



MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

REPUBLICA MOLDOVA

(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) MD/EP 3638698 (13) T2

(51) Int. Cl.: C07K 16/28 (2006.01.01)
C07K 16/40 (2006.01.01)
C07K 16/10 (2006.01.01)
A61P 31/16 (2006.01.01)
A61K 39/395 (2006.01.01)

(12) BREVET DE INVENȚIE EUROPEAN VALIDAT

(21) Numărul de depozit: e 2020 0454 (22) Data de depozit: 2019.01.24 (96) Numărul cererii și data de depozit a cererii de brevet european: 19701428.5, 2019.01.24 (97) Numărul de publicare și data publicării de către OEB a cererii de brevet european: 3638698, 2020.04.22 (31) Numărul cererii prioritare: 201862622292 P (32) Data de depozit a cererii prioritare: 2018.01.26 (33) Țara cererii prioritare: US	(49) Data publicării traducerii fasciculului de brevet european validat: BOPI nr. 07/2021, 2021.07.31 (80) Data publicării mențiunii acordării de către OEB: EPB nr. 09/2021, 2021.03.03 (82) Data publicării solicitării de validare a brevetului european: BOPI nr. 05/2020, 2020.05.31
(71) Solicitant: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (72) Inventator: PURCELL Lisa, US (73) Titular: REGENERON PHARMACEUTICALS, INC., US (74) Mandatar autorizat: LAZICOV Tatiana	

(54) Anticorpi anti-TMPRSS2 și fragmente de legare al antigenului

(57) Rezumat:

1

Prezenta invenție include un anticorp sau un fragment de legare a antigenului acestuia care se leagă în mod specific de TMPRSS2 și metode de utilizare a acestor anticorpi și fragmente pentru tratarea sau

2

prevenirea infecțiilor virale (de exemplu, infecții cu virus gripal).
Secvențe: 48
Revendicări: 15
Figuri: 9

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

(54) Anti-TMPRSS2 antibodies and antigen-binding fragments**(57) Abstract:**

¹
The present invention includes an antibody or antigen-binding fragment thereof that binds specifically to TMPRSS2 and methods of using such antibodies and fragments for treating or preventing viral

²
infections (e.g., influenza virus infections).

Sequences: 48

Claims: 15

Fig.: 9

Descriere:**(Descrierea se publică în varianta redactată de solicitant)**

5 Această cerere de brevet revendică beneficiul cererii de brevet de invenție provizorie U.S. nr. 62/622.292, înregistrată în 26 Ianuarie 2018.

DOMENIUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la anticorpi și la fragmente de legare a antigenului care se leagă în mod specific la TMPRSS2 și la metode pentru tratarea sau prevenirea infecțiilor virale cu respectivii anticorpi și fragmente.

STADIUL TEHNICII

10 Virurile gripale au dobândit rezistență la medicamentele utilizate în prezent, care țintesc neuraminidaza virală (NA) sau proteina canalului ionic, proteina matrice 2 (M2). Apariția rezistenței la medicamente evidențiază necesitatea dezvoltării unor noi strategii antivirale. Direcționarea către celulele gazdă poate reduce sau evita apariția mutanților de evadare, dar ar putea crea o “ramificație” din cauza exprimării pe scară largă și ar crește îngrijorarea pentru
 15 toxicitate. S-a demonstrat că un număr de proteine de fuziune ale virusului respirator necesită scindare prin proteaza (proteazele) gazdă pentru activare (Shirato ș.a. Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. Journal of Virology. 91, e01387-16 (2017); Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. PLoS ONE. 12, e0179177 (2017); Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. Antiviral Research. 116, 76-84 (2015); Zmora ș.a. TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. PLoS ONE. 10, e0138380 (2015)), inclusiv gripa (Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. PLoS ONE. 12, e0176597 (2017); Bottcher-Friebertshäuser ș.a., Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011); Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. Journal of Virology. 84, 10016-10025 (2010); Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. Journal of Virology (2014), May;88(9):4744-51).

Precursorul hemagglutininei gripale A (HA0) necesită scindarea de către o serin protează gazdă, la HA1 și HA2, pentru activare. De exemplu, proteaza transmembranară, serina 2; TMPRSS2, TMPRSS4 și TMPRSS11D, precum și proteaza asemănătoare tripsinei căilor
 35 respiratorii umane (HAT) au fost implicate în scindarea HA (Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. Journal of Virology. 84, 10016-10025 (2010); Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. Journal of Virology. 2006 Oct;80(19):9896-8; Publicația cererii de brevet internațional nr. WO2017/151453). De asemenea, TMPRSS2 este o țintă pentru terapia anti-cancer. Vezi de ex., WO2008127347 și WO2002004953. O fuziune între *TMPRSS2* și *ERG* (*TMPRSS2:ERG*) este o fuziune genică cunoscută a fi un factor principal al carcinogenezei prostatei care este declanșată de ERα și reprimată de ERβ. Bonkhoff, Estrogen receptor signaling in prostate cancer: Implications for carcinogenesis and tumor progression, Prostate 78(1): 2-10 (2018).

45 WO 02/04953 descrie TMPRSS2 ca o potențială țintă terapeutică pentru anumite tipuri de cancer și descrie generarea de anticorpi monoclonali anti-TMPRSS2.

US 2013/0273070 se referă la metode pentru tratarea sau prevenirea infecției cu virusul gripal prin administrarea unui inhibitor de serin protează, cum ar fi, un inhibitor al TMPRSS2. De Nardis ș.a. (2017) The Journal of Biological Chemistry vol. 292(3):912-924 se referă la proteina 1 legată de receptorul LDL (LRP1) și descrie expresia recombinantă a ectodomeniului de lungime completă al LRP1. Wilson ș.a. (2005) Biochem J. 388:967-972 se referă la activarea PAR-2 în celulele canceroase de prostată prin TMPRSS2 și descrie generarea unui anticorp TMPRSS2 anti-uman polyclonal. Shen ș.a. (2017) Biochimie 142:1-10 revizuieste rolul TMPRSS2 ca țintă potențială pentru tratamentul virusului gripal.

55 WO 2008/076379 se referă la anticorpii umani pentru delta umană, asemănătoare ligandului 4 și la secvențele acestora.

REZUMATUL INVENȚIEI

Deși există inhibitori cu molecule mici ai TMPRSS2 și anticorpi de cercetare, utili, de exemplu, pentru imunohistochimie, există o necesitate în domeniu pentru neutralizarea anticorpilor terapeutici anti-TMPRSS2 și utilizarea acestora pentru tratarea sau prevenirea infecției virale. Vezi

de ex., Shen ș.a. Biochimie 142: 1-10 (2017), WO2008127347; WO2002004953; US9498529; anticorp ab92323, disponibil de la Abcam (Cambridge, MA) sau anticorpii sc-515727 și sc-101847 disponibili de la Santa Cruz Biotech (Dallas, TX). Prezenta dezvăluie abordează această necesitate, în parte, prin furnizarea de anticorpi umani anti-umani TMPRSS2, cum ar fi, H1H7017N, și combinații ale acestora incluzând, de exemplu, anticorpi anti-gripali HA (de ex., grupul I HA sau grupul II HA) și metode de utilizare a acestora pentru tratarea infecțiilor virale.

În mod specific, prezenta invenție furnizează o proteină care leagă antigenul uman care se leagă în mod specific la TMPRSS2 umană și care este un anticorp sau un fragment de legare la antigen al acestuia și în care proteina care leagă antigenul cuprinde:

- 10 o regiune variabilă a lanțului greu a imunoglobulinei care cuprinde
(a) un CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi: G F T F S S Y G (SECV ID NR: 6),
(b) un CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi: I W N D G S Y V (SECV ID NR: 8), și
(c) a CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi: A R E G E W V L Y Y F D Y (SECV ID NR: 10); și
15 o regiune variabilă a lanțului ușor al imunoglobulinei care cuprinde
(a) un CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q S I S S W (SECV ID NR: 12),
(b) un CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi: K A S (SECV ID NR: 14), și
(c) un CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q Q Y N S Y S Y T (SECV ID NR: 16).

Prezenta invenție furnizează, de asemenea, un complex care cuprinde o proteină de legare a antigenului conform invenției legată de o polipeptidă TMPRSS2.

De asemenea, este furnizată de prezenta invenție o metodă pentru obținerea unei proteine de legare a antigenului conform invenției care cuprinde:

- 25 (a) introducerea într-o celulă gazdă: (i) o polinucleotidă care codifică un lanț greu de imunoglobulină și un lanț ușor de imunoglobulină al proteinei care leagă antigenul; sau (ii) o polinucleotidă care codifică un lanț greu de imunoglobulină al respectivei proteine care leagă antigenul și o polinucleotidă care codifică un lanț ușor de imunoglobulină al respectivei proteine care leagă antigenul;
30 (b) cultivarea celulei gazdă în condiții favorabile exprimării polinucleotidelor; și
(c) opțional, izolarea proteinei de legare a antigenului din celula gazdă și/sau mediu în care este cultivată celula gazdă.
Prezenta invenție furnizează, de asemenea, o polinucleotidă care codifică:
un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde:
35 (a) un CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi: G F T F S S Y G (SECV ID NR: 6),
(b) un CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi: I W N D G S Y V (SECV ID NR: 8), și
(c) un CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi: A R E G E W V L Y Y F D Y (SECV ID NR: 10); și
40 un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde:
(a) un CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q S I S S W (SECV ID NR: 12),
(b) un CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi: K A S (SECV ID NR: 14), și
(c) un CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q Q Y N S Y S Y T (SECV ID NR: 16).

- 45 De asemenea, este furnizat prin prezenta invenție: un vector care cuprinde o polinucleotidă conform invenției; o celulă gazdă care cuprinde o proteină care leagă antigenul conform invenției, o polinucleotidă conform invenției, sau un vector conform invenției; o compoziție, sau un kit care cuprinde o proteină care leagă antigenul conform invenției și un alt agent terapeutic în care kitul cuprinde proteina care leagă antigenul și agentul terapeutic suplimentar formulat ca o singură compoziție, sau separat în două sau mai multe compoziții; o compoziție farmaceutică care cuprinde o proteină care leagă antigenul conform invenției și un purtător acceptabil farmaceutic și, opțional, un alt agent terapeutic; și un vas sau dispozitiv de injecție care cuprinde o proteină care leagă antigenul conform invenției, sau o compoziție a invenției (de ex., o compoziție farmaceutică conform invenției).

- 55 Invenția furnizează, de asemenea, o proteină care leagă antigenul conform invenției pentru a fi utilizată într-o metodă pentru tratarea sau prevenirea infecției cu un virus gripal la un subiect care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic din proteina menționată care leagă antigenul.

- 60 De asemenea, este dezvăluită o proteină de neutralizare umană care leagă antigenul care se leagă în mod specific la TMPRSS2 umană, de exemplu, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului al acestuia. Într-un aspect al dezvăluirii, proteina care leagă antigenul cuprinde: (a) o

regiune variabilă a lanțului ușor al imunoglobulinei care cuprinde o secvență de aminoacizi care are cel puțin 90% identitate a secvenței de aminoacizi cu secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 4 sau 18; și/sau (b) o regiune variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei care cuprinde o secvență de aminoacizi care are cel puțin 90% identitate a secvenței de aminoacizi cu secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 2, 17 sau 19. În cazul în care proteina care leagă antigenul este o proteină care leagă antigenul conform invenției, proteina care leagă antigenul este conform revendicărilor și, în consecință, cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei care cuprinde (a) un CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi: G F T F S S Y G (SECV ID NR: 6); (b) un CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi: I W N D G S Y V (SECV ID NR: 8); (c) un CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi: A R E G E W V L Y Y F D Y (SECV ID NR: 10); și o regiune variabilă a lanțului ușor al imunoglobulinei care cuprinde (a) a CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q S I S S W (SECV ID NR: 12); (b) a CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi: K A S (SECV ID NR: 14); și/sau (c) a CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q Q Y N S Y S Y T (SECV ID NR: 16). Într-un exemplu de realizarea proteinei de legare a antigenului conform invenției, proteina de legare a antigenului cuprinde: (a) un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 17 sau 19; și/sau (b) un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 18.

De asemenea, este dezvăluită orice proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul care concurează cu orice proteină care leagă antigenul care este prezentată aici pentru legarea la TMPRSS2 (de ex., așa cum se determină prin utilizarea unei analize de interferometrie bio-strat, fără etichetă în timp real, de ex., pe un biosenzor Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.)); sau care se leagă de același sau de un epitop suprapus pe TMPRSS2 (sau un fragment al acestuia) ca orice proteină care leagă antigenul, care este prezentată aici.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, proteine multispecifice care leagă antigenul care se leagă de TMPRSS2 și un alt antigen, sau de TMPRSS2 la un epitop diferit. De exemplu, molecula multispecifică cuprinde (a) un prim domeniu de legare la antigen care se leagă în mod specific de TMPRSS2; și (b) un al doilea domeniu de legare la antigen care se leagă în mod specific de un alt antigen, sau de TMPRSS2, sau de un epitop care diferă de cel al primului domeniu de legare a antigenului. Într-un exemplu de realizarea invenției, proteina de legare a antigenului conform invenției este multispecifică.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, orice proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (de ex., un anticorp sau fragment de legare a antigenului, de ex., care cuprinde o secvență prezentată aici) care cuprinde una sau mai multe dintre următoarele proprietăți:

- Inhibă creșterea virusului gripal (de ex., A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)) în celule care exprimă TMPRSS2 (de ex., celule Calu-3);

- Se leagă de suprafața celulelor care exprimă TMPRSS (de ex., MDCK/Tet-on), de ex., cu o valoare EC_{50} de 440 pM sau 1,06 nM;

- Nu se leagă semnificativ de celulele MDCK/Tet-on care nu exprimă TMPRSS2;

- Se leagă de TMPRSS2 umană cu o K_D de aproximativ $2,81 \times 10^{-9}$ M la aproximativ 25°C;

- Se leagă de TMPRSS2 umană cu o K_D de aproximativ $9,31 \times 10^{-9}$ M la aproximativ 37°C;

- Se leagă de TMPRSS2 de cynomolgous cu o K_D de aproximativ $5,60 \times 10^{-8}$ M la aproximativ 25°C;

- Se leagă de TMPRSS2 de cynomolgous cu o K_D de aproximativ $1,40 \times 10^{-7}$ M la aproximativ 37°C;

- Limitează răspândirea infecției cu celule ale virusului gripal *in vitro*; și/sau

- Protejează un șoarece conceput pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 de moartea cauzată de infecția cu virusul gripal.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, un complex care cuprinde orice proteină care leagă antigenul stabilită aici legată de o polipeptidă TMPRSS2, *de ex.*, *in vitro* sau în corpul unui subiect.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, o metodă pentru fabricarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, prezentată aici (*de ex.*, H1H7017N) sau lanțul său de imunoglobulină care cuprinde: (a) introducerea uneia sau mai multor polinucleotide care codifică un lanț ușor și/sau un lanț de greu de imunoglobulină al proteinei de legare a antigenului menționată; (b) cultivarea celulei gazdă (*de ex.*, celula CHO, celula *Pichia* sau celula *Pichia pastoris*) în condiții favorabile exprimării polinucleotidei; și (c) opțional, izolarea proteinei de legare a antigenului sau a lanțului de imunoglobulină de celula gazdă și/sau de mediul în care este

crescută celula gazdă. O proteină care leagă antigenul sau un lanț de imunoglobulină care este un produs al unei astfel de metode face parte din prezenta dezvăluire.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, o polinucleotidă (de ex., ADN sau ARN) care codifică o polipeptidă a prezentei dezvăluiri. Într-un aspect al dezvăluirii, polinucleotida codifică două lanțuri diferite de imunoglobulină (*de ex.*, greu și ușor). Într-un aspect al dezvăluirii, o polinucleotidă codifică un lanț ușor de imunoglobulină și o altă polinucleotidă codifică un lanț greu de imunoglobulină, *de ex.*, în care lanțurile sunt într-o celulă gazdă sau sunt într-un vas. De exemplu, polinucleotida este într-un vector (*de ex.*, o plasmidă) și/sau este integrat într-un cromozom al celulei gazdă. Polinucleotida conform invenției este cea stabilită în revendicări.

