infecção por testes sorológicos para antigenemia de vírus e soroconversão e por co-cultura de PBMCs e plasma para detecção de vírus.

Ensaios sorológicos SIV. A soroconversão como um resultado de infecção SIV foi detectada por um imunoensaio de enzima (EIA) que é baseado no peptídeo de antígeno de HIV-2 (HIV-1,2 EIA; United Biomedical, Inc., Hauppauge NY) que é reativo cruzado para SIV e que pode ser usado para determinar um título de ponto final para anticorpos de plasma à região amino terminal imunodominante (aminoácidos 588-603) da proteína de transmembrana SIV (gp36).

Ensaio de Antígeno SIV p27. Um EIA de captura de antígeno monoclonal à base de anticorpo SIV-específico (Coulter Immunology, Hialeah, FL) foi usado para detectar a infecção de vírus produtivo in vitro e in vivo. Os resultados positivos in vivo foram indicados por valores de >0,05 ng/mL para plasma não-diluído.

Isolamento de SIV e ensaios de diluição no ponto final. Foram separados PBMCs de Rhesus do sangue integrado sobre gradientes Ficoll-Hypaque. Dois mililitros de plasma clarificado, não-diluído ou PBMCs separados foram adicionados a PBMCs humanas mitogen-estimuladas. As culturas foram mantidas com meio de crescimento RPM1-1640 contendo 10% de soro fetal de bezerro (Sigma, St. Louis MO), suplementado com 20 U/mL IL-2 e 200 U/mL anti-interferon alfa (ambos Collaborative Research, Waltham, MA), 2,5 x 10-2 mM 2-mercaptoetanol e 2 µg/mL de polibreno (ambos Sigma) e mantidos a 37°C, 5% CO_2. Os sobrenadantes de cultura foram dosados duas vezes semanalmente por até 4-6 semanas para a presença de de p27 antígeno. Foi determinada uma cultura como sendo positiva se as amostras de sobrenadantes provenientes de três datas consecutivas fossem positivas para antígeno p27 (Coulter SIV p27 EIA, Coulter Immunology, Hialeah, FL). Para avaliação quantitativa de SIV infeccioso em PBMCs de macaco, as PBMCs foram diluídas em série e similarmente co-cultivadas com PBMCs huamans. As culturas para ensaios de diluição de ponto final são terminadas no dia 14 e dosadas para antígeno p27.

Projeto e Métodos. Seis macacos usados para o estudo descrito abaixo eram macacos rhesus adultos consanguineos de colônia e jovens adultos provenientes do TSI Primate Center Mason Laboratories (Worcester MA). Eles eram soronegativos para anticorpos para SIV, SRV-1, SRV-2, SRV-5 e STLV-1. Estes animais foram abrigados em abrigos de acordo com American Association for Accreditation of Laboratory Animal Care Standards e os investigadores aderiram ao Guide for the Care and Use of Laboratory Animals preparado pelo Committee on Care and Use of Laboratory Animals do Institute of Laboratory Resources, NRC, Washington D.C. Os animais foram distribuídos em grupos de controle e de tratamento em peso.

Aos dois macacos do Grupo 1 foi dado PBS e aos quatro macacos do Grupo 2 foram dados 4 mg/kg de MAb B4, purificado por cromatografia em coluna por afinidade com proteína-A, por infusão intravenosa uma hora antes do estímulo viral intravenoso por 10 AID_{50} de SIV_{mac251}.

Resultados:

Foi coletado sangue pré-tratamento, pré-estímulo, uma hora, 1, 3, 15, 22, 29 e 36 dias pós-estímulo. Verificou-se que o nível de soro do anticorpo receptor anti-CD4/quimiocina, determinado para todas as amostras por ensaio com enzima rsCD4, diminuía até a metade do valor máximo 1 dia após a infusão, mais provavelmente em virtude da penetração e a ligação de saturação das células que expressam CD4 de macaco tanto em sangue periférico como em tecidos linfóides. Nos dias 15, 22 e 29, foram coletadas amostras de plasma provenientes de todos os macacos e testadas para p27 antígeno pelo Ensaio de Antígeno SIV p27.

No dia 15, verificou-se que ambos os macacos provenientes do grupo de controle (N^{os} 170 e 110 do grupo 1) estavam infectados como demonstrado por serologia positiva de antígeno p27 SIV (Tabela 18). Em comparação, lá pelo dia 15, apenas 1 (N°. G4B) dos 4 macacos no grupo experimental 2 que recebeu 4 mg/kg B4 estava infectado (Tabela 18).

Subseqüentemente, as amostras de plasma coletadas provenientes de todos os macacos nos dias 22 e 29 foram analisadas por imunoensaios p27. Aqueles resultados confirmaram o status de SIV antigenemia dos macacos observados no dia 15.

Um outro parâmetro para a avaliação de infecção por SIV era monitorar o status imune dos animais para soroconversão a reatividade de SIV. Ambos os macacos no grupo de controle 1 desenvolveu anticorpos anti-SIV como detectado pelo teste HIV 1,2 (SIV) EIA, começando 2-3 semanas após o estímulo viral (Tabela 19). A soropositividade foi avaliada como sendo acima de uma faixa de valor de 4 vezes a absorbância de soros de controle não-reativos (NRC) provenientes de macacos não-desafiados não-imunizados. A soroconversão na Tabela 19 é mostrada sublinhada. A absorbância proveniente de um Controle Fortemente Reativo (SRC) é apresentada para referência. Os três macacos protegidos no grupo experimental 2 (DW3, GN-terminal V3 e NU3) permaneciam soronegativos durante todo o período testado. Assim, o único macaco (G4B) proveniente do grupo experimental que se descobriu estar infectado com SIV por p24 antigenemia

também se descobriu ter desenvolvido anticorpos anti-SIV durante este período.

As PBMCs de Rhesus de cada um dos 6 macacos em ambos os grupos também foram coletadas nos dias 15, 22 e 29. Amostras de plasma e de PBMC provenientes daqueles dias foram combinadas com PBMCs humanas mitogênio-estimuladas para detecção de infecção por SIV por cultura de vírus. A cultura continuou durante 3 semanas e os sobrenadantes destas co-culturas foram dosados para a presença do antígeno p27. De novo, foi demonstrado que ambos os macacos provenientes do grupo de controle (N^{os} 170 e 110) e o macaco não protegido (GB4) proveniente do grupo experimental estavam infectados, como provado por resultados de cultura positiva de vírus proveniente tanto da PBMC como das amostras de plasma (Tabela 128).

Conclusões. Estes resultados demonstraram que a imunização passiva de macacos rhesus com anticorpo monoclonal B4 a uma dose modesta (4 mg/kg) protege eficazmente a maioria (75%) dos macacos contra infecção por um isolado primário de SIV, após estímulo com uma dose de SIV_{mac251}, uma dose que causou efetivamente infecção persistente em todos os animais de controle do histórico e em 2 entre 2 animais de controle do presente estudo.

Tabela 18

Imunização Passiva de Macacos Rhesus com Anticorpo Monoclonal B4 Seguida por estímulo com SIV_{mac251}

Grupo	Macaco Nº	Protegido	P27 Antigenemia* (Dia 15)	Soroconversão @	Isolamento de vírus#	
					PBMC (Dia 15)	Plasma
Grupo 1 PBS administrado uma hora antes do estímulo $10AID_{50}$ SIV	170	Não	Pos (2,21 ng)	Sim (wk 3)	Pos (9,0)	Pos
	110	Não	Pos (1,43 ng)	Sim (wk 3)	Pos (10,0)	Pos
Grupo 2 MAb B4 (4 mg/kg) administrado i.v. uma hora antes do estímulo $10AID_{50}$ SIV	DW3	Sim	Neg(<0,049 ng)	Não	Neg	Neg
	G4B	Não	Pos (>0,8 ng)	Sim (wk 3)	Pos (8,5, 10,5)	Pos
	Nu3	Sim	Neg (<0,049 ng)	Não	Neg	Neg
	GV3	Sim	Neg (<0,049 ng)	Não	Neg	Neg

* Os três animais tendo resultados positivos de antigenemia p27 permaneceram persistentemente positivos em todo o período monitorado (até o dia 141) e os três animais protegidos permaneceram persistentemente negativos durante o mesmo período monitorado.

Co-cultura por resultados de diluição limitativa foram obtidos com amostras tiradas dos dias 15 e 22.

@ Ver Tabela 19 para o curso real de tempo de conversão.