Celulele gazdă (*de ex.*, celula CHO, celula *Pichia* sau celula *Pichia pastoris*) din prezenta dezvăluire pot include o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, H1H7017N), polipeptida acesteia sau polinucleotida care codifică o astfel de polipeptidă și/sau un vector care include o astfel de polinucleotidă.

Prezenta dezvăluire furnizează, de asemenea, o compoziție sau un kit care cuprinde o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul stabilită aici (*de ex.*, H1H7017N) în asociere cu un alt agent terapeutic (*de ex.*, un medicament antiviral și/sau un vaccin). Mai specific, în prezenta invenție este furnizată o compoziție sau un kit care cuprinde proteina care leagă antigenul conform invenției și un alt agent terapeutic, în care kitul cuprinde proteina care leagă antigenul și agentul terapeutic suplimentar formulat ca o singură compoziție, sau separat în două sau mai multe compoziții. De exemplu, compoziția poate fi o compoziție farmaceutică care cuprinde proteina care leagă antigenul și purtătorul acceptabil farmaceutic și, opțional, un alt agent terapeutic; în care compoziția farmaceutică este o compoziție farmaceutică conform invenției, proteina care leagă antigenul este o proteină care leagă antigenul așa cum este prevăzut în revendicări. Agentul terapeutic suplimentar poate fi ledipasvir, sofosbuvir, o combinație de ledipasvir și sofosbuvir, oseltamivir, zanamivir, ribavirină și interferon-alfa2b, interferon-alfa2a și/sau un anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia care se leagă în mod specific de HA gripal. Agentul terapeutic suplimentar poate fi un anticorp sau un fragment de legare a antigenului al acestuia selectat din grupul care constă din H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N; H1H11704P; H1H11711P; H1H11714P; H1H11717P; H1H11724P; H1H11727P; H1H11730P2; H1H11731P2; H1H11734P2; H1H11736P2; H1H11742P2; H1H11744P2; H1H11745P2; H1H11747P2; H1H11748P2; H1H117952B; H1H117953B; H1H117954B; H1H117955B; H1H117956B; H1H117957B; H1H117958B; H1H117959B; H1H117960B; H1H117961B; H1H117962B; H1H117963B; H1H117964B; H1H117965B; H1H117966B; H1H117967B; H1H117968B; H1H117969B; H1H117970B; H1H117971B; H1H117972B; H1H117973B; H1H117974B; H1H117975B; H1H117976B; H1H117977B; H1H117978B; H1H117979B; H1H117980B; H1H117981B; H1H117982B; H1H117983B; H1H117984B; H1H117985B; H1H117986B; H1H117987B; H1H117988B; H1H117989B; H1H117990B; H1H117991B; H1H117992B; H1H117993B; H1H117994B; H1H117995B; H1H117996B; H1H117997B; H1H117998B; H1H117999B; H1H18000B; H1H18001B; H1H18002B; H1H18003B; H1H18004B; H1H18005B; H1H18006B; H1H18007B; H1H18008B; H1H18009B; H1H18010B; H1H18011B; H1H18012B; H1H18013B; H1H18014B; H1H18015B; H1H18016B; H1H18017B; H1H18018B; H1H18019B; H1H18020B; H1H18021B; H1H18022B; H1H18023B; H1H18024B; H1H18025B; H1H18026B; H1H18027B; H1H18028B; H1H18029B; H1H18030B; H1H18031B; H1H18032B; H1H18033B; H1H18034B; H1H18035B; H1H18037B; H1H18038B; H1H18039B; H1H18040B; H1H18041B; H1H18042B; H1H18043B; H1H18044B; H1H18045B; H1H18046B; H1H18047B; H1H18048B; H1H18049B; H1H18051B; H1H18052B; H1H18053B; H1H18054B; H1H18055B; H1H18056B; H1H18057B; H1H18058B; H1H18059B; H1H18060B; H1H18061B; H1H18062B; H1H18063B; H1H18064B; H1H18065B; H1H18066B; H1H18067B; H1H18068B; H1H18069B; H1H18070B; H1H18071B; H1H18072B; H1H18073B; H1H18074B; H1H18075B; H1H18076B; H1H18077B; H1H18078B; H1H18079B; H1H18080B; H1H18081B; H1H18082B; H1H18083B; H1H18084B; H1H18085B; H1H18086B; H1H18087B; H1H18088B; H1H18089B; H1H18090B; H1H18091B; H1H18092B; H1H18093B; H1H18094B; H1H18095B; H1H18096B; H1H18097B; H1H18098B; H1H18099B; H1H18100B; H1H18101B; H1H18102B; H1H18103B; H1H18104B; H1H18105B; H1H18107B; H1H18108B; H1H18109B; H1H18110B; H1H18111B; H1H18112B; H1H18113B; H1H18114B; H1H18115B; H1H18116B; H1H18117B; H1H18118B; H1H18119B; H1H18120B; H1H18121B; H1H18122B; H1H18123B; H1H18124B; H1H18125B; H1H18126B; H1H18127B; H1H18128B; H1H18129B; H1H18130B; H1H18131B; H1H18132B; H1H18133B; H1H18134B; H1H18135B; H1H18136B; H1H18137B; H1H18138B; H1H18139B; H1H18140B; H1H18141B; H1H18142B; H1H18143B; H1H18144B; H1H18145B; H1H18146B; H1H18147B; H1H18148B; H1H18149B; H1H18150B; H1H18151B; H1H18152B; H1H18153B; H1H18154B; H1H18155B; H1H18156B; H1H18157B; H1H18158B;

H1H18159B; H1H18160B; H1H18161B; H1H18162B; H1H18163B; H1H18164B; H1H18165B; H1H18166B; H1H18167B; H1H18168B; H1H18169B; H1H18170B; H1H18171B; H1H18172B; H1H18173B; H1H18174B; H1H18175B; H1H18176B; H1H18177B; H1H18178B; H1H18179B; H1H18180B; H1H18181B; H1H18182B; H1H18183B; H1H18184B; H1H18185B; H1H18186B; 5 H1H18187B; H1H18188B; H1H18189B; H1H18190B; H1H18191B; H1H18192B; H1H18193B; H1H18194B; H1H18195B; H1H18196B; H1H18197B; H1H18198B; H1H18199B; H1H18200B; H1H18201B; H1H18202B; H1H18203B; H1H18204B; H1H18205B; H1H18206B; H1H18207B; H1H18208B; H1H18209B; H1H18210B; H1H18211B; H1H18212B; H1H18213B; H1H18214B; H1H18216B; H1H18217B; H1H18218B; H1H18219B; H1H18220B; H1H18221B; H1H18222B; 10 H1H18223B; H1H18224B; H1H18225B; H1H18226B; H1H18227B; H1H18228B; H1H18229B; H1H18230B; H1H18231B; H1H18232B; H1H18233B; H1H18234B; H1H18235B; H1H18236B; H1H18237B; H1H18238B; H1H18239B; H1H18240B; H1H18241B; H1H18242B; H1H18243B; H1H18244B; H1H18245B; H1H18246B; H1H18247B; H1H18248B; H1H18249B; H1H18250B; H1H18251B; H1H18252B; H1H18253B; H1H18254B; H1H18255B; H1H18256B; H1H18257B; 15 H1H18258B; H1H18259B; H1H18261B; H1H18262B; H1H18263B; H1H18264B; H1H18265B; H1H18266B; H1H18267B; H1H18268B; H1H18269B; H1H18270B; H1H18271B; H1H18272B; H1H18274B; H1H18275B; H1H18276B; H1H18277B; H1H18278B; H1H18279B; H1H18280B; H1H18281B; H1H18282B; H1H18283B; H1H18284B; H1H18285B; H1H18286B; H1H18287B; H1H18288B; H1H18289B; H1H18290B; H1H18291B; H1H18292B; H1H18293B; H1H18294B; 20 H1H18295B; H1H18297B; H1H18298B; H1H18299B; H1H18300B; H1H18301B; H1H18302B; H1H18303B; H1H18304B; H1H18305B; H1H18306B; H1H18307B; H1H18308B; H1H18309B; H1H18310B; H1H18311B; H1H18312B; H1H18313B; H1H18314B; H1H18315B; H1H18316B; H1H18317B; H1H18318B; H1H18319B; H1H18320B; H1H18321B; H1H18322B; H1H18323B; H1H18324B; H1H18325B; H1H18326B; H1H18327B; H1H18328B; H1H18329B; H1H18330B; 25 H1H18331B; H1H18332B; H1H18333B; H1H18334B; and H1H18335B.

Intr-un aspect al dezvoltării, un alt agent terapeutic care este furnizat în asociere cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul este un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se leagă de proteina HA a grupei II gripale, cum ar fi H1H14611N2; sau un anticorp sau fragment care cuprinde V_H și V_L de H1H14611N2; sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 din H1H14611N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 25-27) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H14611N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 29-31).

Intr-un aspect al dezvoltării, un alt agent terapeutic care este furnizat în asociere cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul este un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se leagă de proteina HA a grupei II gripale, cum ar fi, H1H14612N2; sau un anticorp sau fragment care cuprinde V_H și V_L de H1H14612N2; sau un lanț greu de imunoglobulină cu care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 din H1H14612N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 41-43) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H14612N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 45-47).

Intr-un aspect al dezvoltării, un alt agent terapeutic care este furnizat în asociere cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul este un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se leagă de proteina HA a grupei I gripale, cum ar fi, H1H11729P; sau un anticorp sau fragment care cuprinde V_H și V_L de H1H11729P; sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 din H1H11729P (*de ex.*, SECV ID NR. 33-35) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H11729P (*de ex.*, SECV ID NR. 37-39).

Prezenta dezvoltare oferă, de asemenea, un vas sau un dispozitiv de injecție care cuprinde o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, H1H7017N) sau compoziția acestuia (*de ex.*, compoziție farmaceutică).

Prezenta dezvoltare oferă, de asemenea, o metodă pentru tratarea sau prevenirea unei infecții virale, altele decât o infecție cu virus gripal, la un subiect (*de ex.*, un om) care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic de proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul stabilită aici (*de ex.*, H1H7017N).

Prezenta dezvoltare oferă, de asemenea, o metodă pentru tratarea sau prevenirea cancerului (de ex., cancer de prostată) sau a unei infecții, *de ex.*, o infecție virală, *de ex.*, o infecție cu virusul gripei, coronavirus, virusul SARS-Co, virusul MERS-Co, virusul parainfluenza, metapneumovirusul uman sau virusul hepatitei C (VHC), la un subiect (*de ex.*, un om) care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic de proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul stabilită aici (*de ex.*, H1H7017N). De exemplu, proteina care leagă antigenul este administrată în asociere cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari (*de ex.*, medicament antiviral și/sau un vaccin). Într-un aspect al dezvoltării, un alt agent terapeutic

este un membru selectat din grupul format din: ledipasvir, sofosbuvir, o combinație de ledipasvir și sofosbuvir, oseltamivir, zanamivir, ribavirină și interferon-alfa2b, interferon-alfa2a și un anticorp sau fragment de legare la antigen al acestuia care se leagă în mod specific de HA gripală. Într-un aspect al dezvoltării, un alt agent terapeutic este un anticorp sau fragment de legare a antigenului al

5 acestuia selectat din grupul care constă din H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N ; H1H11704P; H1H11711P; H1H11714P; H1H11717P; H1H11724P; H1H11727P; H1H11730P2; H1H11731P2; H1H11734P2; H1H11736P2; H1H11742P2; H1H11744P2; H1H11745P2; H1H11747P2; H1H11748P2;

10 H1H17952B; H1H17953B; H1H17954B; H1H17955B; H1H17956B; H1H17957B; H1H17958B; H1H17959B; H1H17960B; H1H17961B; H1H17962B; H1H17963B; H1H17964B; H1H17965B; H1H17966B; H1H17967B; H1H17968B; H1H17969B; H1H17970B; H1H17971B; H1H17972B; H1H17973B; H1H17974B; H1H17975B; H1H17976B; H1H17977B; H1H17978B; H1H17979B; H1H17980B; H1H17981B; H1H17982B; H1H17983B; H1H17984B; H1H17985B; H1H17986B;

15 H1H17987B; H1H17988B; H1H17989B; H1H17990B; H1H17991B; H1H17992B; H1H17993B; H1H17994B; H1H17995B; H1H17996B; H1H17997B; H1H17998B; H1H17999B; H1H18000B; H1H18001B; H1H18002B; H1H18003B; H1H18004B; H1H18005B; H1H18006B; H1H18007B; H1H18008B; H1H18009B; H1H18010B; H1H18011B; H1H18012B; H1H18013B; H1H18014B; H1H18015B; H1H18016B; H1H18017B; H1H18018B; H1H18019B; H1H18020B; H1H18021B;

20 H1H18022B; H1H18023B; H1H18024B; H1H18025B; H1H18026B; H1H18027B; H1H18028B; H1H18029B; H1H18030B; H1H18031B; H1H18032B; H1H18033B; H1H18034B; H1H18035B; H1H18037B; H1H18038B; H1H18039B; H1H18040B; H1H18041B; H1H18042B; H1H18043B; H1H18044B; H1H18045B; H1H18046B; H1H18047B; H1H18048B; H1H18049B; H1H18051B; H1H18052B; H1H18053B; H1H18054B; H1H18055B; H1H18056B; H1H18057B; H1H18058B;

25 H1H18059B; H1H18060B; H1H18061B; H1H18062B; H1H18063B; H1H18064B; H1H18065B; H1H18066B; H1H18067B; H1H18068B; H1H18069B; H1H18070B; H1H18071B; H1H18072B; H1H18073B; H1H18074B; H1H18075B; H1H18076B; H1H18077B; H1H18078B; H1H18079B; H1H18080B; H1H18081B; H1H18082B; H1H18083B; H1H18084B; H1H18085B; H1H18086B; H1H18087B; H1H18088B; H1H18089B; H1H18090B; H1H18091B; H1H18092B; H1H18093B;

30 H1H18094B; H1H18095B; H1H18096B; H1H18097B; H1H18098B; H1H18099B; H1H18100B; H1H18101B; H1H18102B; H1H18103B; H1H18104B; H1H18105B; H1H18107B; H1H18108B; H1H18109B; H1H18110B; H1H18111B; H1H18112B; H1H18113B; H1H18114B; H1H18115B; H1H18116B; H1H18117B; H1H18118B; H1H18119B; H1H18120B; H1H18121B; H1H18122B; H1H18123B; H1H18124B; H1H18125B; H1H18126B; H1H18127B; H1H18128B; H1H18129B;

35 H1H18130B; H1H18131B; H1H18132B; H1H18133B; H1H18134B; H1H18135B; H1H18136B; H1H18137B; H1H18138B; H1H18139B; H1H18140B; H1H18141B; H1H18142B; H1H18143B; H1H18144B; H1H18145B; H1H18146B; H1H18147B; H1H18148B; H1H18149B; H1H18150B; H1H18151B; H1H18152B; H1H18153B; H1H18154B; H1H18155B; H1H18156B; H1H18157B; H1H18158B; H1H18159B; H1H18160B; H1H18161B; H1H18162B; H1H18163B; H1H18164B;

40 H1H18165B; H1H18166B; H1H18167B; H1H18168B; H1H18169B; H1H18170B; H1H18171B; H1H18172B; H1H18173B; H1H18174B; H1H18175B; H1H18176B; H1H18177B; H1H18178B; H1H18179B; H1H18180B; H1H18181B; H1H18182B; H1H18183B; H1H18184B; H1H18185B; H1H18186B; H1H18187B; H1H18188B; H1H18189B; H1H18190B; H1H18191B; H1H18192B; H1H18193B; H1H18194B; H1H18195B; H1H18196B; H1H18197B; H1H18198B; H1H18199B;

45 H1H18200B; H1H18201B; H1H18202B; H1H18203B; H1H18204B; H1H18205B; H1H18206B; H1H18207B; H1H18208B; H1H18209B; H1H18210B; H1H18211B; H1H18212B; H1H18213B; H1H18214B; H1H18216B; H1H18217B; H1H18218B; H1H18219B; H1H18220B; H1H18221B; H1H18222B; H1H18223B; H1H18224B; H1H18225B; H1H18226B; H1H18227B; H1H18228B; H1H18229B; H1H18230B; H1H18231B; H1H18232B; H1H18233B; H1H18234B; H1H18235B;

50 H1H18236B; H1H18237B; H1H18238B; H1H18239B; H1H18240B; H1H18241B; H1H18242B; H1H18243B; H1H18244B; H1H18245B; H1H18246B; H1H18247B; H1H18248B; H1H18249B; H1H18250B; H1H18251B; H1H18252B; H1H18253B; H1H18254B; H1H18255B; H1H18256B; H1H18257B; H1H18258B; H1H18259B; H1H18261B; H1H18262B; H1H18263B; H1H18264B; H1H18265B; H1H18266B; H1H18267B; H1H18268B; H1H18269B; H1H18270B; H1H18271B;

55 H1H18272B; H1H18274B; H1H18275B; H1H18276B; H1H18277B; H1H18278B; H1H18279B; H1H18280B; H1H18281B; H1H18282B; H1H18283B; H1H18284B; H1H18285B; H1H18286B; H1H18287B; H1H18288B; H1H18289B; H1H18290B; H1H18291B; H1H18292B; H1H18293B; H1H18294B; H1H18295B; H1H18297B; H1H18298B; H1H18299B; H1H18300B; H1H18301B; H1H18302B; H1H18303B; H1H18304B; H1H18305B; H1H18306B; H1H18307B; H1H18308B;

60 H1H18309B; H1H18310B; H1H18311B; H1H18312B; H1H18313B; H1H18314B; H1H18315B; H1H18316B; H1H18317B; H1H18318B; H1H18319B; H1H18320B; H1H18321B; H1H18322B;

H1H18323B; H1H18324B; H1H18325B; H1H18326B; H1H18327B; H1H18328B; H1H18329B; H1H18330B; H1H18331B; H1H18332B; H1H18333B; H1H18334B; and H1H18335B.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, o metodă pentru administrarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, H1H7017N) prezentată aici în corpul unui subiect (*de ex.*, un om) care cuprinde injectarea parenterală a proteinei care leagă antigenul în corpul subiectului (*de ex.*, subcutanat, intravenos sau intramuscular).

SCURTĂ DESCRIERE A FIGURILOR

Figura 1 (A-B). Progresia virusului A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)-GFP răspândit în diferite linii celulare cu o multiplicitate inițială a infecției de 0,01 (A), sau 0,001 (B) în absența tripsinei exogene. Celulele Calu3 (cerc), A549 (pătrat), MDCK (triunghi) și celule HepG2 (triunghi inversat).

Figura 2. Aplicarea H1H7017N în timpul ciclului de infecție scade numărul de unități de focalizare fluorescente (FFU) din A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) la 72 de ore după infecție comparativ cu anticorpus de control izotip, fără anticorp, anticorp anti-HA și martori neinfecțati.

Figura 3 (A-B). Anti-TMPRSS2, H1H7017N, se leagă TMPRSS2 umană și de maimuță cynomolgous exprimată pe celule. (A) H1H7017N, legat la MDCK/Tet-on/hTMPRSS2 și MDCK/Tet-on/mfTMPRSS2 cu valori EC_{50} de 460 pM și respectiv 1,06 nM și nu au prezentat legături semnificative la celulele MDCK/Tet-on. (B) Control mAb1, un anticorp de control al izotipului irelevant, nu a prezentat legarea la niciuna dintre liniile celulare testate.

Figura 4. Curba de supraviețuire a unui șoarece proiectat pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 tratată cu 5 mg/kg de H1H7017N în ziua -1 PI (triunghi inversat, linie punctată), sau ziua 0 PI (cerc, linie continuă) care prezintă protecție împotriva H1N1 într-un model profilactic. Șoarecii tratați cu controlul izotipului H1H1238N (triunghi, linie continuă) nu au prezentat nicio protecție.

Figura 5. Curba de supraviețuire a unui șoarece proiectat pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 infectat cu H1N1, tratat cu 10 mg/kg H1H7017N demonstrând protecție. Șoarecii au fost tratați în ziua 0 (romb, linie punctată), ziua 1 (cerc, linie continuă), ziua 2 (triunghi inversat, linie continuă) sau ziua 3 PI (pătrat, linie punctată). Controlul izotipului H1H1238N (triunghi, linie continuă) a avut protecție parțială cu o rată de supraviețuire de 25%.

Figura 6. Curba de supraviețuire a șoarecilor hTMPRSS2 tratați cu 10 mg/kg de H1H7017N în ziua 1 PI (triunghi) sau în ziua 2 PI (cerc) care prezintă protecție împotriva H3N2. Șoarecii netratați (pătrate) nu au prezentat nicio protecție.

Figura 7 (A-B). Curba de supraviețuire a șoarecilor de tip sălbatic (A) sau a șoarecilor proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 (B) infectați cu 150 PFU (triunghi), 750 PFU (pătrat) sau 1.500 PFU (cerc) din A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1). Șoarecii au fost cântăriți zilnic până în ziua 14 PI.

Figura 8. Curba de supraviețuire a unui șoarece proiectat pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 infectat cu A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34 (H3N2) în ziua 0 și tratat cu o combinație de 2,5 mg/kg fiecare dintre H1H7017N și H1H14611N2 (romb), 10 mg/kg H1H7017N (triunghi), 10 mg/kg H1H14611N2 (pătrat), 5 mg/kg fiecare dintre H1H7017N și H1H14611N2, sau 10 mg/kg control izotip hlgG1 (cerc). Șoarecii au fost cântăriți zilnic până în ziua 14 PI.

Figura 9. Curba de supraviețuire a unui șoarece proiectat pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 infectat cu A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) în ziua 1 PI și tratat cu o combinație de 1 mg/kg de H1H7017N și 2 mg/kg de H1H11729P (cerc), 2,5 mg/kg fiecare dintre H1H7017N și H1H11729P (triunghi inversat), 5 mg/kg H1H11729P (romb), 5 mg/kg H1H7017N (pătrat) sau 5 mg/kg control izotip hlgG1 (triunghi). Șoarecii au fost cântăriți zilnic până în ziua 14 PI.

DESCRIEREA DETALIATĂ A INVENȚIEI

Înainte ca metodele prezente să fie descrise, trebuie să se înțeleagă că această invenție nu se limitează la metode particulare și la condițiile experimentale descrise, deoarece astfel de metode și condiții pot varia. De asemenea, trebuie să se înțeleagă că terminologia utilizată aici are ca scop descrierea unor variante de realizare particulare și nu este destinată a fi limitativă, deoarece scopul prezentei invenții va fi limitat doar de revendicările anexate.

Cu excepția cazului în care este definit altfel, toți termenii tehnici și științifici utilizați aici au aceeași semnificație pe care o înțelege în mod obișnuit un specialist în domeniu cărui îi aparține această invenție. Deși orice metode și materiale similare sau echivalente cu cele descrise aici pot fi utilizate în practica sau testarea prezentei invenții, metodele și materialele preferate sunt descrise acum.

Termenul “hemagglutinină gripală”, numită și “HA gripală” este o glicoproteină trimerică găsită pe suprafața virionilor gripali, care mediază atașamentul viral (prin legarea HA1 la acizii α -2,3- și α -2,6-sialici) și intrarea (prin schimbare conformațională) în celulele gazdă. HA este alcătuită din două domenii structurale: un domeniu de cap globular care conține situsul de legare a

receptorului (supus frecvenței ridicate de mutații antigenice) și regiunea stem (mai conservată printre diferite tulpini de virus gripal). HA gripală este sintetizată ca un precursor (HA0) care suferă procesări proteolitice pentru a produce două subunități (HA1 și HA2) care se asociază una cu cealaltă pentru a forma structura stem/cap globular. HA virală este cel mai variabil antigen al virusului, iar tulpina (HA2) este foarte conservată în cadrul fiecărui grup.

Termenul "neuraminidază gripală", numită și "NA gripală" este o exosialidază (EC 3.2.1.18) care scindează legătura α -cetoizidică între acidul sialic (N-acetilneuraminic) și un reziduu de zahăr adiacent.

Secvența de aminoacizi a HA gripală de lungime completă este exemplificată de secvența de aminoacizi a izolatului gripal H1N1 A/California/04/2009 furnizat în GenBank ca număr de acces FJ966082.1. Termenul "HA gripală" include, de asemenea, variante de proteine ale HA gripală izolate din diferite izolate gripale, de ex., GQ149237.1, NC_002017, KM972981.1, etc. Termenul "HA gripală" include, de asemenea, HA gripală recombinantă sau un fragment al acesteia. Termenul cuprinde, de asemenea, HA gripală sau un fragment al acesteia cuplat, de exemplu, cu etichetă histidină, Fc de șoarece sau uman, sau o secvență semnal.

Un anti-TMPRSS2 "proteină care leagă antigenul" este o polipeptidă sau un complex de mai multe polipeptide (de ex., un anticorp IgG tetrameric) care se leagă în mod specific la polipeptida TMPRSS2, de exemplu, un anticorp anti-TMPRSS2 sau un fragment de legare a antigenului, fie că este monospecific sau multispecific.

TMPRSS2

TMPRSS2 (serin protează transmembranară 2) este o proteină, localizată pe cromozomul uman 21, care aparține familiei serin proteazei (serin protează transmembranară de tip II (TTSPs)) care este importantă pentru infectivitatea virusului gripal. S-a demonstrat că TMPRSS2 mediază scindarea virusului gripal HA0 la HA1 și HA2.

Gena *TMPRSS2* umană codifică o proteină prevăzută cu 492 de aminoacizi care se ancorează pe membrana plasmatică. Proteina se transformă în forma sa matură prin scindare autocatalitic între Arg255 și Ile256. După scindare, proteazele mature sunt în mare parte legate de membrană, totuși o parte din ele poate fi eliberată în mediul extracelular.

Intr-un exemplu de realizare a invenției, TMPRSS2 umană (V160M) cuprinde secvența de aminoacizi:

```
MALNSGSPFAIGPYENHGYQENPYPAQPTVVPTVYEVHFAQYYPSPVPQYAPRVLTQASNPVCTQPKSPSGTVC
TSKTKKALCITITLGTFLVGAALAAGLLWKFMGSKCSNSGIECDSSGTCINPSNWCDGVSHCPGGEDENRCVRLYGP
NFILOMYSSQKRSWHPVCQDDWNENYGRAACRDMGYKNFYSSQGI VDDSGSTSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDAC
SSKAVVSLRCIACGVNLNSRQSRIVGGESALPGAWPWQVSLHVQNVHVC GGSIIITPEWIVTAAHCVEKPLNPNWHW
TAFAGILRQSFMEFYGAGYQVEKVI SHPNYDSKTKNNDIALMKLQKPLTFNDLVKPVCLPNPGMMLQPEQLCWI SGWG
ATEEKGKTSEVLNAAKVLLIETQRCNSRYVDNLITPAMICAGFLQGNVDS CQGD SGGLPVT SKNNIWWLIGDTSWG
SGCAKAYRPGVYGNVMVFTDWIYRQMRADG
```

(SECV ID NR. 22; metionină 160 cu caractere boldate). Într-un exemplu de realizare a invenției, polipeptida TMPRSS2 nu cuprinde mutația V160M. A se vedea, de asemenea, NM_005656.3.

Intr-un caz, TMPRSS2 *Macaca mulatta* (S129L, N251S, I415V, R431Q, D492G) cuprinde secvența de aminoacizi:

```
MALNSGSPPGVGPYENHGYQENPYPAQPTVAPNVYEVHFAQYYPSPVPQYTPRVLT HASNPVCRQPKSPSGTVC
TSKTKKALCVTMTLGAVLVGAALAAGLLWKFMGSKCSDSGIECDSSGTCISLSNWCDGVSHCPNGEDENRCVRLYGP
NFILOQVYSSQKRSWHPVCRDDWNENYARAACRDMGYKNSFYSSQGI VDN SGATSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDAC
SSKAVVSLRCIACGVRSNLSRQSRIVGGQNALLGAWPWQVSLHVQNIHVC GGSIIITPEWIVTAAHCVEKPLNSPWQW
TAFVGTLRQSSMEFYEGHRVEKVI SHPNYDSKTKNNDIALMKLHTPLTFNEVVKPVCLPNPGMMLPEQHCWISGWG
ATQEKGKTS DVLNAAMVPLIEPRRCNNKYVYDGLITPAMICAGFLQGTVDSCQGD SGGLPVT LKNDVWWLIGDTSWG
SGCAQANRPGVYGNVTVFTDWIYRQMRADG
```

(SECV ID NR. 23). Intr-un caz, polipeptida TMPRSS2 nu cuprinde mutația S129L, N251S, I415V, R431Q și/sau D492G.

Intr-un caz, mARN *TMPRSS2 Mus musculus* cuprinde secvența de nucleotide prezentată în NM_015775.2.

Virusuri

Prezenta dezvăluire include metode pentru tratarea sau prevenirea unei infecții virale la un subiect. Termenul "virus" include orice virus a cărui infecție în corpul unui subiect este tratabilă sau prevenită prin administrarea unui anticorp anti-TMPRSS2 sau a unui fragment de legare a antigenului al acestuia (de ex., în care infectivitatea virusului este cel puțin parțial dependentă de

TMPRSS2). Intr-un aspect al dezvoltării, un "virus" este orice virus care exprimă HA0 sau un alt substrat al TMPRSS2 a cărui scindare proteolitică este necesară pentru infectarea completă a virusului împotriva unei celule dintr-o gazdă. Termenul "virus" include, de asemenea, un virus respirator dependent de TMPRSS2, care este un virus care infectează țesutul respirator al unui subiect (de ex., tractul respirator superior și/sau inferior, traheea, bronhiile, plămâni) și este tratat sau prevenibil prin administrarea unui anti-TMPRSS2. De exemplu, într-un aspect al dezvoltării, virusul include virusul gripei, coronavirusul, virusul SARS-Co (coronavirusul sindromului respirator acut sever), virusul MERS-Co (sindromul respirator din Orientul Mijlociu (MERS) CoV), virusul parainfluenza, virusul sendai (SeV), metapneumovirusul uman și/sau virusul hepatitei C (VHC). "Infecție virală" se referă la invazia și multiplicarea unui virus în corpul unui subiect. Prezenta dezvoltare include aspecte cu condiția ca "virusul" să excludă virusul gripal, de ex., în care infecția virală exclude infecția cu virusul gripal.

Există acum două genuri de virus parainfluenza uman (HPIV), respirovirus (HPIV-1 și HPIV-3) și rubulavirus (HPIV-2 și HPIV-4). Ambele genuri (paramixovirusuri) pot fi separate morfologic de virusul gripal.

Virusul Sendai, cunoscut și sub denumirea de virusul parainfluenza de murină, este specia tip din genul respirovirus, care conține, de asemenea, specia virusul parainfluenza uman 3, virusul parainfluenza bovin 3 și virusul parainfluenza uman 1. TMPRSS2 este o protează activatoare pentru virusurile parainfluenza respiratorii cum ar fi, virusurile parainfluenza și virusul Sendai (SeV). Vezi ș.a. Abe ș.a., J. Virol. 87(21): 11930-11935 (2013).

Metapneumovirusul uman (HMPV) este clasificat ca primul membru uman al genului *Metapneumovirus* din subfamilia *Pneumovirinae* din cadrul familiei *Paramyxoviridae*. Acesta este un virus ARN monocatenar învelit cu sens negativ. Genomul ARN include 8 gene care codifică 9 proteine diferite. HMPV este identic în ordinea genelor cu pneumovirusul aviar (AMPV), care aparține, de asemenea, genului *Metapneumovirus*. TMPRSS2 este exprimat în epiteliul pulmonar uman, scindează eficient proteina HMPV F și susține multiplicarea HMPV și poate fi implicată în dezvoltarea bolilor tractului respirator inferior la pacienții infectați cu HMPV. Vezi ș.a. Shirogane ș.a. J Virol. 82(17): 8942-8946 (2008).

Virusul hepatitei C (HCV) este un virus ARN monocatenar mic, învelit, cu sens pozitiv, al familiei *Flaviviridae*. HVC, cu cel puțin 6 genotipuri și numeroase subtipuri, este membru al genului *hepacivirus*. TMPRSS2 poate activa infecția cu HVC în stadiul de post-legare și intrare. Esumi ș.a., Hepatology 61(2): 437-446 (2015).