Tabela 19

Status de Soroconversão de Macacos Rhesus Após estímulo com SIV_{mac251}

		Dias após estímulo viral						Status de Soroconversão
		0	8	15	22	29	43	
Grupo 1	170	0,215	0,232	0,268	2,024	2,023	2,169	+ WK3
	110	0,055	0,060	0,053	0,451	2,161	2,194	+ WK3
Grupo 2	DW3	0,060	0,065	0,058	0,064	0,063	0,053	-
	NU3	0,058	0,054	0,058	0,124	0,054	0,065	-
	G4B	0,075	0,091	0,070	1,863	2,184	2,078	+wk3
	GV3	0,056	0,071	0,051	0,055	0,056	0,057	-

SRC = 0,777NRC = 0,078Cutoff = 4 x NRC = 0,312

EXEMPLO 18

Proteção Pré- e Pós-exposição contra Isolados Primários de Infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana Mediada por Anticorpo Monoclonal B4

Apoiando o conceito de imunoprofilaxia contra infecção por HIV-1, foi demonstrado que anticorpos monoclonais (MAbs) e soro policlonal protegem primatas não-humanos e camundongos SCID (hu-PBL-SCID) reconstituídos por linfócito de sangue periférico humano de infecção com HIV-1 (Emini e outros, J Virol, 1990, 64: 3674; Prince e outros, AIDS Res Hum Retroviruses, 1991, 7: 971; Emini e outros, Nature, 1992, 355: 728; Safrit e outros, AIDS, 1993, 7:15) e SIV (Putkonen e outros, Nature, 1991, 352: 436; Lewis e outros, Vaccine, 1993, 11: 1347). Foi descoberto, entretanto, que aqueles estudos que usam anticorpos monoclonais ou policlonais dirigidos contra antígenos virais neutralizam apenas cepas de laboratório derivadas de linhagem de célula T mas não isolados primários de vírus da imunodeficiência.

Neste estudo, foi usado o anticorpo monoclonal B4 para determinar se a imunização passiva por um anticorpo monoclonal da presente invenção, isto é, um anticorpo monoclonal dirigido a um epítopo conformacional difundido descontínuo presente sobre um complexo antígeno de célula hospedeira que compreende proteína CD4 e receptor quimiocina e que tem amplas atividades de neutralização contra todos os isolados primários de HIV, é protetor in vivo contra a infecção causada por um isolado primário de HIV-1. O objetivo deste estudo foi demonstrar que a administração de B4 pode proteger camundongos com grave imunodeficiência combinada (SCID) transplantados com leucócitos do sangue periférico normal (hu-PBL), designados camundongos hu-PBL-SCID, proveniente de estímulo subseqüente com um isolado primário de HIV que foi previamente demonstrado ser resistente à neutralização. O modelo de camundongo hu-PBL-SCID foi escolhido para esta avaliação de eficácia porque muitos grupos experimentais que envolvem múltiplos animais podem ser obtidos às custas razoáveis em um tempo relativamente curto, vantagens não oferecidas pelo único modelo animal alternativo para estudos de estímulo-proteção contra HIV-1, a in-

fecção por HIV-1 de chimpanzés.

Procedimentos específicos para reconstituição do sistema imunológico imune em camundongos SCID e determinação de proteção contra infecção por HIV-1.

MAbs. O anticorpo de controle usado neste estudo foi um IgG_{2a} murino, um anticorpo de especificidade de ligação desconhecida, secretado pela linhagem de célula de mieloma de camundongo RPC5.4 (ATCC No. TIB12). TAnto B4 como o controle IgG_{2a} RPC5.4 foram purificados de fluidos ascíticos por cromatografia em coluna por afinidade de Proteína-A e resuspensos em PBS estéril a 2 mg/mL antes do uso. Todos os anticorpos foram fornecidos aos camundongos hu-PBL-SCID por injeção intraperitoneal (i.p.).

Reconstituição de camundongo SCID. Os camundongos CB.17 scid/scid usados neste estudo foram mantidos sob condições específicas sem agente patogênico. Os camundongos do fenótipo não defeituoso foram reconstituídos por injeção i.p. de 2×10^7 PBL humanos normais recém-isolados suspensos em 0,5 mL de PBS. Duas semanas após a injeção de PBL, foi confirmada a reconstituição por análise de soros de camundongo para a presença de imunoglobulinas humanas por ELISA (SangStat, Menlo Park, CA). Apenas camundongos positivos a imunoglobulina humana foram usados para estudos da infecção por HIV-1.

Estoques de vírus. Foram preparados estoques de vírus HIV-1 AD6 a partir dos sobrenadantes de PBL infectado como descrito (Ho e outros, N Engl J Med, 1989, 321: 1621-5) e titulado para infectividade em camundongos hu-PBL-SCID. Eles são expressos como a dose infectiva de camundongo 50% (MID_{50}) por mililitro.

Ensaio de neutralização do vírus. Foram realizadas neutralizações de HIV-1 por um ensaio p24 como descrito (Ho e outros, J Virol, 1991, 65: 489-493). A neutralização foi definida como a redução percentual na quantidade de antígeno p24 liberado para os sobrenadantes de cultura provenientes de cavidades tratadas com anticorpo comparadas com cavidades de controle não tratadas com anticorpo.

Desafio com vírus dos camundongos hu-PBL-SCID. AD6, conhecido como sendo resistente à neutralização pela maioria dos anticorpos neutralizadores, foi selecionado como o isolado primário de HIV-1 neste estudo. Todos os procedimentos para infecção e manutenção dos camundongos hu-PBL-SCID foram realizados em uma instalação de animal com nível de bio-segurança 3. A infecção dos camundongos hu-PBL-SCID foi realizada duas semanas após a reconstituição de PBL. Os camundongos foram injetados i.p. com 0,5 mL de estoques de HIV-1 isento de célula diluídos contendo 10 MID_{50}. Os inóculos de vírus foram previamente determinados por titulação em camundongos hu-PBL-SCID e foi demonstrado que eles infectam pelo menos 80% dos camundongos hu-PBL-SCID.

Detecção de HIV-1 por co-cultura. Três semanas após estímulo viral, os camundongos foram sacrificados e as células foram recuperadas da lavagem peritoneal e baços como descrito (Safrit e outros, AIDS 1993, 7: 15-21). Então 2 x 10^5 células da lavagem peritoneal ou 5 x 10^6 células de baço provenientes dos camundongos (com diluições em série de 10 vezes) foram incubadas com 2 x 10^6 PBL PHA-ativados provenientes de doadores humanos HIV-1-soronegativos em uma cultura de diluição em ponto final. As co-culturas foram monitoradas semanalmente para a presença de antígeno de núcelo p24 de HIV-1 no sobrenadante da cultura até 4 semanas. As culturas foram consideradas positivas para HIV-1 se uma amostra simples continha >1000 pg/mL ou se 2 amostras consecutivas continham >200 pg/mL de antígeno p24. A cavidade mais altamente diluída contendo células infectadas detectáveis foi considerada como o ponto final e os títulos do vírus foram expressos como Doses Infecciosas de Cultura de Tecido (TCID) por 10^6 células.

Dose e estudos cinéticos para a eficiência de profilaxia pré- e pós-exposição por MAb B4.

Experimento 1

Projeto e métodos. Para avaliação de proteção pré-exposição, foi injetado intraperitonealmente anticorpo monoclonal B4 em 0,5 mL de PBS uma hora antes da inoculação por HIV-1. Dois grupos de camundongos receberam

MAb B4 (Grupos 2 e 3, n = 6 por grupo, a uma concentração de 50 mg/kg e 5 mg/kg respectivamente) e um grupo recebeu a IgG_{2a} irrelevante de camundongo de mieloma RPC5.4 (Grupo 1, n = 4 a uma concentração de 50 mg/kg). Os camundongos previamente imunizados foram então desafiados intraperitonealmente com 10 MID_{50} de isolado primário AD6 de HIV-1.

Para a avaliação de proteção pós-exposição, animais do Grupo 4 (n = 6) foram desafiados com o vírus e 30 minutos mais tarde receberam B4 a uma concentração de 50 mg/kg. Cada camundongo pesou em média 20 g. Três semanas após o estímulo viral os camundongos foram mortos e foram coletadas as células de baço e da lavagem peritoneal para determinação de infecção por cultura de vírus.

Resultados. Não foi observada toxidez pelo anticorpo em algum grupo de animais. Como mostrado na Tabela 20A, o HIV-1 foi recuperado em culturas realizadas até 4 semanas provenientes tanto de esplenócitos como de células de lavagem peritoneal que foram co-cultivadas com PBLs humanos PHA-ativados provenientes de três (N^{os} 4296, 4297 e 4303) dos quatro camundongos no grupo 1 aos quais foram fornecidos 50 mg/kg de IgT_{2a} de controle, demonstrando uma taxa de infectividade de 75% para este grupo de controle. O vírus não foi recuperado de qualquer um dos dezoito camundongos aos quais foi fornecido B4 a 50 mg/kg (grupos 3 e 4) ou 5 mg/kg (grupo 2), administrado uma hora antes (Grupos 2 e 3) ou 0,5 hora após o estímulo viral (Grupo 4) (Tabela 20A).

Experimento 2.