Virusii gripali sunt membri ai familiei *Orthomyxoviridae*. Această familie reprezintă virusuri învelite, al căror genom are segmente de ARN monocatenare cu sens negativ segmentate. Există patru genuri din această familie: tipurile A, B, C și Thogotovirus. Clasele de virusuri gripale, A, B și C, se bazează pe proteine miez și sunt împărțite în continuare în subtipuri determinate de glicoproteinele învelitoare virale hemagglutinină (HA) și neuraminidază (NA) (de ex., subtipul A/H1N1). Există cel puțin 18 subtipuri de proteine hemagglutinină gripală ("HA") (H1-H18 sau HA1-HA18) și cel puțin 11 subtipuri proteice de neuraminidază gripală (NA) (N1-N11 sau NA1-NA11) utilizate pentru a defini subtipurile gripale. Grupa 1 gripală are subtipurile H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 și H18 și subtipurile NA8, NA5, NA4 și NA1. Grupa 2 are subtipurile H3, H4, H7, H10, H14 și H15 și subtipurile NA6, NA9, NA7, NA2 și NA3. Virusurile gripale A infectează o serie de specii de mamifere și aviare, în timp ce infecțiile de tip B și C sunt în mare parte limitate la oameni. Cele opt segmente ale genomului virusurilor gripale A și B sunt încapsidate slab de nucleoproteină.

Virionii coronavirus sunt sferici cu diametre de aproximativ 125 nm. Cea mai proeminentă caracteristică a coronavirusurilor este proiecțiile vârfurilor în formă de treflă care emană de la suprafața virionului. Aceste vârfuri sunt o caracteristică definitorie a virionului și le conferă aspectul unei coroane solare, determinând denumirea de coronavirusuri. În cadrul învelișului virionului se află nucleocapsida. Coronavirusurile au nucleocapside simetrice elicoidale, ceea ce este neobișnuit printre virusurile ARN cu sens pozitiv, dar mult mai frecvente pentru virusurile ARN cu sens negativ. Atât MERS-CoV (coronavirusul sindromului respirator din Orientul Mijlociu), cât și SARS-CoV (coronavirusul sindromului respirator acut sever) aparțin familiei coronavirusului. Atașarea inițială a virionului la celula gazdă este inițiată de interacțiunile dintre proteina S și receptorul acesteia. Siturile domeniilor de legare a receptorilor (RBD) din regiunea S1 ale unei proteine S de coronavirus variază în funcție de virus, unele având RBD la capătul C-terminal al S1. Interacțiunea S-proteină/receptor este principalul factor determinant pentru coronavirus pentru a infecta o specie gazdă și guvernează, de asemenea, tropismul tisular al virusului. Multe coronavirusuri utilizează peptidaze ca receptor celular. După legarea receptorilor, virusul trebuie să aibă acces la citozolul celulei gazdă. Acest lucru se realizează în general prin

scindarea proteolitică dependentă de acid a proteinei S de către catepsină, TMPRSS2 sau o altă protează, urmată de fuziunea membranelor virale și celulare.

Anticorpi anti-TMPRSS2 și fragmente care leagă antigenul

Prezența dezvăluire oferă proteine care leagă antigenul, cum ar fi, anticorpi și fragmente ale acestora care leagă antigenul, care se leagă în mod specific la proteina TMPRSS2 sau la un fragment antigenic al acesteia. Proteinele care leagă antigenul conform prezentei invenții sunt așa cum este prezentat în revendicări.

Termenul "anticorp", așa cum este utilizat aici, se referă la moleculele de imunoglobulină care cuprind patru lanțuri polipeptidice, două lanțuri grele (HCs) și două lanțuri ușoare (LCs) interconectate prin legături disulfidice (*adică.*, "molecule de anticorp complet"), precum și multimeri ai acestora (*de ex.*, IgM) -de exemplu, H1H7017N. Fiecare lanț greu cuprinde o regiune variabilă a lanțului greu ("HCVR" sau "V_H") (*de ex.*, SECV ID NR. 2) și o regiune constantă a lanțului greu (compusă din domeniile C_{H1}, C_{H2} și C_{H3}). Fiecare lanț ușor cuprinde o regiune variabilă a lanțului ușor ("LCVR sau" V_L") (*de ex.*, SECV ID NR. 4) și o regiune constantă a lanțului ușor (C_L). Regiunile V_H și V_L pot fi subdivizate în continuare în regiuni de hipervariabilitate, denumite regiuni care determină complementaritatea (CDR), intercalate cu regiuni care sunt mai conservate, denumite regiuni cadru (FR). Fiecare V_H și V_L cuprinde trei CDRs și patru FRs, aranjate de la amino-terminal la carboxi-terminal în următoarea ordine: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. În anumite exemple de realizare ale invenției, FRs ale anticorpului (sau fragmentului de legare a antigenului al acestuia) sunt identice cu secvențele liniei germinale umane sau sunt naturale sau modificate artificial.

De obicei, domeniile variabile ale lanțurilor grele și ușoare de imunoglobulină cuprind trei regiuni hipervariabile, numite și regiuni care determină complementaritatea (CDRs), situate în regiuni cadru relativ conservate (FR). În general, de la N-terminal la C-terminal, ambele domenii variabile ale lanțurilor ușoare și grele cuprind FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 și FR4. Atribuirea de aminoacizi fiecărui domeniu poate fi în conformitate cu definițiile din Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, ș.a.; National Institutes of Health, Bethesda, Md.; ed. a 5-a; NIH Publ. No. 91-3242 (1991); Kabat (1978) Adv. Prot. Chem. 32:1-75; Kabat, ș.a., (1977) J. Biol. Chem. 252:6609-6616; Chothia, ș.a., (1987) J Mol. Biol. 196:901-917, sau Chothia, ș.a., (1989) Nature 342:878-883.

Prezența dezvăluire include proteine monoclonale anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi și fragmente ale acestora care leagă antigenul, precum și compoziții monoclonale care cuprind o multitudine de proteine izolate care leagă antigenul monoclonal. Termenul "anticorp monoclonal", așa cum este utilizat aici, se referă la o populație de anticorpi substanțial omogeni, *adică.*, moleculele de anticorp care cuprind populația sunt identice în secvența de aminoacizi, cu excepția posibilelor mutații naturale care pot fi prezente în cantități mici. O "pluralitate" de astfel de anticorpi monoclonali și fragmente dintr-o compoziție se referă la o concentrație identică de anticorpi și fragmente (*adică.*, așa cum s-a discutat anterior, în secvența de aminoacizi, cu excepția mutațiilor posibile în mod natural care pot fi prezente în cantități minore) care este peste cea care ar apărea în mod normal în natură, *de ex.*, în sângele unui organism gazdă, cum ar fi, un șoarece sau un om.

Intr-un aspect al dezvăluirii, o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpul sau fragmentul care leagă antigenul cuprinde un domeniu constant al lanțului greu, *de ex.*, de tipul IgA (*de ex.*, IgA1 sau IgA2), IgD, IgE, IgG (*de ex.*, IgG1, IgG2, IgG3 și IgG4) sau IgM. Intr-un aspect al dezvăluirii, o proteină care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpul sau fragmentul care leagă antigenul cuprinde un domeniu constant al lanțului ușor, *de ex.*, de tip kappa sau lambda.

Termenul de proteină "umană" care leagă antigenul, cum ar fi, un anticorp, așa cum este utilizat aici, include anticorpi care au regiuni variabile și constante derivate din secvențe de imunoglobulină ale liniei germinale umane, fie într-o celulă umană, fie grefate într-o celulă non-umană, *de ex.*, o celulă de șoarece. Vezi *de ex.*, US8502018, US6596541 sau US5789215. mAbs umane pot include resturi de aminoacizi necodificate de secvențele imunoglobulinei liniei germinale umane (*de ex.*, mutații introduse prin mutageneză aleatorie sau specifică situsului *in vitro*, sau prin mutație somatică *in vivo*), de exemplu în CDRs și în special CDR3. Cu toate acestea, termenul "anticorp uman", așa cum este utilizat aici, nu este destinat să includă mAbs în care secvențe CDR derivate din linia germinativă a unei alte specii de mamifere (*de ex.*, șoarece) au fost grefate pe secvențe FR umane. Termenul include anticorpi produși recombinant într-un mamifer neuman sau în celule ale unui mamifer neuman. Termenul nu este destinat să includă anticorpi izolați sau generați la un subiect uman. Vezi mai jos.

Prezența dezvăluire include proteine himerice anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi și fragmente care leagă antigenul acestora și metode de utilizare a acestora. Așa cum este utilizat aici, un "anticorp himeric" este un anticorp care are domeniul variabil dintr-un prim

anticorp și domeniul constant dintr-un al doilea anticorp, în care primul și al doilea anticorp provin din specii diferite. (US4816567; și Morrison ș.a., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851-6855).

5 Termenul proteine de legare la antigen "recombinante", cum ar fi, anticorpi sau fragmente de legare a antigenului ale acestora, se referă la astfel de molecule create, exprimate, izolate sau obținute prin tehnologii sau metode cunoscute în domeniu ca tehnologia ADN recombinant care include, *de ex.*, imbinarea ADN și expresia transgenică. Termenul include anticorpi exprimați la un mamifer neuman (inclusiv mamifere transgenice neumane, *de ex.*, șoareci transgenici), sau la un sistem de expresie a celulei (*de ex.*, celule CHO), sau izolat dintr-o bibliotecă recombinantă
10 combinatorial de anticorpi umani.

Proteine recombinante anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpii și fragmentele care leagă antigenul, dezvăluite aici pot fi, de asemenea, produse într-un sistem de exprimare *E. coli*/T7. În acest aspect, acizii nucleici care codifică moleculele de imunoglobulină ale anticorpilor anti-TMPRSS2 (*de ex.*, H1H7017N) poate fi inserat într-o plasmidă pe bază de pET și exprimați în
15 sistemul *E. coli*/T7. De exemplu, prezenta dezvăluire include metode pentru exprimarea unui anticorp sau a unui fragment de legare a antigenului al acestuia, sau a unui lanț de imunoglobulină al acestuia într-o celulă gazdă (*de ex.*, celulă gazdă bacteriană, cum ar fi, *E. coli*, cum ar fi, BL21 sau BL21DE3) care cuprinde exprimarea polimerazei ARN T7 în celulă care include, de asemenea, o polinucleotidă care codifică un lanț de imunoglobulină care este legat în mod operațional de un promotor T7. De exemplu, într-un aspect al dezvăluirii, o celulă gazdă
20 bacteriană, cum ar fi, o *E. coli*, include o polinucleotidă care codifică gena polimerază ARN T7 legată operabil de un promotor lac și expresia polimerazei și lanțul este indus prin incubarea celulei gazdă cu IPTG (izopropil-beta-D-tiogalactopiranozidă). Vezi US4952496 și US5693489 sau Studier & Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level
25 expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 1986 5 Mai;189(1): 113-30.

Există mai multe metode prin care se produc anticorpi recombinanți care sunt cunoscuți în domeniu. Un exemplu de metodă pentru producerea recombinantă a anticorpilor este descris în US4816567.

Transformarea poate fi prin orice metodă cunoscută pentru introducerea polinucleotidelor într-o celulă gazdă. Metodele de introducere a polinucleotidelor heteroloage în celule de mamifere sunt bine cunoscute în domeniu și includ transfecția mediată de dextran, precipitarea fosfatului de calciu, transfecția mediată de polibren, fuziunea protoplastelor, electroporarea, încapsularea polinucleotidelor în lipozomi, injecție biolistică și microinjecția directă a ADN-ului în nucleu. În plus, moleculele de acid nucleic pot fi introduse în celulele mamiferelor prin vectori virali.
30 Metodele de transformare a celulelor sunt bine cunoscute în domeniu. Vezi, de exemplu, brevetele U.S. nr. 4.399.216; 4.912.040; 4.740.461 și 4.959.455.

Astfel, prezenta dezvăluire include metode recombinante pentru fabricarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, cum ar fi, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului al acestuia din prezenta invenție, sau un lanț de imunoglobulină al acestuia, care cuprinde (i) introducerea unuia sau mai multor polinucleotide (*de ex.*, incluzând secvența de nucleotide din oricare sau mai multe dintre SECV ID NR: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 sau 15) care codifică lanțuri ușoare și/sau grele de imunoglobulină ale proteinei care leagă antigenul, *de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N, de exemplu, în care polinucleotida este într-un vector; și/sau integrată într-un cromozom al celulei gazdă și/sau este legată operabil de un promotor; (ii) cultivarea celulei gazdă
40 (*de ex.*, CHO sau *Pichia* sau *Pichia pastoris*) în condiții favorabile exprimării polinucleotidei și, (iii) opțional, izolând proteina care leagă antigenul, (*de ex.*, anticorp sau fragment), sau lanțul din celula gazdă și/sau mediu în care este cultivată celula gazdă. Când se face o proteină care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment de legare la antigen) care cuprinde mai multe lanțuri de imunoglobulină, *de ex.*, un anticorp care cuprinde două lanțuri grele de imunoglobulină și două lanțuri ușoare de imunoglobulină, coexprimarea lanțurilor într-o singură celulă gazdă duce la asocierea lanțurilor, *de ex.*, în celulă sau pe suprafața celulei sau în afara celulei dacă astfel de lanțuri sunt secrete, astfel încât să formeze proteina care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment care leagă antigenul). Metodele le includ pe cele în care este exprimat numai un lanț greu de imunoglobulină sau doar un lanț ușor de imunoglobulină (*de ex.*, oricare dintre cele discutate
50 aici incluzând fragmente mature și/sau domenii variabile ale acestora). Astfel de lanțuri sunt utile, de exemplu, ca intermediari în expresia unui anticorp sau a unui fragment de legare la antigen care include un astfel de lanț. De exemplu, prezenta dezvăluire include, de asemenea, proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, cum ar fi, anticorpii și fragmentele care leagă antigenul ale acestora, care cuprind un lanț greu de imunoglobulină (sau domeniul variabil al acestuia sau care cuprinde CDRs ale acestuia) codificate de o polinucleotidă care cuprinde secvențele de nucleotide stabilite în SECV ID NR: 1 și un lanț ușor de imunoglobulină (sau domeniu variabil al acesteia sau
60

care cuprinde CDRs ale acesteia) codificat de secvența de nucleotide prevăzută în SECV ID NR: 3 care sunt produsul unor astfel de metode de producție și, opțional, metodele de purificare stabilite aici. De exemplu, într-un exemplu de realizare a invenției, produsul metodei este o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, care este un anticorp sau un fragment care conține un V_H care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 2 și un V_L care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 4; sau care conține un HC care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 17 sau 19 și un LC care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 18.

Celulele gazdă eucariote și procariote, inclusiv celule de mamifere, pot fi utilizate ca gazde pentru exprimarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul. Astfel de celule gazdă sunt bine cunoscute în domeniu și multe sunt disponibile din colecția American Type Culture Collection (ATCC). Aceste celule gazdă includ, *printre altele*, Celule ovariene de hamster chinezesc (CHO), NSO, celule SP2, celule HeLa, celule de rinichi de pui de hamster (BHK), celule de rinichi de maimuță (COS), celule de carcinom hepatocelular uman (*de ex.*, Hep G2), celule A549, celule 3T3, celule HEK-293 și un număr de alte linii celulare. Celulele gazdă ale mamiferelor includ celule umane, de șoareci, șobolani, câini, maimuțe, porci, capre, bovine, cal și hamster. Alte linii celulare care pot fi utilizate sunt liniile celulare ale insectelor (*de ex.*, *Spodoptera frugiperda* sau *Trichoplusia ni*), celule amfibiene, celule bacteriene, celule vegetale și celule fungice. Celulele fungice includ celule de drojdie și de ciuperci filamentoase, inclusiv, de exemplu, *Pichia pastoris*, *Pichia finlandica*, *Pichia trehalophila*, *Pichia koclamae*, *Pichia membranaefaciens*, *Pichia minuta* (*Ogataea minuta*, *Pichia iindneri*), *Pichia opuntiae*, *Pichia thermotolerans*, *Pichia salictaria*, *Pichia guercuum*, *Pichia pijperi*, *Pichia stiptis*, *Pichia methanolica*, *Pichia sp.*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces sp.*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces sp.*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida albicans*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Trichoderma reesei*, *Chrysosporium lucknowense*, *Fusarium sp.*, *Fusarium gramineum*, *Fusarium venenatum*, *Physcomitrella patens* și *Neurospora crassa*. Prezenta dezvăluire include o celulă gazdă izolată (*de ex.*, o celulă CHO) care cuprinde o proteină care leagă antigenul, cum ar fi, H1H7017N; sau o polinucleotidă care codifică o astfel de polipeptidă a acesteia.

Termenul "se leagă în mod specific" se referă la acele proteine care leagă antigenul (*de ex.*, mAbs) care au o afinitate de legare la un antigen, cum ar fi, proteina TMPRSS2 (*de ex.*, TMPRSS2 umană), exprimată ca K_D , de cel puțin aproximativ 10^{-8} M (*de ex.*, $2,81 \times 10^{-9}$ M; $9,31 \times 10^{-9}$ M; 10^{-9} M; 10^{-10} M, 10^{-11} M sau 10^{-12} M), măsurată prin analiză de interferometrie cu bio-strat fără etichetă, în timp real, de exemplu, la 25°C sau 37°C, de exemplu, un biosenzor Octet® HTX sau prin rezonanță plasmonică de suprafață, de exemplu, BIACORE™ sau prin soluție-afinitate ELISA. Prezenta dezvăluire include proteine care leagă antigenul care se leagă în mod specific de proteina TMPRSS2.

Termenii "porțiuni de legare a antigenului" sau "fragment de legare la antigen" al unui anticorp sau proteină de legare a antigenului și alții asemănători, așa cum se utilizează aici, includ orice polipeptidă sau glicoproteină care apare în mod natural, care se obține enzimatic, sintetic sau modificată genetic care leagă specific un antigen pentru a forma un complex. Exemplele nelimitative de fragmente care leagă antigenul includ: (i) fragmente Fab; (ii) fragmente $F(ab')_2$; (iii) fragmente Fd; (iv) fragmente Fv; (v) molecule Fv (scFv) cu un singur lanț; (vi) fragmente dAb; și (vii) unități minime de recunoaștere care constau din resturi de aminoacizi care imită regiunea hipervariabilă a unui anticorp (*de ex.*, o regiune de determinare a complementarității izolată (CDR), cum ar fi, o peptidă CDR3), sau o peptidă FR3-CDR3-FR4 constrânsă. Alte molecule proiectate, cum ar fi, anticorpi specifici domeniului, anticorpi cu un singur domeniu, anticorpi cu domeniu șters, anticorpi himerici, anticorpi grefați CDR, diacorpi, triacorpi, tetracorpi, minicorpi, nanocorpi (*de ex.*, așa cum este definit în WO08/020079 sau WO09/138519) (*de ex.*, nanocorpi monovalenți, nanocorpi bivalenți, *etc.*), imunofarmaceutice modulare mici (SMIPs) și domeniile variabile de rechin IgNAR, sunt, de asemenea, cuprinse în expresia "fragment de legare la antigen", așa cum este utilizat aici.

Un fragment care leagă antigenul al unui anticorp va cuprinde, într-un aspect al dezvăluirii, cel puțin un domeniu variabil. Domeniul variabil poate fi de orice dimensiune sau compoziție de aminoacizi și va cuprinde în general cel puțin un CDR, care este adiacent sau în cadru cu una sau mai multe secvențe cadru. În fragmentele care leagă antigenul care au un domeniu V_H asociat cu un domeniu V_L , domeniile V_H și V_L pot fi situate unul în raport cu celălalt în orice aranjament adecvat. De exemplu, regiunea variabilă poate fi dimerică și conține dimerii $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ sau $V_L - V_L$. Alternativ, fragmentul care leagă antigenul al unui anticorp poate conține un domeniu V_H sau V_L monomeric.

În anumite aspecte, un fragment care leagă antigenul unui anticorp poate conține cel puțin un domeniu variabil legat covalent de cel puțin un domeniu constant. Configurațiile exemplificative nelimitative ale domeniilor variabile și constante care pot fi găsite într-un fragment care leagă antigenul includ: (i) V_H-C_H1; (ii) V_H-C_H2; (iii) V_H-C_H3; (iv) V_H-C_H1-CH₂; (v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3; (vi) V_H-C_H2-C_H3; (vii) V_H-C_L; (viii) V_L-C_H1; (ix) V_L-C_H2; (x) V_L-C_H3; (xi) V_L-C_H1-CH₂; (xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3; (xiii) V_L-C_H2-C_H3; și (xiv) V_L-C_L. În orice configurație de domenii variabile și constante, incluzând oricare dintre configurațiile exemplificative enumerate anterior, domeniile variabile și constante pot fi fie direct legate între ele, fie pot fi legate printr-o balama completă sau parțială, sau o regiune linker. O regiune balama poate consta din cel puțin 2 aminoacizi (*de ex.*, 5, 10, 15, 20, 40, 60 sau mai mulți), care au ca rezultat o legătură flexibilă, sau semiflexibilă între domeniile adiacente variabile și/sau constante într-o singură moleculă de polipeptidă. Mai mult, un fragment care leagă antigenul unui anticorp poate cuprinde un homo-dimer sau hetero-dimer (sau alt multimer) din oricare dintre configurațiile domeniului variabil și constant enumerate anterior în asociere non-covalentă unul cu altul și/sau cu unul sau mai multe domenii V_H sau V_L monomerice (*de ex.*, prin legătură (legături) disulfură).

Proteinele care leagă antigenul (*de ex.*, anticorpi și fragmente care leagă antigenul) pot fi mono-specifice sau multi-specifice (*de ex.*, bi-specific). Proteinele multispecifice care leagă antigenul sunt discutate în continuare aici.

În exemplele de realizare specifice, anticorpul sau fragmentele de anticorpi conform invenției pot fi conjugate cu un fragment, cum ar fi, un ligand sau un fragment terapeutic ("imunconjugat"), cum ar fi, un medicament antiviral, un al doilea anticorp antigripal, sau orice alt fragment terapeutic util pentru tratarea unei infecții virale, *de ex.*, infecție virală gripală. Vezi mai jos.

Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, un complex care cuprinde o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment care leagă antigenul, discutată aici complexată cu polipeptida TMPRSS2, sau un fragment antigenic al acestuia și/sau cu un anticorp secundar sau un fragment care leagă antigenul al acestuia (*de ex.*, anticorp secundar marcat detectabil) care se leagă în mod specific la anticorpul sau fragmentul anti-TMPRSS2. Într-un aspect al dezvăluirii, anticorpul sau fragmentul este *in vitro* (*de ex.*, este imobilizat la un substrat solid) sau se află în corpul unui subiect. Într-un aspect al dezvăluirii, TMPRSS2 este *in vitro* (*de ex.*, este imobilizat la un substrat solid), sau se află la suprafața unei celule, sau se află în corpul unui subiect. Anticorpi anti-TMPRSS2 imobilizați și fragmentele acestora care leagă antigenul, care sunt legate covalent de un material matricial insolubil (*de ex.*, sticlă sau polizaharidă, cum ar fi, agaroză sau separoză, *de ex.*, o granulă sau altă particulă a acesteia) fac, de asemenea, parte din prezenta dezvăluire; opțional, în care anticorpul imobilizat este complexat cu TMPRSS2 sau un fragment antigenic al acesteia sau un anticorp secundar sau fragment al acestuia. Complexele prezentei invenții sunt cele prezentate în revendicări.

Proteinele "izolate" care leagă antigenul, anticorpii sau fragmentele acestora care leagă antigenul, polipeptidele, polinucleotidele și vectorii, sunt cel puțin parțial fără alte molecule biologice din celulele sau cultura celulară din care sunt produse. Astfel de molecule biologice includ acizi nucleici, proteine, alți anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, lipide, carbohidrați sau alte materiale precum resturi celulare și mediu de creștere. Un anticorp izolat sau un fragment de legare la antigen poate fi cel puțin parțial fără componente ale sistemului de expresie, cum ar fi, molecule biologice dintr-o celulă gazdă sau ale mediului de creștere al acesteia. În general, termenul "izolat" nu se intenționează să se refere la absența completă a unor astfel de molecule biologice sau la absența apei, tampoanelor sau sărurilor, sau la componentele unei formulări farmaceutice care include anticorpii sau fragmentele.

Termenul "epitop" se referă la un determinant antigenic (*de ex.*, pe polipeptida TMPRSS2) care interacționează cu un situs specific de legare a antigenului al unei proteine care leagă antigenul, *de ex.*, o regiune variabilă a unei molecule de anticorp, cunoscută sub numele de paratop. Un singur antigen poate avea mai mult de un epitop. Astfel, diferiți anticorpi se pot lega de diferite zone ale unui antigen și pot avea efecte biologice diferite. Termenul "epitop" se referă, de asemenea, la un situs pe un antigen la care răspund celulele B și/sau T. De asemenea, se referă la o regiune a unui antigen care este legată de un anticorp. Epitopii pot fi definiți ca structurali sau funcționali. Epitopii funcționali sunt în general un subset al epitopilor structurali și au acele reziduuri care contribuie direct la afinitatea interacțiunii. Epitopii pot fi lineari sau conformaționali, adică compuși din aminoacizi neliniari. În anumite exemple de realizare, epitopii pot include determinanți care sunt grupări chimice active de suprafață ale moleculelor precum aminoacizi, lanțuri laterale de zahăr, grupări fosforil sau grupări sulfonil și, în anumite exemple de realizare, pot avea caracteristici structurale tridimensionale specifice și/sau caracteristici specifice de încărcare.

Metodele pentru determinarea epitopului unei proteine care leagă antigenul, de ex., anticorp, sau fragment, sau polipeptidă, includ analiza mutațională de scanare a alaninei, analiza blotului peptidic (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), analiza clivajului peptidic, studii cristalografice și analiză RMN. În plus, pot fi utilizate metode precum excizia epitopului, extracția epitopului și modificarea chimică a antigenelor (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). O altă metodă care poate fi utilizată pentru a identifica aminoacizii dintr-o polipeptidă cu care o proteină care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment sau polipeptidă) (*de ex.*, coversin) interacționează este un schimb de hidrogen/deuteriu detectat prin spectrometrie de masă. În termeni generali, metoda de schimb hidrogen/deuteriu implică etichetarea deuteriului cu proteina de interes, urmată de legarea proteinei care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment sau polipeptidă, la proteina marcată cu deuteriu. Apoi, complexul proteină TMPRSS2/proteine care leagă antigenul este transferat în apă și protonii schimbabili în aminoacizi care sunt protejați de complexul de anticorpi sunt supuși schimbului de deuteriu-hidrogen la o rată mai mică decât protonii schimbabili din aminoacizi care nu sunt parte a interfeței. Ca rezultat, aminoacizii care fac parte din interfața proteină/proteină care leagă antigenul pot reține deuteriul și, prin urmare, prezintă o masă relativ mai mare comparativ cu aminoacizii care nu sunt incluși în interfață. După disocierea proteinei care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp, sau fragment, sau polipeptidă), proteina țintă este supusă analizei de scindare a proteazei și spectrometriei de masă, dezvăluind astfel reziduurile marcate cu deuteriu care corespund aminoacizilor specifici cu care interacționează proteina care leagă antigenul. Vezi, *de ex.*, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen și Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

Termenul "concurează", așa cum este utilizat aici, se referă la o proteină care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment de legare a antigenului acestuia) care se leagă de un antigen (*de ex.*, TMPRSS2) și inhibă sau blochează legarea unei alte proteine care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment de legare a antigenului acestuia) la antigen. Termenul include, de asemenea, competiția între două proteine care leagă antigenul *de ex.*, anticorpi, în ambele orientări, *adică.*, un prim anticorp care leagă și blochează legarea celui de-al doilea anticorp și *viceversa*. În anumite aspecte, prima proteină care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp) și a doua proteină care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp) se poate lega de același epitop. Alternativ, prima și a doua proteină care leagă antigenul (*de ex.*, anticorpi) se pot lega de epitopi diferiți, dar, de exemplu, suprapuși, în care legarea unuia inhibă sau blochează legarea celui de-al doilea anticorp, *de ex.*, prin împiedicare sterică. Concurența între proteinele care leagă antigenul (*de ex.*, anticorpi) se poate măsura prin metode cunoscute în domeniu, de exemplu, printr-un test de interferometrie cu strat bio, fără etichetă, în timp real. Concurență între o primă și a doua proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp) poate fi determinat prin măsurarea capacității unei prime proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul imobilizat (*de ex.*, anticorp) (care nu este complexat inițial cu proteina TMPRSS2) pentru a se lega de proteina TMPRSS2 solubilă complexată cu a doua proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp). O reducere a capacității primei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp) de a se lega de proteina TMPRSS2 complexată, raportată la proteina TMPRSS2 necomplexată, indică faptul că prima și a doua proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorpi) concurează. Gradul de concurență poate fi exprimat ca procent din reducerea legăturii. O astfel de competiție poate fi măsurat utilizând un test de interferometrie cu strat bio, fără etichetă, în timp real, *de ex.*, pe un biosenzor Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.), ELISA (teste imunosorbente legate de enzime), sau SPR (rezonanță plasmonică de suprafață).

Concurența de legare între proteinele anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorpii monoclonali (mAbs)) se poate determina utilizând un test de interferometrie cu strat bio, fără etichetă, în timp real, pe un biosenzor Octet RED384 (Pall ForteBio Corp.). De exemplu, pentru a determina concurența dintre doi anticorpi monoclonali anti-TMPRSS2 umani, anti-TMPRSS2 mAb poate fi capturat mai întâi pe varfurile biosenzorului Octet acoperit cu anticorp anti-hFc (Pall ForteBio Corp., # 18-5060) prin scufundarea varfurilor într-un soluție de mAb TMPRSS2 anti-uman (denumită ulterior "mAb1"). Ca un control pozitiv pentru blocare, anticorpii capturați de varfurile biosenzorilor pot fi apoi saturate cu un mAb de control al izotopului de blocare cunoscut (denumit ulterior "mAb de blocare") prin scufundare într-o soluție de mAb de blocare. Pentru a determina dacă mAb2 concurează cu mAb1, vârfurile biosenzorilor pot fi ulterior scufundate într-o soluție co-complexată de polipeptidă TMPRSS2 umană și o a doua mAb anti-umană TMPRSS2 (denumită ulterior "mAb2"), care fusese pre-incubată pentru o perioadă de timp și se poate determina legarea mAb1 la polipeptida TMPRSS2. Vârfurile biosenzorului pot fi spălate în tampon între fiecare etapă a experimentului. Răspunsul de legare în timp real poate fi monitorizat în timpul experimentului și răspunsul de legare la sfârșitul fiecărei etape poate fi înregistrat.

De exemplu, testul de competiție poate fi efectuat la 25°C și pH aproximativ 7, *de ex.*, 7,4, *de ex.*, în prezența tamponului, sării, surfactantului și a unei proteine nespecifice (*de ex.*, albumina serică bovină).

De obicei, un anticorp sau fragment de legare la antigen al dezvoltării care este modificat
5 într-un fel păstrează capacitatea de a se lega în mod specific de TMPRSS2, *de ex.*, păstrează cel puțin 10% din activitatea sa de legare TMPRSS2 (în comparație cu anticorpul parental) atunci când acea activitate este exprimat pe o bază molară. De preferință, un anticorp sau fragment de legare la antigen din dezvoltare reține cel puțin 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% sau 100% sau mai mult din afinitatea de legare a TMPRSS2 ca anticorp parental. De asemenea, se intenționează
10 ca un anticorp sau un fragment care leagă antigenul al dezvoltării să includă substituții de aminoacizi conservatori sau neconservatori (denumiți "variante conservatoare" sau "variante conservate funcțional" ale anticorpului) care nu își modifică substanțial activitatea biologică.