Projeto e métodos. Para este experimento de proteção pós-exposição, os camundongos foram desafiados intraperitonealmente com 10 MID_{50} de isolado primário AD6 de HIV-1 antes da administração de qualquer anticorpo. Os camundongos do Grupo de Controle 1 (n = 5) foram injetados intraperitonealmente com uma dose de 5 mg/kg de IGg_{2a} de camundongo (RPC5.4) imediatamente após o estímulo de HIV-1. Camundongos do Grupo 2 (n = 4) foram administrados 50 mg/kg de MAb B4 imediatamente após o estímulo. Duas, quatro e 24 horas mais tarde, os animais dos Grupos 3, 4 e 5 (n = 4, 4, 5 por grupo, respectivamente) receberam MAb B4 a uma con-

centração de 50 mg/kg; e uma hora mais tarde, os Grupos 6 e 7 animais (n = 4 por grupo) receberam MAb a uma concentração de 15 mg/kg e 5 mg/kg respectivamente. Cada camundongo pesava em média 20 g. Três semanas após o estímulo viral, os camundongos foram mortos e células de baço e lavagem peritoneal foram coletadas para determinação de infecção por cultura de vírus.

Resultados: Não foi observada toxidez por anticorpo em qualquer grupo de animais. Como mostrado na Tabela 20B, o HIV-1 foi recuperado em culturas realizadas até 4 semanas a partir tanto de esplenócitos como de células de lavagem peritoneal que foram co-cultivadas com PBLs humanos PHA-ativados de três (Nº. 4467, 4471 e 4473) entre cinco camundongos no grupo 1 dados 5 mg/kg de IgG_{2a} (RPC5.4), demonstrando uma taxa de infectividade de 60% para este grupo de controle. O vírus HIV-1 não foi recuperado de qualquer um dos vinte e um camundongos dos Grupos 2, 3, 4, 6 e 7 aos quais tinha sido fornecido MAb B4 a 50 mg/kg (grupos 2, 3 e 4) 0, 2 ou 4 horas após o estímulo viral; ou 15 mg/kg (grupo 6) e 5 mg/kg (Grupo 7) a intervalos de uma hora após o estímulo viral para estes últimos dois grupos, como mostrado na Tabela 20B. HIV-1 foi detectado por cultura viral em dois dos quatro camundongos do Grupo 5 (Nºs 4469 e 4472), o grupo que tinha recebido 50 mg/kg de MAb B4 24 horas após o estímulo. No entanto, HIV-1 foi recuperado da lavagem peritoneal somente do animal Nº. 4469 (Tabela 20B).

Experimento 3

Projeto e métodos. Os experimentos de proteção pós-exposição, especificamente, foram repetidos com a concentração de B4 mais baixa testada (5 mg/kg) até agora para um período de pós-exposição de até 4 horas. Os camundongos foram desafiados intraperitonealmente com 10 MID_{50} de isolado primário de HIV-1 AD6 antes da administração de qualquer anticorpo. Os camundongos do Grupo 1 de controle (n = 5) foram injetados intraperitonealmente com uma dose de 5 mg/kg de camundongo IgG_{2a} (RPC5.4) imediatamente após o estímulo com HIV-1. Aos camundongos do Grupo 2 (n = 5) foram administrados 5 mg/kg de MAb B4 imediatamente após o estímulo.

Uma, duas e quatro horas depois, os animais dos grupos 3, 4 e 5 respectivamente (n = 5 por grupo) receberam MAb B4 a uma concentração de 5 mg/kg. Cada camundongo pesou uma média de 20 g. Três semanas após estímulo viral, os camundongos foram mortos e as células de baço e lavagem peritoneal coletadas para determinação de infecção por cultura de vírus.

Resultados: Não foi observada toxidez por anticorpo em qualquer grupo dos animais. Como mostrado na Tabela 20C, o HIV-1 foi recuperado em culturas realizadas até 4 semanas tanto para esplenócitos como para células de lavagem peritoneal que foram co-cultivadas com PBLs humanos PHA-ativados de todos os cinco camundongos no grupo 1 dados 5 mg/kg de IgG_{2a} (RPC5.4), demonstrando uma taxa de infectividade de 100% para este grupo de controle. O vírus HIV-1 não foi recuperado de qualquer um dos vinte camundongos dos Grupos 2, 3, 4 e 5 aos quais tinha sido fornecido MAb B4 a 5 mg/kg a 0, 1, 2 ou 4 horas após o estímulo viral, como mostrado na Tabela 20C.

Tabela 20A

Profilaxia de Pré- e Pós-exposição de Infecção HIV-1_{AD6} em camundongos Hu-PBL-SCID por MAb B4

Experimento 1

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritoneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
	Murino IgG_{2a} Mab (RPC5,4) (50 mg/kg dose)				
1	4296	+	+	$5x10^3$	200
	4297	+	+	$5x10^5$	2
	4299	-	-	-	<0,2
	4303	+	+	$5x10^4$	20
	Mab B4, 1 hora antes do estímulo (5 mg/kg dose)				
2	4285	-	-	-	<0,2
	4287	-	-	-	<0,2
	4290	-	-	-	<0,2
	4305	-	-	-	<0,2
	4306	-	-	-	<0,2
	4311	-	-	-	<0,2

Tabela 20A (continuação)

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritoneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
	Mab B4, 1 hora antes do estímulo (50 mg/kg dose)				
3	4289	-	-	-	<0,2
	4291	-	-	-	<0,2
	4295	-	-	-	<0,2
	4300	-	-	-	<0,2
	4301	-	-	-	<0,2
	4302	-	-	-	<0,2
	Mab B4, 30 minutos após o estímulo (50 mg/kg dose)				
4	4261	-	-	-	<0,2
	4284	-	-	-	<0,2
	4307	-	-	-	<0,2
	4308	-	-	-	<0,2
	4310	-	-	-	<0,2
	4312	-	-	-	<0,2

Tabela 20B

Profilaxia de Pré- e Pós-exposição de Infecção HIV-1_{AD6} em camundongos hu-PBL-SCID por MAb B4

Experimento 2

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritoneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
	Murino IgG_{2a} (RPC5.4, 5 mg/kg dose) 0 hora após o estímulo				
1	4462	-	-	-	<0,2
	4465	-	-	-	<0,2
	4467	+	+	$5x10^6$	0,2
	4471	+	+	$5x10^6$	0,2
	4473	+	+	$5x10^2$	2000
	Mab B4, (5 mg/kg dose) 0 hora após o estímulo				
	4475	-	-	-	<0,2
2	4486	-	-	-	<0,2
	4488	-	-	-	<0,2
	4490	-	-	-	<0,2

Tabela 20B (continuação)

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem perito-neal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
3	Mab B4, (50 mg/kg dose) 2 horas após o estímulo				
	4500	-	-	-	<0,2
	4501	-	-	-	<0,2
	4503	-	-	-	<0,2
	4505	-	-	-	<0,2
	4509	-	-	-	<0,2
4	Mab B4, (50 mg/kg dose) 4 horas após o estímulo				
	4476	-	-	-	<0,2
	4495	-	-	-	<0,2
	4497	-	-	-	<0,2
	4506	-	-	-	<0,2
	4511	-	-	-	<0,2

Tabela 20B (continuação)

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
5	Mab B4, (50 mg/kg dose) 24 horas após o estímulo				
	4469	+	-	-	<0,2
	4472	+	+	$5x10^4$	20
	4474	-	-	-	<0,2
	4477	-	-	-	<0,2
6	Mab B4, (15 mg/kg dose) 1 hora após o estímulo				
	4478	-	-	-	<0,2
	4481	-	-	-	<0,2
	4489	-	-	-	<0,2
	4504	-	-	-	<0,2
7	Mab B4, (5 mg/kg dose) 1 hora após o estímulo				
	4485	-	-	-	<0,2
	4492	-	-	-	<0,2
	4496	-	-	-	<0,2
	4499	-	-	-	<0,2

Tabela 20C

Profilaxia de Pré- e Pós-exposição de Infecção HIV-1_{AD6} em camundongos hu-PBL-SCID por MAb B4

Experimento 2

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritoneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
1	Murino IgG_{2a} (RPC5.4) (5 mg/kg dose) 0 hora após o estímulo				
	4630	+	+	$5x10^5$	2
	4634	+	+	$5x10^1$	20,000
	464	+	+	$5x10^1$	20,000
	4652	+	+	$5x10^6$	2
	4664	+	+	$5x10^1$	20,000
2	Mab B4, (5 mg/kg dose) 0 hora após o estímulo				
	4636	-	-	-	<0,2
	4639	-	-	-	<0,2
	4640	-	-	-	<0,2
	4660	-	-	-	<0,2
	4666	-	-	-	<0,2

Tabela 20C (continuação)

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritoneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
3	Mab B4, (50 mg/kg dose) 1 hora após o estímulo				
	4643	-	-	-	<0,2
	4644	-	-	-	<0,2
	4645	-	-	-	<0,2
	4646	-	-	-	<0,2
	4648	-	-	-	<0,2
4	Mab B4, (50 mg/kg dose) 2 horas após o estímulo				
	4642	-	-	-	<0,2
	4649	-	-	-	<0,2
	4650	-	-	-	<0,2
	4653	-	-	-	<0,2
	4656	-	-	-	<0,2

Tabela 20C (continuação)

Grupos Experimentais		Recuperação de HIV-1 de camundongos hu-PBL-SCID: SEMANA 4 Co-cultura			
		Lavagem peritneal	Baço	Ponto final de cultura	TCID/10^6 células
5	Mab B4, (50 mg/kg dose) 4 horas após o estímulo				
	4651	+	-	-	<0,2
	4654	+	+	$5x10^4$	20
	4657	-	-	-	<0,2
	4658	-	-	-	<0,2
	4659	-	-	-	<0,2
6	Mab B4, (5 mg/kg dose) 1 hora após o estímulo				
	4485	-	-	-	<0,2
	4492	-	-	-	<0,2
	4496	-	-	-	<0,2
	4499	-	-	-	<0,2

Em resumo, os resultados obtidos a partir dos três experimentos seqüênciais acima demonstraram inequivocamente que a imunização passiva com MAb B4 fornece proteção completa contra infecção por um isolado primário de HIV-1 representativo em um modelo animal in vivo em ambos os modos de pré- e pós-exposição.