O "variantă" a unei polipeptide, cum ar fi, un lanț de imunoglobulină (*de ex.*, H1H7017N V_H, V_L, HC sau LC), se referă la o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi care este de
15 cel puțin aproximativ 70-99,9% (*de ex.*, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) identică sau similară cu o secvență de aminoacizi de referință care este prezentată aici (*de ex.*, SECV ID NR. 2, 4, 17, 18 sau 19); atunci când comparația este realizată de un algoritm BLAST în care parametrii algoritmului sunt selectați pentru a da cea mai mare potrivire între secvențele respective pe întreaga lungime a secvențelor de referință respective (*de ex.*, pragul așteptat: 10; dimensiunea cuvântului: 3; potriviri maxime într-un interval de interogare: 0; matrice BLOSUM 62; costuri gap: existența 11, extensia 1; ajustarea matricială a scorului compozițional condiționat).

O "variantă" a unei polinucleotide se referă la o polinucleotidă care cuprinde o secvență de nucleotide care este de cel puțin aproximativ 70-99,9% (*de ex.*, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82,
25 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) identică cu o secvență de nucleotide de referință care este prezentată aici (*de ex.*, SECV ID NR. 1 sau 3); atunci când comparația este realizată de un algoritm BLAST în care parametrii algoritmului sunt selectați pentru a da cea mai mare potrivire între secvențele respective pe întreaga lungime a secvențelor de referință respective (*de ex.*, pragul așteptat: 10; dimensiunea cuvântului: 28; potriviri maxime într-un interval de interogare: 0; scoruri potrivire/nepotrivire: 1, -2; costurile decalajului: liniar).

Proteinele anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpii și fragmentele acestora care leagă antigenul conform prezentei invenții, pot include o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care are cel puțin 70% (*de ex.*, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) identitate cu secvența de aminoacizi cu aminoacizii stabiliți în SECV ID NR: 2, 17 sau 19; și/sau o regiune variabilă a
35 lanțului ușor de imunoglobulină care are cel puțin 70% (*de ex.*, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) identitate cu secvența de aminoacizi cu aminoacizii stabiliți în SECV ID NR: 4 sau 18.

În plus, o variantă de proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul poate include o polipeptidă care cuprinde o secvență de aminoacizi care este prezentată aici, cu excepția uneia sau mai multor (*de ex.*, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10) mutații, cum ar fi, de exemplu, mutații cu sens greșit (*de ex.*, substituții conservatoare), mutații non-sens, ștergeri sau inserții. De exemplu, prezenta dezvoltare include proteine care leagă antigenul care includ o variantă de lanț ușor de imunoglobulină care cuprind secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 4 sau 18 dar având una sau mai multe dintre aceste mutații și/sau o variantă de lanț greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 2, 17 sau 19 dar având una sau mai multe dintre astfel de mutații. Într-un aspect al dezvoltării, o variantă de proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul include o variantă de lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 în care unul sau mai multe (*de ex.*, 1 sau 2 sau 3) din astfel de CDRs are una sau mai multe dintre aceste mutații (*de ex.*, substituții conservatoare) și/sau o variantă cu lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 în care unul sau mai multe (*de ex.*, 1 sau 2 sau 3) din astfel de CDRs are una sau mai multe dintre aceste mutații (*de ex.*, substituții conservatoare).
50

Dezvoltarea oferă în plus variante de proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi sau fragmente ale acestora care leagă antigenul, care cuprind una sau mai multe variante CDRs (*de ex.*, oricare sau mai multe dintre CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și/sau
55 CDR-H3) care sunt prezentate aici cu cel puțin 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% sau 99,9% identitate de secvență sau similaritate cu, de exemplu, SECV ID NR: 12, 14, 16, 6, 8 și/sau 10.

Aspectele prezentei dezvoltări includ, de asemenea, variante de proteine care leagă antigenul, de exemplu, anticorpi anti-TMPRSS2 și fragmente ale acestora care leagă antigenul, care cuprind V_HS și V_LS; sau HC și LC de imunoglobulină, care cuprind o secvență de aminoacizi având 70% sau mai mult (*de ex.*, 80%, 85%, 90%, 95%, 97% sau 99%) identitate generală a
60

secvenței de aminoacizi sau similaritate cu secvențele de aminoacizi ale V_{HS}, V_{LS}, HCs sau LCs corespunzătoare specificate aici, dar în care CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 ale acestor imunoglobuline nu sunt variante și cuprind secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 12, 14, 16, 6, 8 și respectiv 10. Astfel, în astfel de aspecte, CDRs din variantele de proteine care leagă antigenul nu sunt, ele însele, variante.

Variantele modificate conservator de anticorpi anti-TMPRSS2 și fragmentele acestora care leagă antigenul sunt de asemenea descrise aici. O "variantă modificată conservator" sau o "substituție conservatoare" se referă la o variantă în care există una sau mai multe substituții de aminoacizi într-o polipeptidă cu alți aminoacizi având caracteristici similare (*de ex.*, sarcină, dimensiunea lanțului lateral, hidrofobicitate/hidrofilitate, conformație și rigiditate a catenei principale, etc.). Astfel de modificări pot fi făcute frecvent fără a perturba în mod semnificativ activitatea biologică a anticorpului sau a fragmentului. Specialiștii în acest domeniu recunosc că, în general, substituțiile de aminoacizi unici în regiunile neesențiale ale unei polipeptide nu modifică în mod substanțial activitatea biologică (vezi, *de ex.*, Watson ș.a. (1987) Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (Ed. a 4-a.)). În plus, substituțiile aminoacizilor similari din punct de vedere structural sau funcțional sunt mai puțin susceptibile să perturbe semnificativ activitatea biologică.

Exemplele de grupuri de aminoacizi care au lanțuri laterale cu proprietăți chimice similare includ 1) lanțuri laterale alifactice: glicină, alanină, valină, leucină și izoleucină; 2) lanțuri laterale alifactice-hidroxil: serină și treonină; 3) lanțuri laterale care conțin amide: asparagină și glutamină; 4) lanțuri laterale aromatice: fenilalanină, tirozină și triptofan; 5) lanțuri laterale bazice: lizină, arginină și histidină; 6) lanțuri laterale acide: aspartat și glutamat și 7) lanțuri laterale care conțin sulf: cisteină și metionină. Grupurile preferate de substituție a aminoacizilor conservatori sunt: valină-leucină-izoleucină, fenilalanină-tirozină, lizină-arginină, alanină-valină, glutamat-aspartat și asparagină-glutamină. Alternativ, o înlocuire conservatoare este orice modificare care are o valoare pozitivă în matricea de probabilitate log PAM250 prezentată în Gonnet ș.a. (1992) Science 256: 1443 45.

Variantele conservatoare funcțional ale anticorpilor anti-TMPRSS2 și fragmentele acestora care leagă antigenul sunt, de asemenea, descrise aici. Oricare dintre variantele anticorpilor anti-TMPRSS2 și ale fragmentelor care leagă antigenul acestora (așa cum s-a discutat aici) pot fi "variante conservatoare funcțional". Astfel de variante conservatoare funcțional pot fi, în unele cazuri, caracterizate și ca variante conservative modificate. "Variante conservatoare funcțional", așa cum este utilizat aici, se referă la variante ale anticorpilor anti-TMPRSS2 sau ale fragmentelor acestora care leagă antigenul în care unul sau mai multe resturi de aminoacizi au fost modificate fără a modifica semnificativ una sau mai multe proprietăți funcționale ale anticorpului sau fragmentului. De exemplu, o variantă conservatoare funcțional a anticorp anti-TMPRSS2 sau un fragment de legare a antigenului al acestuia poate cuprinde o secvență variantă de aminoacizi și prezintă una sau mai multe dintre următoarele proprietăți funcționale:

- Inhibă creșterea virusului gripal (*de ex.*, A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)) în celulele care exprimă TMPRSS2 (*de ex.*, celule Calu-3);
- Se leagă de suprafața celulelor care exprimă TMPRSS (*de ex.*, MDCK/Tet-on), *de ex.*, cu o valoare EC₅₀ de 440 pM sau 1,06 nM;
- Nu se leagă semnificativ de celulele MDCK/Tet-on care nu exprimă TMPRSS2;
- Se leagă de TMPRSS2 umană cu o K_D de aproximativ 2,81 X 10⁻⁹ M la aproximativ 25°C;
- Se leagă de TMPRSS2 umană cu o K_D de aproximativ 9,31 X 10⁻⁹ M la aproximativ 37°C;
- Se leagă de TMPRSS2 cynomolgous cu o K_D de aproximativ 5,60 X 10⁻⁸ M la aproximativ 25°C;
- Se leagă de TMPRSS2 cynomolgous cu o K_D de aproximativ 1,40 X 10⁻⁷ M la aproximativ 37°C;
- Limitează răspândirea infecției cu virusul gripal (*de ex.*, prin virusul gripal H1_{PR34}; H1_{CA09}; H1_{Bris}; H9N2 sau H3N2) al celulelor, *de ex.*, Calu-3, *in vitro*; și/sau
- Protejează un șoarece proiectat pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 de moartea cauzată de infecția cu virusul gripal, *de ex.*, H1N1 sau H3N2, de exemplu, în care șoarecii sunt infectați cu o doză altfel letală de virus, opțional când s-au combinat cu un anticorp anti-HA.

Prezența dezvăluire include un șoarece proiectat pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană care include, în corpul șoarecelui, o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment care leagă antigenul), cum ar fi, H1H7017N și H4H7017N. A se vedea publicația cererii internaționale de brevet nr. WO2017/151453.

O proteină "neutralizantă" sau "antagonistă" anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment care leagă antigenul, se referă la o moleculă care inhibă o activitate a TMPRSS2 în orice grad detectabil, *de ex.*, inhibă activitatea de protează a TMPRSS2, de exemplu, a unui substrat precum HA; Cbz-Gly-Gly-Arg-AMC (Sigma), unde Cbz este benziloxycarbonil și AMC este 7-amino-4-metilcumarină; virus gripal HA0; proteina coronavirus S; sau precursorul TMPRSS2 care este scindat autocatalitic între Arg255 și Ile256 și/sau inhibă intrarea virusului gripal într-o celulă și/sau inhibă reproducerea virusului gripal în corpul unui subiect.

"H1H7017N" și "H4H7017N" se referă la proteinele care leagă antigenul, cum ar fi, anticorpii și fragmentele acestora care leagă antigenul, care cuprind lanțul greu sau V_H (sau o variantă a acestuia) și lanțul ușor sau V_L (sau o variantă a acestuia) așa cum este prezentat mai jos; sau care cuprind un V_H care cuprinde CDRs ale acestuia (CDR-H1 (sau o variantă a acestuia), CDR-H2 (sau o variantă a acestuia) și CDR-H3 (sau o variantă a acestuia)) și un V_L care cuprinde CDRs ale acestora (CDR-L1 (sau o variantă a acestuia), CDR-L2 (sau o variantă a acestuia) și CDR-L3 (sau o variantă a acestuia)), *de ex.*, în care lanțurile de imunoglobulină, regiunile variabile și/sau CDRs cuprind secvențele specifice de aminoacizi descrise mai jos.

"H1H7017N" sau "H4H7017N" se poate referi opțional la un anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 ale unui lanț greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR. 2, 17 sau 19 și CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 ale unui lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 4 sau 18.

"H1H7017N" sau "H4H7017N" se poate referi, opțional, la un anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia care cuprinde un V_H care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 2; și un V_L care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 4.

"H1H7017N" se poate referi, opțional, la un anticorp sau fragment de legare la antigen care cuprinde un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 17; și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 18.

"H4H7017N" se poate referi, opțional, la un anticorp sau fragment de legare la antigen care cuprinde un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 19; și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 18. Termenul "H4H7017N" include, de asemenea, exemple de realizare în care V_H este fuzionat cu o IgG4 de tip sălbatic, *de ex.*, în care rezidulul 108 este S.

Anticorp anti-TMPRSS2 sau fragment de legare la antigen H1H7017N și H4H7017N H1H7017N și regiunea variabilă a lanțului greu H4H7017N (ADN)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGG
ATTCACCTTCAGTTCCTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGTCTCCAGGCAAGGGGCTCGAGTGGGTGGCAGTTATAT
GGAATGATGGAAGTTAIGTATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATTTCCAAGAAC
ACGCTGTTTCTGCAAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGGGAGTGGGT
ACTTTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

(SECV ID NR: 1)

H1H7017N și regiunea variabilă a lanțului greu H4H7017N (polipeptidă)

QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVIWNDSYVYADSVKGRFTISRDISKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGEWVLYYFDYWGQGLTVTVSS

(SECV ID NR: 2)

H1H7017N și regiunea variabilă a lanțului ușor H4H7017N (ADN)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTTGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCCAG
TCAGAGTATTAGTAGCTGGTTGGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAACTCCTGATCTATAAGGCGT
CTACTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGC
CTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTGACACTTTTGGCCAGGGGACCAA
GCTGGAGATCAAA

(SECV ID NR: 3)

H1H7017N și regiunea variabilă a lanțului ușor H4H7017N (polipeptidă)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSSISSWLAQYQQKPGKAPKLLIYKASTLESQVPSRFSQSGSGTEFTLTSS
LQPDDEFATYYCQQYNSYSYTFGQGTKLEIK

(SECV ID NR: 4)

H1H7017N și H4H7017N CDR-H1 (ADN)

GGA TTC ACC TTC AGT TCC TAT GGC

(SECV ID NR: 5)

5 **H1H7017N și H4H7017N CDR-H1 (polipeptidă)**

G F T F S S Y G

(SECV ID NR. 6 (sau o variantă a acestuia care are 1, 2, 3 sau 4 mutații punctuale și/sau deleții punctuale))

H1H7017N și H4H7017N CDR-H2 (ADN)

10 ATA TGG AAT GAT GGA AGT TAT GTA

(ID SECV NR. 7)

H1H7017N și H4H7017N CDR-H2 (polipeptidă)

I W N D G S Y V

15 (SECV ID NR. 8 (sau o variantă a acestuia care are 1, 2, 3 sau 4 mutații punctuale și/sau deleții punctuale))

H1H7017N și H4H7017N CDR-H3 (ADN)

GCG AGA GAG GGG GAG TGG GTA CTT TAC TAC TTT GAC TAC

(ID SECV NR. 9)

H1H7017N și H4H7017N CDR-H3 (polipeptidă)

20 A R E G E W V L Y Y F D Y

(SECV ID NR: 10 (sau o variantă a acestuia care are 1, 2, 3 sau 4 mutații punctuale și/sau deleții punctuale))

H1H7017N și H4H7017N CDR-L1 (ADN)

CAG AGT ATT AGT AGC TGG

25 (SECV ID NR: 11)

H1H7017N și H4H7017N CDR-L1 (Polipeptidă)

Q S I S S W

(SECV ID NR: 12 (sau o variantă a acestuia care are 1, 2, 3 sau 4 mutații punctuale și/sau deleții punctuale))

30 **H1H7017N și H4H7017N CDR-L2 (ADN)**

AAG GCG TCT

(SECV ID NR: 13)

H1H7017N și H4H7017N CDR-L2 (Polipeptidă)

K

A

S

35 (SECV ID NR: 14 (sau o variantă a acestuia care are o mutație punctuală și/sau deleție punctuală))

H1H7017N și H4H7017N CDR-L3 (ADN)

CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCG TAC ACT

(SECV ID NR: 15)

H1H7017N și H4H7017N CDR-L3 (Polipeptidă)

40 Q Q Y N S Y S Y T

(SECV ID NR: 16 (sau o variantă a acestuia care are 1, 2, 3 sau 4 mutații punctuale și/sau deleții punctuale))

H1H7017N

IgG1 umană cu lanț greu de lungime totală

QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVIWNQDGSYVYYADSVKGRFTISRDISKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGEWVLYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPP
CPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

45 (SECV ID NR: 17)

Lanț ușor de lungime totală-Kapa uman

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPDDEFATYYCQQYNSYSYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SECV ID NR: 18)

H4H7017N

IgG4 umană cu lanț greu de lungime totală (S108P)

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQSPGKGLEWVAVIWNDSYVYYADSVKGRFTISRDISKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCAREGEWVLYYFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTCTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPFA
PEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTFPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

(SECV ID NR: 19)

5 Lanț ușor de lungime totală - Kapa uman

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLESVPSRFSGSGSGTEFTLTIS
LQPDDEFATYYCQQYNSYSYTFGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(SECV ID NR: 18)

- Anticorpii și fragmentele care leagă antigenul din prezenta dezvăluire cuprind lanțuri de imunoglobulină care includ secvențele de aminoacizi prezentate aici, precum și modificări post-translaționale celulare și *in vitro* ale anticorpului. De exemplu, prezenta dezvăluire include anticorpi și fragmente de legare a antigenului ale acestora care se leagă în mod specific la TMPRSS2 care cuprinde secvențe de aminoacizi cu lanț greu și/sau ușor stabilite aici (*de ex.*, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 și/sau CDR-L3), precum și anticorpi și fragmente în care unul sau mai multe resturi de aminoacizi sunt glicozilate, unul sau mai multe resturi de Asn sunt deamidate, unul sau mai multe reziduuri (*de ex.*, Met, Trp și/sau His) este oxidat, Gln N-terminal este piroglutamat (pyroE) și/sau lizina C-terminală lipsește.

- 15 În prezenta invenție, este furnizată o proteină care leagă antigenul care este o proteină umană care leagă antigenul care se leagă în mod specific la TMPRSS2 umană și care este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului al acestuia și în care proteina care leagă antigenul cuprinde:

- 20 o regiune variabilă a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde
(a) un CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi: G F T F S S Y G (SECV ID NR: 6),
(b) un CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi: I W N D G S Y V (SECV ID NR: 8)
și
(c) un CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi: A R E G E W V L Y Y F D Y
25 (SECV ID NR: 10); și

o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde

- 30 (a) un CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q S I S S W (SECV ID NR: 12),
(b) un CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi: K A S (SECV ID NR: 14) și
(c) un CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q Q Y N S Y S Y T (SECV ID NR: 16).

- 35 Prezenta invenție prevede, de asemenea, un vas (*de ex.*, un flacon din plastic sau sticlă, *de ex.*, cu un capac sau o coloană cromatografică, ac tubular gol sau un cilindru de seringă) care cuprinde o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform prezentei invenții, *de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N.

- 40 Prezenta dezvăluire oferă, de asemenea, un dispozitiv de injecție care cuprinde una sau mai multe proteine care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment care leagă antigenul) care se leagă în mod specific de TMPRSS2, *de ex.*, H4H7017N sau H1H7017N, sau o compoziție farmaceutică a acestora. Dispozitivul de injecție poate fi ambalat într-un kit. Un dispozitiv de injecție este un dispozitiv care introduce o substanță în corpul unui subiect printr-o cale

parenterală, *de ex.*, intramuscular, subcutanat sau intravenos. De exemplu, un dispozitiv de injecție poate fi o seringă (*de ex.*, preumplută cu compoziția farmaceutică, cum ar fi, un auto-injector) care, de exemplu, include un cilindru sau butoi pentru reținerea fluidului de injectat (*de ex.*, care cuprinde anticorpul sau fragmentul, sau o compoziție farmaceutică a acestuia), un ac pentru străpungerea pielii și/sau a vaselor de sânge pentru injectarea fluidului; și un piston pentru împingerea fluidului din cilindru și prin spațiul gol al acului. Un dispozitiv de injecție care cuprinde o proteină care leagă antigenul, de exemplu, un anticorp sau un fragment de legare a antigenului al acestuia, dintr-o combinație a prezentei dezvoltării, sau o compoziție farmaceutică a acestuia poate fi un dispozitiv de injecție intravenos (IV). Un astfel de dispozitiv poate include proteina care leagă antigenul, sau o compoziție farmaceutică a acesteia într-o canulă sau trocar/ac care poate fi atașat la un tub care poate fi atașat la o pungă sau la un rezervor pentru reținerea fluidului (*de ex.*, ser fiziologic) introdus în corpul subiectului prin canulă sau trocar/ac. Anticorpul sau fragmentul sau o compoziție farmaceutică a acestuia, într-un aspect al dezvoltării, poate fi introdus în dispozitiv odată ce trocarul și canula sunt introduse în vena unui subiect și trocarul este îndepărtat din canula introdusă. Dispozitivul IV poate fi, de exemplu, introdus într-o venă periferică (*de ex.*, în mână sau braț); *vena cavă* superioară sau *vena cavă* inferioară, sau în atriol drept al inimii (*de ex.*, un IV central); sau într-o venă subclaviană, jugulară internă sau femorală și, de exemplu, avansată spre inimă până când ajunge la vena cavă superioară sau la atriol drept (*de ex.*, o linie venoasă centrală). Un dispozitiv de injecție poate fi un autoinjector; un injector cu jet sau o pompă de perfuzie externă. Un injector cu jet utilizează un jet îngust de lichid cu presiune ridicată care pătrunde în epidermă pentru a introduce anticorpul sau fragmentul sau o compoziție farmaceutică a acestuia în corpul unui subiect. Pompele de perfuzie externe sunt dispozitive medicale care livrează anticorpul sau fragmentul sau o compoziție farmaceutică a acestuia în corpul unui subiect în cantități controlate. Pompele de perfuzie externe pot fi alimentate electric sau mecanic. Diferite pompe funcționează în moduri diferite, de exemplu, o pompă de seringă reține fluidul în rezervorul unei seringi, iar un piston mobil controlează livrarea fluidului, o pompă elastomerică reține fluidul într-un rezervor de balon extensibil și presiunea din pereții elastici ai balonului antrenează livrarea fluidului. Într-o pompă peristaltică, un set de role ciupec în jos pe o lungime de tub flexibil, împingând fluidul înainte. Într-o pompă multicanal, fluidele pot fi livrate din mai multe rezervoare la viteze multiple. Dispozitivele de injecție conform prezentei invenții cuprind o proteină care leagă antigenul conform prezentei invenții. Un dispozitiv de injecție conform invenției poate cuprinde o compoziție conform invenției. Într-un exemplu de realizare a invenției, dispozitivul de injecție cuprinde o compoziție farmaceutică conform invenției.

Prezenta dezvoltare oferă, în plus, metode pentru administrarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform prezentei dezvoltării, de exemplu, H4H7017N sau H1H7017N, care cuprinde introducerea proteinei care leagă antigenul în corpul unui subiect (*de ex.*, un om). De exemplu, metoda cuprinde străpungerea corpului subiectului cu un ac al unei seringi și injectarea proteinei care leagă antigenul în corpul subiectului, de exemplu, în venă, arteră, tumoră, țesut muscular sau subcutanat al subiectului. În prezenta invenție, este furnizată o proteină de legare a antigenului din invenție pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea sau prevenirea infecției cu un virus gripal la un subiect care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic din proteina de legare a antigenului.

Pregătirea anticorpilor umani

Metodele de generare a anticorpilor umani la șoareci transgenici sunt cunoscute în domeniu. Orice astfel de metode cunoscute pot fi utilizate în contextul prezentei invenții pentru a produce anticorpi umani care se leagă în mod specific la TMPRSS2. Un imunogen care cuprinde oricare dintre cele care urmează poate fi utilizat pentru a genera anticorpi împotriva TMPRSS2. În anumite aspecte ale dezvoltării, anticorpii dezvoltării sunt obținuți de la șoareci imunizați cu TMPRSS2 nativă de lungime completă, sau cu un virus viu atenuat sau inactivat, sau cu ADN care codifică proteina sau fragmentul acesteia. Alternativ, proteina TMPRSS2 sau un fragment al acesteia se poate produce utilizând tehnici biochimice standard și modificate și poate fi utilizată ca imunogen. Într-un aspect al dezvoltării, imunogenul este o proteină TMPRSS2 produsă recombinant sau un fragment al acesteia. În anumite aspecte ale dezvoltării, imunogenul poate fi un vaccin polipeptidic TMPRSS2. În anumite aspecte, pot fi administrate una sau mai multe injecții de rapel. În anumite aspecte, imunogenul poate fi o polipeptidă TMPRSS2 recombinantă exprimată în *E. coli* sau în orice alte celule eucariote sau de mamifere, cum ar fi, celulele ovarului de hamster chinezesc (CHO).

Folosind tehnologia VELOCIMMUNE® (vezi, de exemplu, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) sau orice altă metodă cunoscută pentru generarea anticorpilor monoclonali, pot fi inițial izolați anticorpii himerici cu afinitate ridicată pentru TMPRSS2 care au o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Tehnologia

VELOCIMMUNE® implică generarea unui șoarece transgenic care are un genom care cuprinde regiuni variabile ale lanțului greu și ușor uman legate în mod operațional de loci de regiune constantă endogenă de șoarece astfel încât șoarecele să producă un anticorp care cuprinde o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece ca răspuns la stimularea antigenică.

5 ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțurilor grele și ușoare ale anticorpului sunt izolate și legate în mod operațional de ADN-ul care codifică regiunile constante ale lanțului greu și ușor uman. ADN-ul este apoi exprimat într-o celulă capabilă să exprime anticorpul complet uman.

10 În general, un șoarece VELOCIMMUNE® este provocat cu antigenul de interes, iar celulele limfatice (cum ar fi, celulele B) sunt recuperate de la șoarecii care exprimă anticorpi. Celulele limfatice pot fi fuzionate cu o linie celulară de mielom pentru a prepara linii celulare de hibridom nemuritor și astfel de linii celulare de hibridom sunt protejate și selectate pentru a identifica linii celulare de hibridom care produc anticorpi specifici antigenului de interes. ADN-ul care codifică regiunile variabile ale lanțului greu și lanțului ușor poate fi izolat și legat de regiunile constante izotipice dorite ale lanțului greu și lanțului ușor. O astfel de proteină anticorp poate fi

15 produsă într-o celulă, cum ar fi, o celulă CHO. Alternativ, ADN-ul care codifică anticorpii himerici specifici antigenului sau domeniile variabile ale lanțurilor ușoare și grele poate fi izolat direct din limfocitele specifice antigenului.

Inițial, sunt izolați anticorpii himerici cu afinitate ridicată care au o regiune variabilă umană și o regiune constantă de șoarece. Ca și în secțiunea experimentală de mai jos, anticorpii sunt

20 caracterizați și selectați pentru caracteristicile dorite, inclusiv afinitate, selectivitate, epitop, *etc.* Regiunile constante ale șoarecilor sunt înlocuite cu o regiune constantă umană dorită pentru a genera un anticorp complet uman, de exemplu, IgG1 sau IgG4 de tip sălbatic sau modificat. În timp ce regiunea constantă selectată poate varia în funcție de utilizarea specifică, caracteristicile de legare a antigenului cu afinitate ridicată și specificitatea țintei se află în regiunea variabilă.

25 **Anticorpi anti-TMPRSS2 care cuprind variante Fc**

Conform anumitor aspecte ale prezentei dezvoltări, se furnizează proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi sau fragmente de legare a antigenului care cuprind un domeniu Fc care cuprinde una sau mai multe mutații, care, de exemplu, sporesc sau diminuează

30 legarea anticorpilor la receptorul FcRn, *de ex.*, la pH acid comparativ cu pH neutru. De exemplu, prezenta dezvoltării include anticorpi anti-TMPRSS2 care cuprind o mutație în C_H2 sau o regiune C_H3 a domeniului Fc, în care mutația(mutațiile) crește(cresc) afinitatea domeniului Fc pentru FcRn într-un mediu acid (*de ex.*, într-un endozom în care pH-ul variază între aproximativ 5,5 și aproximativ 6,0). Astfel de mutații pot duce la o creștere a timpului de înjumătățire plasmatică al anticorpului atunci când este administrat unui animal. Exemplele nelimitative de astfel de

35 modificări Fc includ, *de ex.*, o modificare la poziția 250 (*de ex.*, E sau Q); 250 și 428 (*de ex.*, L sau F); 252 (*de ex.*, L/Y/F/W sau T), 254 (*de ex.*, S sau T), și 256 (*de ex.*, S/R/Q/E/D sau T); sau o modificare la poziția 428 și/sau 433 (*de ex.*, H/L/R/S/P/Q sau K) și/sau 434 (*de ex.*, A, W, H, F sau Y [N434A, N434W, N434H, N434F sau N434Y]); sau o modificare la poziția 250 și/sau 428; sau o modificare la poziția 307 sau 308 (*de ex.*, 308F, V308F), și 434. Într-un caz, modificarea cuprinde o modificare 428L (*de ex.*, M428L) și 434S (*de ex.*, N434S); o modificare 428L, 2591 (*de ex.*, V259I), și 308F (*de ex.*, V308F); o modificare 433K (*de ex.*, H433K) și a 434 (*de ex.*, 434Y); o modificare 252, 254, și 256 (*de ex.*, 252Y, 254T, și 256E); o modificare 250Q și 428L (*de ex.*, T250Q și M428L); și o modificare 307 și/sau 308 (*de ex.*, 308F sau 308P). În încă un alt caz, modificarea cuprinde o modificare 265A (*de ex.*, D265A) și/sau a 297A (*de ex.*, N297A).

45 De exemplu, prezenta dezvoltării include proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, care cuprind un domeniu Fc care cuprinde una sau mai multe perechi sau grupuri de mutații selectate din grupul care constă din: 250Q și 248L (*de ex.*, T250Q și M248L); 252Y, 254T și 256E (*de ex.*, M252Y, S254T și T256E); 428L și 434S (*de ex.*, M428L și N434S); 257I și 311I (*de ex.*, P257I și Q311I); 257I și 434H (*de ex.*, P257I și N434H); 376V și 434H (*de ex.*, D376V și N434H); 307A, 380A și 434A (*de ex.*, T307A, E380A și N434A); și 433K și 434F (*de ex.*, H433K și N434F).

Sunt avute în vedere în cadrul prezentei dezvoltări proteinele anti-TMPRSS care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi și fragmente ale acestora care leagă antigenul, care cuprind un V_H și/sau V_L așa cum este prezentat aici care cuprinde orice combinații posibile ale mutațiilor

50 domeniului Fc de mai sus.

Prezenta dezvoltării include, de asemenea, proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, care cuprind un V_H prezentat aici și o regiune constantă a lanțului greu himeric (C_H), în care regiunea C_H himerică cuprinde segmente derivate din regiuni C_H cu mai mult de un izotip de imunoglobulină. De exemplu, anticorpii pot cuprinde o

60 regiune C_H himerică care cuprinde o parte sau tot domeniul C_H2 derivat dintr-o moleculă IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană, combinată cu o parte sau tot domeniul C_H3 derivat dintr-o

moleculă IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană. Anticorpul pot cuprinde o regiune C_H himerică care are o regiune de balama himerică. De exemplu, o balama himerică poate cuprinde o secvență de aminoacizi "balama superioară" (reziduuri de aminoacizi de la pozițiile 216 până la 227 conform numerotării EU) derivate dintr-o regiune balama de IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană, combinată cu o secvență de "balama inferioară" (reziduuri de aminoacizi din pozițiile 228 până la 236 conform numerotării EU) derivată dintr-o regiune balama de IgG1 umană, IgG2 umană sau IgG4 umană. Conform anumitor cazuri, regiunea balamalei himerice cuprinde reziduuri de aminoacizi derivate dintr-o balamă superioară de IgG1 umană sau IgG4 umană și reziduuri de aminoacizi derivate dintr-o balamă inferioară de IgG2 umană. Un anticorp care cuprinde o regiune C_H himerică descrisă aici poate, în anumite cazuri, să prezinte funcții efector Fc modificate fără a afecta negativ proprietățile terapeutice sau farmacocinetice ale anticorpului. (Vezi, *de ex.*, WO2014/022540).

Imunoconjugate

Dezvăluirea cuprinde proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, conjugate cu un alt fragment, *de ex.*, o porțiune terapeutică (un "imunoconjugat"), cum ar fi, un toxoid sau un medicament antiviral pentru tratarea infecției cu virusul gripal. De exemplu, un anticorp sau fragment anti-TMPRSS2 poate fi conjugat cu oricare dintre agenții terapeutici suplimentari stabiliți aici. Așa cum este utilizat aici, termenul "imunoconjugat" se referă la o proteină care leagă antigenul, *de ex.*, un anticorp sau fragment care leagă antigenul, care este legat chimic sau biologic de un agent radioactiv, o citokină, un interferon, un fragment țintă sau reporter, o enzimă, o peptidă sau o proteină sau un agent terapeutic. Proteina care leagă antigenul poate fi legată de agentul radioactiv, citokina, interferonul, fragmentul țintă sau reporter, enzima, peptida sau agentul terapeutic în orice locație în lungul moleculei, atâta timp cât este capabilă să își lege ținta (TMPRSS2). Exemplele de imunoconjugate includ conjugate anticorp-medicament și proteine de fuziune anticorp-toxină. Într-un caz, agentul poate fi un al doilea anticorp diferit care se leagă în mod specific de TMPRSS2. Tipul fragmentului terapeutic care poate fi conjugat cu proteina anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorp sau fragment) va lua în considerare starea de tratat și efectul terapeutic dorit de atins. Vezi, *de ex.*, Arnon ș.a., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld ș.a. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom ș.a., "Antibodies For Drug Delivery", Controlled Drug Delivery (Ed. a 2-a), Robinson ș.a. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", Monoclonal Antibodies 1984: Biological and Clinical Applications, Pinchera ș.a. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin ș.a. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), și Thorpe ș.a., "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62: 119-58 (1982).