Como a infecção de seres humanos após exposição ocupacional a HIV-1 é rara, a maioria das exposições clínicas acidentais é estimada como sendo $\leq$ 1 dose infectiva humana. Portanto, a proteção de seres humanos contra infecção após a exposição ocupacional a HIV pode ser obtida com concentrações de anticorpo do soro muito mais baixas do que aquela usada no presente estudo do camundongo SCID (as doses de 5 e de 50 mg/kg do presente Exemplo dão origem a pico de concentrações de anticorpo do soro de >10 µg/mL e >100 µg/mL respectivamente).

Foi observada proteção completa contra uma alta dose (10 MID_{50}) infecção HIV-1 AD6 a concentrações de 5 mg/kg, 15 mg/kg e 50 mg/kg em um modo de pré-exposição. Foi observada proteção completa durante um intervalo maior do que 4 horas e menor do que 24 horas a 50 mg/kg e pelo menos até 4 horas a 5 mg/kg em um modo de pós-exposição. Estas observações indicam a utilidade da modalidade MAb B4 da invenção para profilaxia até 4 horas após exposição ocupacional a HIV-1.

EXEMPLO 19

Estudo de Interações do "Domínio Receptor de MAb B4-rsCD4-Quimiocina" Empregando Peptídeos Sintéticos que Representam Domínios Receptores de Quimiocina

Peptídeos domínios receptores de quimiocina sintéticos

Os peptídeos domínios receptores de quimiocina relacionados nas Tabelas 21 e 22 foram sintetizados pela técnica de síntese em fase sólida de Merrifield em sintetizadores automatizados de peptídeo da Applied Biosystems (Modelos 430, 431 e 433A) usando química Fmoc. Após montagem completa do peptídeo desejado, a resina foi tratada de acordo com procedimento padronizado usando ácido trifluoroacético para clivar o peptídeo da resina e desbloquear os grupos protetores sobre as cadeias lat-

erais de aminoácido. Os peptídeos marcados por ‡ também contêm um espaçador gly-gly e um epítopo auxiliar de célula T do vírus de hepatite B (HBV). Os peptídeos clivados, extraídos e lavados foram purificados por HPLC e caracterizados por esptrometria de massa e HPLC em fase reversa.

Avaliação quantitativa de interações de "domínio receptor de MAbB4-rsCD4-Quimiocina" por ELISAs respectivos.

Os respectivos ELISAs foram realizados essencialmente como o rsCD4 ELISA descritos aqui (Exemplo 3) exceto para a etapa de revestimento de antígeno, quando as cavidades de microtítulo foram revestidas durante toda a noite a 4°C com várias concentrações (0, 0,016, 0,063, 0,25, 1 e 4 µg/mL) do domínio do peptídeo receptor de quimiocina designado como mostrado na Tabela 22, que tinha sido pré-incubado com 0,25 µg/mL de rsCD4.

Resultados: Não foi detectada interação alguma entre MAb B4 (a concentrações de 10, 1, 0,1 e 0,01 µg/mL) e qualquer um dos domínio dos peptídeos receptores de quimiocina individuais foi detectado como medido pelo ELISA respectivo onde as microcavidades foram revestidas durante uma hora a 37°C com o peptídeo de domínio receptor de quimiocina designado a 5 µg/mL na ausência de rsCD4.

Tabela 21

Domínio de Peptídeos Receptor de Quimiocina Empregados para Estudo de Interação de "Domínio Receptor de MAb-rsCD4-Quimiocina"

Antígeno Peptídeo*		Antígeno Peptídeo *		Antígeno Peptídeo*		Antígeno Peptídeo *	
Código	Descrição	Código	Descrição	Código	Descrição	Código	Descrição
p1987 #	LESTR (1-38)-GG-HBVTh	p2011 #	IL8R$_\beta$ (1-46)-GG-HBVTh	p2033 #	C5a-R (1-32)-GG-HBVTh	p2048a	CC-CKR5 (261-277)
p1988a	LESTR (106-111)	p2012 #	IL8R$_\beta$ (106-120)-GG	p2034a	C5a-R (91-116)	p2079b #	CC-CKR3 (1-35)-GG
p1990 #	LESTR (181-203)-GG-HBVTh	p2027a	CC-CKR1(168-203)	p2035a	C5a-R (171-205)	p2080a	CC-CKR3 (92-107)
p1991a	LESTR (262-285)	p2028a	CC-CKR1(261-287)	p2036a	C5a-R (261-286)	p2081a	CC-CKR3 (173-204)
p1999 #	CC-CKR1(1-34)-GG-HBVTh	p2029a	IL8R$_\alpha$ (168-203)	p2041a	LESTR (103-114)	p2082a	CC-CKR3 (265-281)
p2004 #	CC-CKR1(94-107)-GG-HBVTh	p2030a	IL8R$_\alpha$ (259-296)	p2045 #	CC-CKR5 (1-29)-GG-HBVTh	p2086b #	CC-CKR2b (1-43)-GG-HBVTh
p2007 #	IL8R$_\alpha$ (1-39)-GG-HBVTh	p2031a	IL8R$_\beta$ (179-208)	p2046a	CC-CKR5 (88-102)	p2087a	CC-CKR2b (100-114)
p2008 #	IL8R$_\alpha$ (100-111)-GG-HBVTh	p2032a	IL8R$_\beta$ (270-302)	p2047a	CC-CKR5 (168-199)	p2088a	CC-CKR2b (182-207)
						p2089a	CC-CKR2b (269-285)

]# : HBVTh (FFLLTRILTIPQSLD) representa segmento de peptídeo com função auxiliar T promíscua derivada de proteína HBsAg.

GG : (Gly-Gly) como resíduos espaçadores inseridos entre o domínio receptor de quimiocina e o epítopo auxiliar T.

* : Foram projetados antígenos de peptídeo de domínio externo receptor de quimiocina de acordo com o sistema de numeração das seqüências de aminoácido deduzidas das seqüências de ácido nucléico para:
HuLESTR, IL8R$_\alpha$, IL8R$_\beta$ (Loetsher e outros, J. Biol. Chem. 1994, 269: 232)
CC-CKR1, CC-CKR2b, CC-CKR3, CC-CKR5 (Samson e outros, Biochemistry 1996, 35, 3362)
C5a-R (Grotzinger e outros, Protein Engineering 1991, 4: 767)

Tabela 22

Descrição Estrutural de Peptídeos Representando o Respectivo Domínio Receptor de Quimiocina como Mostrado no Estudo de Ligação "MAb B4-rsCD4"

Tipo de receptor de quimiocina		Códigos de peptídeo que representam o respectivo domínio receptor de quimiocina			
		1	2	3	4
α	IL8Rα	2007	2008	2029a	2030a
	IL8Rβ	2011	2012	2031a	2032a
	C5a-R	2033	2034a	2035a	2036a
β	CC-CKR1	1999	2004	2027a	2028a
	CC-CKR2b	2086b	2087a	2088a	2089a
	CC-CKR3	2079b	2086a	2081a	2082a
	CC-CKR5	2045	2046	2047a	2048a
	Fusina (LESTR)	1987	1988a	1990	1991a

Foi detectada apenas uma reatividade marginal entre MAb B4 e rsCD4 como medida pelo rsCD4 ELISA quando cavidades microtítulo foram revestidas somente com rsCD4 a 0,25 µg/mL a 4°C durante toda a noite.

No entanto, quando rsCD4 (a 0,25 µg/mL) foi pré-incubada com várias concentrações de cada peptídeo de domínio de quimiocina projetado, foram observados padrões variáveis de ligação a MAb B4 a rsCD4 como medido pelas respectivas leituras ELISA OD_{492}. A interação anterior de rsCD4 com certos peptídeos de domínio de receptor de quimiocina (por exemplo, domínios CC-CKR2b 2 e 3, CC-CKR5 domínio 3 e CC-CKR3 domínio 4) contribuiram significativamente para a ligação de rsCD4 a MAb B4. Tal melhoria é dependente da concentração do peptídeo. Esta tendência de interação "MAb B4-rsCD4" melhorada foi coerentemente observada a todas as concentrações de MAb B4 de 10, 1, 0,1 e 0,01 µg/mL.

O grau de melhoria, como medido pelo aumento em OD_{492} de ligação de MAb B4-rsCD4, foi calculado para a melhor concentração para que o respectivo peptídeo de domínio de receptor de quimiocina, geralmente a 1 µg/mL, quando comparado com ligação MAb B4 a rsCD4 a 0,25

µg/mL apenas. Foi graduado de 0 a 8 baseado na respectiva % de aumento de sinal para a melhor concentração de MAb B4 a 0,1 µg/mL como mostrado abaixo na Tabela 23.

A Tabela 23 resume as contribuições a ligação de MAb B4 por todos os quatro domínios externos de oito receptores de quimiocina. Como mostrado na Tabela 23, a ligação de MAb B4 a rsCD4 foi melhorada por diversos peptídeos de domínio de receptor de quimiocina o que sinaliza uma natureza promíscua para a conformação de CD4 pois esta é perturbada por contato com vários receptores de CO. Para uma molécula como CD4 envolvida com múltiplas funções imunorreguladoras, é razoável supor uma tal natureza dinâmica para sua superfície exposta. Esta descoberta também explica a dificuldade no mapeamento do epítopo reconhecido por MAb B4. Ele é caracterizado como epítopo descontínuo e difundido que não pode ser facilmente representado pelos sítios lineares e descontínuos apresentados pelos vários peptídeos CD4 mostrados na Tabela 4. Ele é ainda caracterizado aqui pelos dados da Tabela 23 para também envolver sítios apresentados pelos vários peptídeos receptores de quimiocina mostrados na Tabela 22. Em resumo, o sítio de reconhecimento de B4 é um epítopo conformacional altamente difundidos que compreende sítios provenientes de CD4 em contato com receptor de quimiocina, um co-receptor, para HIV e este epítopo é crítico para ligação de HIV a células hospedeiras e/ou entrada de HIV como refletido por seu status como um alvo para neutralização viral pós-exposição.

Tabela 23

Melhoria de Ligação de MAb B4-rsCD4 por Domínios Receptores de Quimiocina

Tipo de receptor de quimiocina		Grau de melhoria por domínio recptor respectivo			
		1	2	3	4
α	IL8Rα	1+	0	3+	1+
	IL8Rβ	0	0	0	1+
	C5a-R	2+	2+	2+	0
β	CC-CKR1	0	2+	0	0
	CC-CKR2b	3+	4+	5+	0
	CC-CKR3*	3+	1+	2+	8+
	CC-CKR5	0	2+	5+	0
	Fusina(LESTR)	1+	2+	0	0

Grau de melhoria a conc. de peptídeo de 1 µg/mL:

* a 4 µg/mL

0-50%	0	250-300	5+
50-100	1+	300-350	6+
100-150	2+	350-400	7+
150-200	3+	>400	8+
200-250	4+		

EXEMPLO 20

Estudos sobre rsCD4 e Interações de Receptor de Quimiocina e Afinidade do Anticorpo Monoclonal

Afinidade melhorada de rsCD4 para anticorpos neutralizantes anti-CD4 por peptídeo de domínio 3 receptor de quimicona CC-CKR5

A Tabela 23 apresentada no Exemplo 19 revelou graus significativos de melhoria de ligação de "MAb B4-rsCD4" por CC-CKR2b (domínios 2 e 3) e >4+, por CC-CKR3 (domínio 4) de 8+ e por CC-CKR5 (domínio 3) de 5+, enquanto apenas melhoria marginal foi afetada por peptídeos correspondentes a domínios de CXC-CKR4 (também denominado fusin ou LESTR).

Recentemente, Feng e outros, (Science, 1996, 272: 872) relataram que o receptor CXC-CKR4 era o co-receptor responsável pela entrada eficiente de cepas T-tropic de HIV-1 em células alvo enquanto uma série de relatórios de acompanhamento (Doranz e outros, Cell, 1996, 85: 1149; Dragic e outros, Nature, 1996, 381: 667; Choe e outros Cell, 1996, 85: 1135; Deng e outros, Nature, 1996, 381: 661; Alkhatib e outros, Science, 1996, 272: 1955) documentou que os receptores beta-quimiocina CC-CKR5, CC-CKR2b e CC-CKR3 foram os co-receptores para HIV-1 M-tropic, os isolados primários responsáveis pelo estabelecimento da infecção.

Como mostrado pelo Grupo 5 na Tabela 13, verificou-se que MAb B4 é mais eficaz para a neutralização de isolados primários de campo de todos os clados do que a cepa de laboratório T-tropic MN H9. Foi portanto relevante examinar a associação ou a falta dos mesmos entre os melhoramentos para a afinidade de anticorpos anti-CD4 para rsCD4 como contribuído por um peptídeo receptor de quimiocina e atividades de neutralização do isolado primário de campo. O peptídeo 2047a que representa o domínio 3 de CC-CKR5, um co-receptor para isolados primários de campo de HIV do tipo M-tropic e quatro anticorpos monoclonais anti-CD4 a uma concentração de 0,1 µg/mL com MAbs B4 e M2 tendo atividade de neutralização e MAbs E6 e J33 em falta dos mesmos foram empregados para este estudo de melhoramento.

Como mostrado na Figura 4, apenas os dois anticorpos de neutralização (isto é, MAbs B4 e M2) demonstraram meloria significativa de ligação de "MAb-rsCD4" por peptídeo 2047a em uma maneira dose dependente. Esta melhoria é melhor ainda quando 1 µg/mL de peptídeo 2047a foi pré-incubado com 0,25 µg/mL de rsCD4.

Avaliação quantitativa da afinidade melhorada de MAb B4 para a mistura do rsCD4/peptídeo de domínio 3 receptor de quimiocina CC-CKR5 em relação a rsCD4 sozinho.

Ensaios de inibição ELISA

A inibição rsCD4-induzida de ligação de MAb B4 foi realizada sobre placas de microtítulo revestidas com rsCD4 (0,25 µg/mL) ou rsCD4 (0,25 µg/mL) pré-incubadas com CC-CKR5 domínio 3(D3) peptídeo 2047a (1 µg/mL). As concentrações de ligação de ponto final para MAb B4 sobre rsCD4 e rsCD4/CC-CKR5-D3 cavidades de microtítulo revestidas foram predeterminadas como 2 µg/mL e 0,1 µg/mL respectivamente, baseado nas concentrações de MAb B4 que fornecem leituras de OD_{492nm} de 1,0 sobre as respectivas cavidades de microtítulo. A inibição da ligação de mAb B4 ÀS cavidades de microtítulo respectivamente revestidas foi então medida por pré-incubação de amostras diluídas de rsCD4 na faixa de 0 até 10 µg/mL com MAb B4 nas concentrações de ponto final de MAb B4 predeterminadas (isto é, 2 µg/mL para cavidades revestidas com rsCD4 e 0,1 µg/mL para cavidades revestidas com rsCD4/CC-CKR5-D3) durante uma hora a 37°Cseguido pelo procedimento padronizado rsCD4 ELISA descrito aqui no Exemplo 3.

As concentrações de rsCD4 que dão origem a 50% de inibição (isto é, IC_{50}) de MAb B4-rsCD4 e ligação de MAb B4-rsCD4/CC-CKR5-D3 foram 0,72 µg/mL e 0,047 µg/mL na presença da respectiva concentração de MAb B4 de 2 µg/mL e 0,1 µg/mL, como mostrado na Figura 5. Assim, a afinidade melhorada de MAb B4 para rsCD4 misturada com CC-CKR5-D3 (peptídeo 2047a) em relação àquela de MAb B4 para rsCD4 sozinho pode ser avaliado quantitativamente como um melhoramento de 15 vezes.

EXEMPLO 21

Anticorpo Monoclonal Dirigido Contra um Complexo Célula Hospedeira Antígeno Compreendendo CD4 Desenvolvido Por Imunização de Camundongos CD1 com SUP-T

Células SUP-T (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program nº do catálogo 100), uma linhagem de célula T derivada de linfoma humano, foi usada para imunizar camundongos CD1. A administração inicial era de 10 x 10^6 células em Adjuvante Completo de Freund, aplicado intraperitonealmente. Isto foi seguido por múltiplos reforços de 5-10 x 10^6 células administradas intraperitonealmente em um horário bissemanal, como descrito no Exemplo 3. Os últimos dois reforços foram dados com Freund Completos e Incompletos. De outro modo, os reforços foram de células lavadas aplicadas em soro fisiológico tamponado com fosfato (PBS). Foram realizadas esplenectomias após a imunização final. Foram preparados esplenócitos mononucleares, fundidos a células de mieloma de camundongo NS-1, foram obtidos hibridomas e clonados como descrito no Exemplo 3.

Os sobrenadantes do hibridoma foram então selecionados para reatividade por rsCD4 ELISA e para reatividade sobre um rsCD4/p2047a ELISA. O peptídeo 2047a (p2047a) é o peptídeo de domínio 3 CC-CKR5 descrito nos Exemplos 19, 20 e na Tabela 21. O rsCD4/p2047a ELISA foi realizado em cavidades de microtítulo revestidas com rsCD4 a 0,25 µg/mL e p2047a a 1 µg/mL, como otimizado no Exemplo 20. Um dos hibridomas secretou anticorpos, designados como B13, que apresentou um A_{492} de 0,353 sobre o rsCD4 ELISA e um A_{492} de 1,526 por rsCD4/p2047a ELISA. Isto é, B13 apresentou reatividade melhorada de rsCD4/p2047a comparado a reatividade de rsCD4 por ELISA. O hibridoma B13 foi então sujeito a mais 10 ciclos de subclonagem pro diluição e seleção. Cada ciclo forneceu clones que secretou anticorpo monoclonal reativo rsCD4 com reatividade rsCD4/-2047a melhorada por ELISA. O anticorpo monoclonal B13 (MAb 13) foi caracterizado como pertencendo ao isotipo IgG2a, o mesmo isotipo que MAb B4.

MAb B13 foi ainda analisado pelo ensaio competitivo por imunofluorescência indireta descrito no Exemplo 11 para demonstrar a capacidade que tem B13 de inibir a ligação de MAb B4 ao complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4. O MAb B4 biotinilado foi incubado com células alvo SUP-T que tinham sido pré-incubadas com um sobrenadante B13 ou anti-soro anti-CD4 de camundongo. As células de controle foram coradas a uma intensidade de formação de cor FITC de 3+ a uma taxa positiva de 95%. Em contraste, mais do que 95% das células SUP-T foram coradas a uma intensidade de 1,5 até 2,0 após a pré-incubação em anti-CD4 e não foi observada formação de manchas com células após a pré-incubação com sobrenadante de B13. Pode ser concluído que como MAb B4, B13 se liga especificamente com o complexo antígeno de célula hospedeira que compreende CD4.

A similaridade de MAb B13 com MAb B4 também foi demonstrada por uma comparação de atividade de neutralização contra isolados primários de HIV-1 de diversos clados. As atividades de neutralização de MAb B13 foram comparadas com aquelas de MAb B4 sobre isolados primários que representam HIV-1 clados A, B, C, D e E. Os vírus, as células hospedeiras de o Ensaio de Neutralização em Microplaca MT-2 eram como descritos no Exemplo 13. A similaridade entre as atividades de neutralização clado-cruzada de B13 e B4 é apresentada na Tabela 24.

Tabela 24

Neutralização de Isolados Primários de HIV-1 de Clados A, B, C, D, E por MAb B13 (Ensaio de Neutralização em Microplaca MT-2)

Anticorpo	Atividade de Neutralização (µg/mL)											
	UG 029 PBL (Clado A)		23135 PBL (Clado B)		ZIM 748 (Clado C)		UG 046 (Clado D)		UG 266 PBL (Clado D)		TH 036 PBL (Clado E)	
	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%	50%	90%
MAb B13	1,07	4,35	0,42	1,2	0,12	0,76	1,23	10,5	1,5	14,3	0,3*	0,6*
MAb B4	0,45	0,78	0,13	0,35	0,12	0,25	0,28	3,73	0,65	10,2	0,08*	0,5*

O vírus de entrada para Th 036 era baixo. Este geralmente fornece uma atividade de neutralização aparente mais alta do que teria sido obtida se o vírus de entrara tivesse sido comparável aos outros. Portanto, estes resultados são uma demonstração qualitativa de atividade de neutralização contra Th 036 e não devia ser comparado quantitativamente aos resultados para os outros isolados HIV-1.

LISTAGEM DE SEQÜÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO GERAL:

(i) REQUERENTE: United Biomedical, Inc., 25 David Drive, Hauppause, Nova York 11788

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: Anticorpos Contra um Complexo Antígeno de Célula Hospedeira para Proteção Pré- e Pós-Exposição de Infecção por HIV

(iii) NÚMERO DE SEQÜÊNCIAS: 2

(iv) ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA:

(A) DESTINATÁRIO: Morgano & Finnegan, L.L.P.

(B) RUA: 345 Park Avenue

(C) CIDADE: Nova York

(D) ESTADO: NY

(E) PAÍS: EUA

(F) CEP: 10154-0053

(v) FORMA LEGÍVEL EM COMPUTADOR:

(A) TIPO DE MEIO: Disquete

(B) COMPUTADOR: IBM PC Compatível

(C) SISTEMA OPERACIONAL: PC-DOS/MS-DOS

(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1,25

(vi) DADOS DE PEDIDO DE PATENTE CORRENTE

(A) NÚMERO DO PEDIDO DE PATENTE: a ser concedido

(B) DATA DO DEPÓSITO: 3 de junho de 1997

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DE PEDIDO DE PATENTE ANTERIOR:

(A) NÚMERO DO PEDIDO DE PATENTE US 08/808.374

(B) DATA DO DEPÓSITO: 28 DE FEVEREIRO DE 1997

(C) CLASSIFICAÇÃO:

(vii) DADOS DE PEDIDO DE PATENTE ORIGINAL:

(A) NÚMERO DO PEDIDO DE PATENTE US 08/657.149

(B) DATA DO DEPÓSITO: 3 DE JUNHO DE 1996

(C) CLASSIFICAÇÃO: 424

(viii) INFORMAÇÃO SOBRE O ADVOGADO/AGENTE:

(A) NOME: Maria C.H. Lin

(B) NÚMERO DE REGISTRO: 29.323

(C) REFERÊNCIA/NÚMERO DE REFERÊNCIA: 1151-4145PC

(ix) INFORMAÇÃO SOBRE TELECOMUNICAÇÃO:

(A) TELEFONE: (212) 415-8745

(B) TELEFAX: (212) 751-6849

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID Nº. 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 433 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ. ID Nº. 1:

```
Asn Lys Val Val Leu Gly Lys Lys Gly Asp Thr Val
                  5                  10
Glu Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gln Lys Lys Ser Ile
             15                  20
Gln Phe His Trp Lys Asn Trp Asn Gln Ile Lys Ile
 25                  30                  35
Leu Gly Asn Gln Gly Ser Phe Leu Thr Lys Gly Pro
             40                  45
Ser Lys Leu Asn Asp Arg Ala Asp Ser Arg Arg Ser
      50                  55                  60
Leu Trp Asp Gln Gly Asn Phe Pro Leu Ile Ile Lys
                  65                  70
Asn Leu Lys Ile Glu Asp Ser Asp Thr Tyr Ile Cys
             75                  80
Glu Val Glu Asp Gln Lys Glu Glu Val Gln Leu Leu
 85                  90                  95
Val Phe Gly Leu Thr Ala Asn Ser Asp Thr His Leu
            100                 105
Leu Gln Gly Gln Ser Leu Thr Leu Thr Leu Glu Ser
    110                 115                 120
Pro Pro Gly Ser Ser Pro Ser Val Gln Cys Arg Ser
                125                 130
Pro Arg Gly Lys Asn Ile Gln Gly Gly Lys Thr Leu
            135                 140
Ser Val Ser Gln Leu Glu Leu Gln Asp Ser Gly Thr
145                 150                 155
Trp Thr Cys Thr Val Leu Gln Asn Gln Lys Lys Val
                160                 165
Glu Phe Lys Ile Asp Ile Val Val Leu Ala Phe Gln
    170                 175                 180
Lys Ala Ser Ser Ile Val Tyr Lys Lys Glu Gly Glu
                185                 190
Gln Val Glu Phe Ser Phe Pro Leu Ala Phe Thr Val
            195                 200
Glu Lys Leu Thr Gly Ser Gly Glu Leu Trp Trp Gln
205                 210                 215
Ala Glu Arg Ala Ser Ser Ser Lys Ser Trp Ile Ile
                220                 225
```

```
Phe Asp Leu Lys Asn Lys Glu Val Ser Val Lys Arg
    230                 235                 240
Val Thr Gln Asp Pro Lys Leu Gln Met Gly Lys Lys
                245                 250
Leu Pro Leu His Leu Thr Leu Pro Gln Ala Leu Pro
            255                 260
Gln Tyr Ala Gly Ser Gly Asn Leu Thr Leu Ala Leu
265                 270                 275
Glu Ala Lys Thr Gly Lys Leu His Gln Glu Val Asn
                280                 285
Leu Val Val Met Arg Ala Thr Gln Leu Gln Lys Asn
    290                 295                 300
Leu Thr Cys Glu Val Trp Gly Pro Thr Ser Pro Lys
                305                 310
Leu Met Leu Ser Leu Lys Leu Glu Asn Lys Glu Ala
            315                 320
Lys Val Ser Lys Arg Glu Lys Pro Val Trp Val Leu
325                 330                 335
Asn Pro Glu Ala Gly Met Trp Gln Cys Leu Leu Ser
                340                 345
Asp Ser Gly Gln Val Leu Leu Glu Ser Asn Ile Lys
    350                 355                 360
Val Leu Pro Thr Trp Ser Thr Pro Val Gln Pro Met
                365                 370
Ala Leu Ile Val Leu Gly Gly Val Ala Gly Leu Leu
            375                 380
Leu Phe Ile Gly Leu Gly Ile Phe Phe Cys Val Arg
385                 390                 395
Cys Arg His Arg Arg Arg Gln Ala Glu Arg Met Ser
                400                 405
Gln Ile Lys Arg Leu Leu Ser Glu Lys Lys Thr Cys
    410                 415                 420
Gln Cys Pro His Arg Phe Gln Lys Thr Cys Ser Pro
                425                 430
Ile
```

(2) INFORMAÇÃO PARA SEQ. ID Nº. 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQÜÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: peptídeo

(xi) DESCRIÇÃO DE SEQÜÊNCIA: SEQ. ID Nº. 2:

```
Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln
                5                   10
Ser Leu Ile
        15
```

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a produção de um anticorpo para células T que expressam CD4, caracterizado pelo fato de que compreende:

a. usar como o imunógeno células T que expressam CD4 selecionadas do grupo que consiste de:

i. linfócitos T normais selecionados do grupo que consiste de células T mononucleares de sangue periférico, timócitos ou esplenócitos; ou

ii. linfoma T ou linhagens de célula T derivadas de leucemia selecionadas do grupo que consiste de SUP-T e HPB-ALL;

b. separar e lavar as células T que expressam CD4 em PBS;

c. imunizar intraperitonealmente um animal selecionado do grupo que consiste de camundongos BALB/c, camundongos CD1, camundongos transgênicos, ratos ou macacos rhesus com 5-10 x 10^6 das células T separadas e lavadas com PBS em PBS ou adjuvante completo de Freund, seguida por múltiplos reforços intraperitoneais a intervalos semanais ou bimestrais com 5-10 x 10^6 das células T separadas e lavadas com PBS sem adjuvante durante um total de três a seis meses, com o último reforço administrado intravenosamente três dias antes da fusão para formar hibridomas;

d. testar o soro do animal imunizado para a presença de anticorpos monoclonais que ligam-se a rsCD4;

e. realizar esplenectomia sobre o animal imunizado cujo soro testado positivo na etapa d para obter esplenócitos;

f. fundir os esplenócitos a células de uma linhagem de célula maligna imortal para formar hibridomas, clonar os hibridomas e selecionar os hibridomas que secretam anticorpos monoclonais que têm as seguintes características:

i. ligação a rsCD4;

ii. ligação a células que expressam CD4 em um ensaio de imunofluorescência em que o padrão de ligação está no formato de "coberturas" quando examinado com um microscópio com fluorescência de alta resolução;

iii. bloqueio da ligação de HIV gp120 a células que expressam CD4;

iv. ligação a células que expressam CD4 previamente ligadas com HIV gp120;

v. neutralização dos isolados primários de HIV em um ensaio de microplaca in vitro a uma concentração de < 10 µg/mL, de preferência a uma concentração na faixa de 0,01 - 10 µg/mL para 50% de neutralização e 0,1 - 35 µg/mL para 90% de neutralização;

vi. ligação a qualquer um dos quatro domínios extracelulares dos peptídeos de CD4 (SEQ ID NO.: 1) selecionados do grupo consistindo de: AA_1-AA_{20}, AA_{81}-AA_{92}, AA_{79}-AA_{88}, AA_{60}-AA_{109}, AA_{118}-AA_{165}, AA_{235}-AA_{251}, AA_{297}-AA_{351} ou AA_{361}-AA_{375} de CD4 (SEQ ID NO.: 1);

vii. ligação preferencial a rsCD4/receptor de quimiocina sobre rsCD4; e

viii. afinidade de ligação melhorada a rsCD4, na presença de receptor de quimiocina.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as características dos anticorpos monoclonais secretados também compreendem:

ix. fornecer imunidade passiva proveniente de infecção por isolados primários de HIV ou SIV a primatas ou camundongos hu-PBL-SCID a um ED_{50} de <50 mg/kg.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o receptor de quimiocina é o peptídeo CC-CKR5 D3.

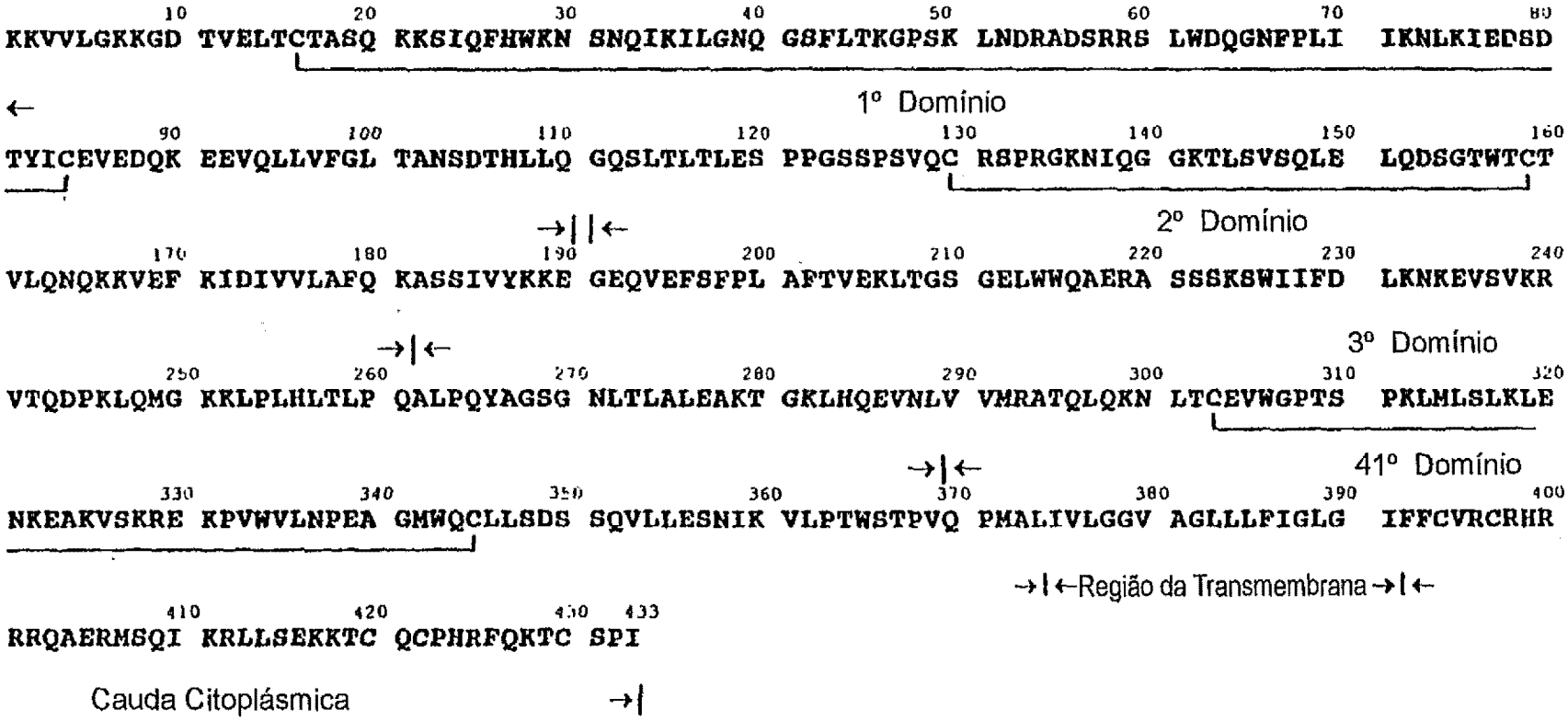
4. Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células que expressam CD4 são células SUP-T.

5. Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que as células que expressam CD4 são células HPB-ALL.

6. Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o animal é camundongo BALB/c ou CD1.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o animal é um camundongo transgênico contendo seqüências humanas de transgene que codificam uma cadeia humana pesada e uma cadeia humana leve.

FIG. 1 Seqüência de Aminoácido Deduzida de CD4 Humano (Seqüência ID Nº.: 1)



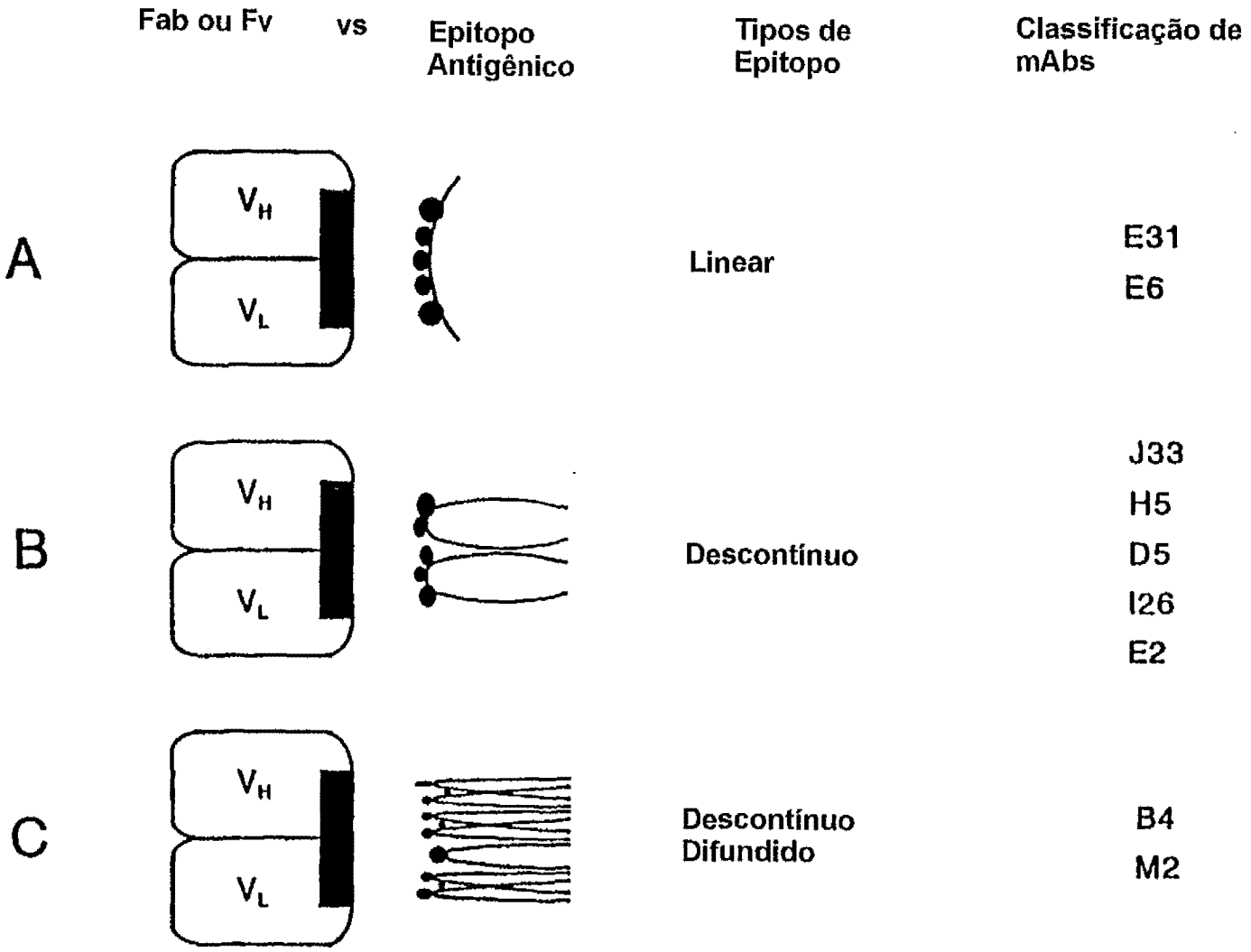
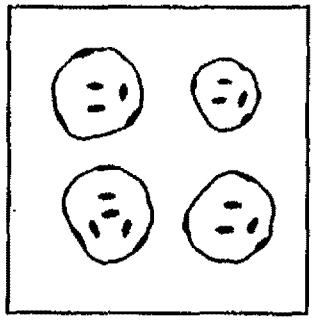

Fab ou Fv
vs
Epitopo Antigênico
Tipos de Epitopo
Classificação de mAbs
A
V_H
V_L
Linear
E31
E6
B
V_H
V_L
Descontínuo
J33
H5
D5
I26
E2
C
V_H
V_L
Descontínuo Difundido
B4
M2

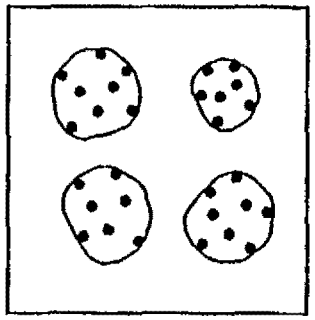
FIG. 2



Capas

(MAbs B4 e M2)

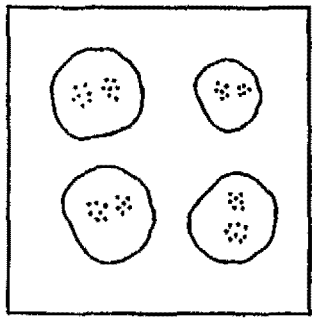
FIG. 3A.



Emplastros

(Soro MAbs E6, E2, H5, D5, E2, J33 e GPαrsCD4)

FIG. 3B.



Aglomerados

(HIV-1 gp120 Marcado com FITC)

FIG. 3C.

FIG. 4

Afinidade Melhorada de rsCD4 por Anticorpos Neutralizadores Anti-CD4 por Peptídeo de Domínio 3 Receptor de Quimiocina CC-CKR5

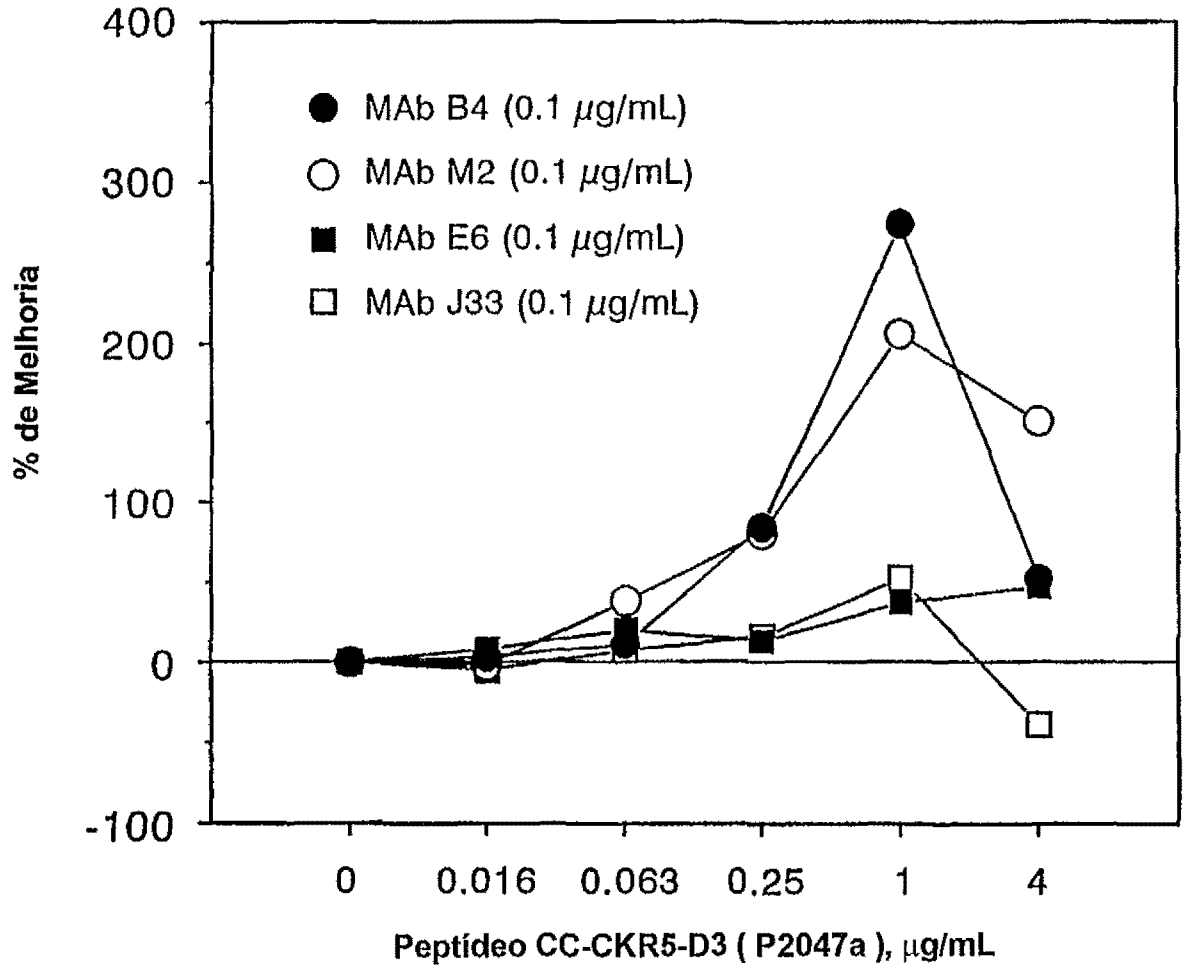


FIG. 5

Afinidade Melhorada de MAb B4 para rsCD4 por Peptídeo de Domínio 3

Receptor de Quimiocina CC-CKD5