Anticorpi multi-specifici

Prezenta dezvăluire include proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi și fragmente care leagă antigenul ale acestora, precum și metode de utilizare a acestora și metode de fabricare a unor astfel de proteine care leagă antigenul. Termenul de proteine care leagă antigenul "anti-TMPRSS2", *de ex.*, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, include molecule multispecifice (*de ex.*, molecule bispecifice sau biparatopice) care includ cel puțin un prim domeniu de legare la antigen care se leagă în mod specific de TMPRSS2 (*de ex.*, un domeniu de legare a antigenului de la H1H7017N sau H4H7017N) și cel puțin un al doilea domeniu de legare a antigenului care se leagă de un antigen diferit, sau de un epitop din TMPRSS2 care este diferit de cel al primului domeniu de legare a antigenului (*de ex.*, HA gripal, cum ar fi, un domeniu de legare la antigen de la H1H14611 N2, H1H14612N2 sau H1H11729P). Opțional, primul și al doilea epitop se pot suprapune. Alternativ, primul și al doilea epitop nu se suprapun. De exemplu, într-un exemplu de realizare a invenției, un anticorp multispecific este un anticorp IgG bispecific (*de ex.*, IgG1 sau IgG4) care include un prim domeniu care leagă antigenul care se leagă în mod specific de TMPRSS2 incluzând lanțul greu și ușor de imunoglobulină al H1H7017N sau H4H7017N și un al doilea domeniu care leagă antigenul care se leagă în mod specific de HA gripal (care cuprinde un lanț greu de imunoglobulină, cum ar fi, H1H14611N2, H1H14612N2 sau H1H11729P).

"H1H7017N" include o moleculă multispecifică, *de ex.*, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, care includ HCDRs și LCDRs, V_H și V_L, sau HC și LC ale H1H7017N (inclusiv variante ale acestora așa cum sunt prezentate aici).

"H4H7017N" include o moleculă multispecifică, *de ex.*, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul, care includ HCDRs și LCDRs, V_H și V_L, sau HC și LC ale H4H7017N (inclusiv variante ale acestora așa cum sunt prezentate aici).

Intr-o realizare a invenției, un domeniu de legare la antigen care se leagă în mod specific de TMRSS, care poate fi inclus într-o moleculă multispecifică, cuprinde:

(1)

5 (i) o secvență de domeniu variabil a lanțului greu care cuprinde CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 6, CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 8 și CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 10 și

10 (ii) o secvență de domeniu variabil a lanțului ușor care cuprinde CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 12, CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 14 și CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 16;

sau,

(2)

15 (i) o secvență de domeniu variabil a lanțului greu care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 2 și

(ii) o secvență de domeniu variabil a lanțului ușor care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 4;

sau,

(3)

20 (i) o secvență a lanțului greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 17 sau 19 și

(ii) o secvență a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprind secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 18.

25 Intr-un exemplu de realizare a invenției, anticorpul multispecific sau fragmentul include mai mult de două specificități de legare diferite (*de ex.*, o moleculă trispecifică), de exemplu, unul sau mai multe domenii suplimentare de legare la antigen care sunt aceleași sau diferite de primul și/sau al doilea domeniu de legare la antigen.

30 De exemplu, o moleculă multispecifică poate cuprinde, pe lângă un situs de legare la antigen care se leagă în mod specific de TMRSS2, un situs de legare la antigen care se leagă în mod specific la HA gripal preluat de la un anticorp selectat din grupul care constă din: H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N; H1H11704P; H1H11711P; H1H11714P; H1H11717P; H1H11724P; H1H11727P; H1H11730P2; H1H11731P2; H1H11734P2; H1H11736P2; H1H11742P2; H1H11744P2; H1H11745P2; H1H11747P2; H1H11748P2; H1H17952B; H1H17953B; H1H17954B; H1H17955B; H1H17956B; H1H17957B; H1H17958B; H1H17959B; H1H17960B; H1H17961B; H1H17962B; H1H17963B; H1H17964B; H1H17965B; H1H17966B; H1H17967B; H1H17968B; H1H17969B; H1H17970B; H1H17971B; H1H17972B; H1H17973B; H1H17974B; H1H17975B; H1H17976B; H1H17977B; H1H17978B; H1H17979B; H1H17980B; H1H17981B; H1H17982B; H1H17983B; H1H17984B; H1H17985B; H1H17986B; H1H17987B; H1H17988B; H1H17989B; H1H17990B; H1H17991B; H1H17992B; H1H17993B; H1H17994B; H1H17995B; H1H17996B; H1H17997B; H1H17998B; H1H17999B; H1H18000B; H1H18001B; H1H18002B; H1H18003B; H1H18004B; H1H18005B; H1H18006B; H1H18007B; H1H18008B; H1H18009B; H1H18010B; H1H18011B; H1H18012B; H1H18013B; H1H18014B; H1H18015B; H1H18016B; H1H18017B; H1H18018B; H1H18019B; H1H18020B; H1H18021B; H1H18022B; H1H18023B; H1H18024B; H1H18025B; H1H18026B; H1H18027B; H1H18028B; H1H18029B; H1H18030B; H1H18031B; H1H18032B; H1H18033B; H1H18034B; H1H18035B; H1H18037B; H1H18038B; H1H18039B; H1H18040B; H1H18041B; H1H18042B; H1H18043B; H1H18044B; H1H18045B; H1H18046B; H1H18047B; H1H18048B; H1H18049B; H1H18051B; H1H18052B; H1H18053B; H1H18054B; H1H18055B; H1H18056B; H1H18057B; H1H18058B; H1H18059B; H1H18060B; H1H18061B; H1H18062B; H1H18063B; H1H18064B; H1H18065B; H1H18066B; H1H18067B; H1H18068B; H1H18069B; H1H18070B; H1H18071B; H1H18072B; H1H18073B; H1H18074B; H1H18075B; H1H18076B; H1H18077B; H1H18078B; H1H18079B; H1H18080B; H1H18081B; H1H18082B; H1H18083B; H1H18084B; H1H18085B; H1H18086B; H1H18087B; H1H18088B; H1H18089B; H1H18090B; H1H18091B; H1H18092B; H1H18093B; H1H18094B; H1H18095B; H1H18096B; H1H18097B; H1H18098B; H1H18099B; H1H18100B; H1H18101B; H1H18102B; H1H18103B; H1H18104B; H1H18105B; H1H18107B; H1H18108B; H1H18109B; H1H18110B; H1H18111B; H1H18112B; H1H18113B; H1H18114B; H1H18115B; H1H18116B; H1H18117B; H1H18118B; H1H18119B; H1H18120B; H1H18121B; H1H18122B; H1H18123B; H1H18124B; H1H18125B; H1H18126B; H1H18127B; H1H18128B; H1H18129B; H1H18130B; H1H18131B; H1H18132B;

H1H18133B; H1H18134B; H1H18135B; H1H18136B; H1H18137B; H1H18138B; H1H18139B; H1H18140B; H1H18141B; H1H18142B; H1H18143B; H1H18144B; H1H18145B; H1H18146B; H1H18147B; H1H18148B; H1H18149B; H1H18150B; H1H18151B; H1H18152B; H1H18153B; H1H18154B; H1H18155B; H1H18156B; H1H18157B; H1H18158B; H1H18159B; H1H18160B; 5 H1H18161B; H1H18162B; H1H18163B; H1H18164B; H1H18165B; H1H18166B; H1H18167B; H1H18168B; H1H18169B; H1H18170B; H1H18171B; H1H18172B; H1H18173B; H1H18174B; H1H18175B; H1H18176B; H1H18177B; H1H18178B; H1H18179B; H1H18180B; H1H18181B; H1H18182B; H1H18183B; H1H18184B; H1H18185B; H1H18186B; H1H18187B; H1H18188B; H1H18189B; H1H18190B; H1H18191B; H1H18192B; H1H18193B; H1H18194B; H1H18195B; 10 H1H18196B; H1H18197B; H1H18198B; H1H18199B; H1H18200B; H1H18201B; H1H18202B; H1H18203B; H1H18204B; H1H18205B; H1H18206B; H1H18207B; H1H18208B; H1H18209B; H1H18210B; H1H18211B; H1H18212B; H1H18213B; H1H18214B; H1H18216B; H1H18217B; H1H18218B; H1H18219B; H1H18220B; H1H18221B; H1H18222B; H1H18223B; H1H18224B; H1H18225B; H1H18226B; H1H18227B; H1H18228B; H1H18229B; H1H18230B; H1H18231B; 15 H1H18232B; H1H18233B; H1H18234B; H1H18235B; H1H18236B; H1H18237B; H1H18238B; H1H18239B; H1H18240B; H1H18241B; H1H18242B; H1H18243B; H1H18244B; H1H18245B; H1H18246B; H1H18247B; H1H18248B; H1H18249B; H1H18250B; H1H18251B; H1H18252B; H1H18253B; H1H18254B; H1H18255B; H1H18256B; H1H18257B; H1H18258B; H1H18259B; H1H18261B; H1H18262B; H1H18263B; H1H18264B; H1H18265B; H1H18266B; H1H18267B; 20 H1H18268B; H1H18269B; H1H18270B; H1H18271B; H1H18272B; H1H18274B; H1H18275B; H1H18276B; H1H18277B; H1H18278B; H1H18279B; H1H18280B; H1H18281B; H1H18282B; H1H18283B; H1H18284B; H1H18285B; H1H18286B; H1H18287B; H1H18288B; H1H18289B; H1H18290B; H1H18291B; H1H18292B; H1H18293B; H1H18294B; H1H18295B; H1H18297B; H1H18298B; H1H18299B; H1H18300B; H1H18301B; H1H18302B; H1H18303B; H1H18304B; 25 H1H18305B; H1H18306B; H1H18307B; H1H18308B; H1H18309B; H1H18310B; H1H18311B; H1H18312B; H1H18313B; H1H18314B; H1H18315B; H1H18316B; H1H18317B; H1H18318B; H1H18319B; H1H18320B; H1H18321B; H1H18322B; H1H18323B; H1H18324B; H1H18325B; H1H18326B; H1H18327B; H1H18328B; H1H18329B; H1H18330B; H1H18331B; H1H18332B; H1H18333B; H1H18334B; și H1H18335B; așa cum se prevede în publicația nr. WO2016/100807 30 (*de ex.*, CDR-Hs, V_H sau lanț greu al acestuia; și CDR-Ls, V_L sau lanț ușor al acestuia).

O moleculă multispecifică poate cuprinde, pe lângă un situs de legare a antigenului care se leagă în mod specific de TMPRSS2, un situs de legare a antigenului care se leagă în mod specific de proteina HA a Grupului II gripal, *de ex.*, care cuprinde V_H și V_L din H1H14611N2 (*de ex.*, SECV ID Nr. 24 și 28); sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și 35 CDR-H3 din H1H14611 N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 25-27) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H14611N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 29-31).

O moleculă multispecifică poate cuprinde, pe lângă un situs de legare a antigenului care se leagă în mod specific de TMPRSS2, un situs de legare a antigenului care se leagă în mod specific de proteina HA a Grupului II gripal, *de ex.*, care cuprinde V_H și V_L din H1H14612N2 (*de ex.*, SECV ID Nr. 40 și 44); sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și 40 CDR-H3 din H1H14612N2 (*de ex.*, SECV ID NR: 41-43) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H14612N2 (*de ex.*, SECV ID NR. 45-47).

O moleculă multispecifică poate cuprinde, pe lângă un situs de legare a antigenului care se leagă în mod specific de TMPRSS2, un situs de legare a antigenului care se leagă în mod specific de proteina HA a Grupei I gripale, *de ex.*, care cuprinde V_H și V_L din H1H11729P (*de ex.*, SECV ID Nr. 32 și 36); sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 45 din H1H11729P (*de ex.*, SECV ID NR. 33-35) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprind CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H11729P (*de ex.*, SECV ID NR. 37-39).

Intr-un aspect al dezvoltării, un fragment bispecific care leagă antigenul cuprinde un prim scFv (*de ex.*, care cuprinde V_H și V_L de H1H7017N sau H4H7017N) care are specificitate de legare pentru un prim epitop (*de ex.*, TMPRSS2) și un al doilea scFv (*de ex.*, care cuprinde V_H și V_L ale unui anticorp anti-gripal HA) care are specificitate de legare pentru un al doilea epitop diferit. De exemplu, într-un aspect al dezvoltării, primul și al doilea scFv sunt legați de un linker, de exemplu, un linker peptidic (*de ex.*, un linker GS precum (GGGS)_n (SECV ID NR: 48) în care 55 n este, de exemplu, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 sau 10). Alte fragmente bispecifice care leagă antigenul includ un F(ab)₂ al unui anticorp IgG bispecific care cuprinde CDRs ale lanțului greu și ușor al H1H7017N sau H4H7017N și ale unui alt anticorp care se leagă de un epitop diferit.

Metode terapeutice

Prezența dezvoltării oferă metode pentru tratarea sau prevenirea infecției virale sau a cancerului (*de ex.*, cancer de prostată) prin administrarea unei cantități eficiente terapeutic de 60 proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment de legare la antigen,

(*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N) unui subiect (*de ex.*, un om) care are nevoie de un astfel de tratament sau prevenire. În prezenta invenție, este furnizată o proteină de legare a antigenului conform invenției pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea sau prevenirea infecției cu un virus gripal la un subiect care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic din proteina de legare a antigenului.

Infecția cu virus gripal poate fi tratată sau prevenită, la un subiect, prin administrarea unui subiect a unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform prezentei invenții. Virusurile gripale sunt clasificate în tipurile A, B și C pe baza proteinelor lor de bază. Subtipurile de virusuri gripale A sunt determinate de glicoproteinele dinveliș care posedă fie activitate de hemagglutinină (HA), fie de neuraminidază (NA). Există mai multe subtipuri HA (*de ex.*, HA1, HA2, HA3, HA4, HA5, HA6, HA7, HA8, HA9, HA10, HA11, HA12, HA13, HA14, HA15, HA16, HA17 sau HA18 - aceste subtipuri pot fi desemnate ca H1, H2, H3, *etc.*) și subtipurile NA (*de ex.*, NA1, NA2, NA3, NA4, NA5, NA6, NA7, NA8, NA9, NA10 sau NA11 - aceste subtipuri pot fi desemnate ca N1, N2, N3, *etc.*) ale virusurilor gripale A care sunt utilizate pentru a desemna subtipul gripei A. De exemplu, virusul gripal A H1N1 și H3N2 sunt agenți patogeni umani cunoscuți în mod obișnuit. Oamenii sunt infectați în mod obișnuit de virusurile din subtipurile H1, H2 sau H3 și N1 sau N2. Prezenta dezvăluire include metode pentru tratarea sau prevenirea infecției cu un subtip de virus gripal discutat aici. Anticorpii multispecifici și fragmentele acestora care leagă antigenul care se leagă de TMPRSS2, într-un aspect al dezvăluirii, se leagă, de asemenea, de HA / și/sau de NA, *de ex.*, de un subtip prezentat aici.

O doză eficientă sau eficientă terapeutic de proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment care leagă antigenul (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), pentru tratarea sau prevenirea unei infecții virale se referă la cantitatea de anticorp sau de fragment suficientă pentru a atenua unul sau mai multe semne și/sau simptome ale infecției la subiectul tratat, fie prin inducerea regresiei sau eliminării unor astfel de semne și/sau simptome fie prin inhibarea progresiei acestor semne și/sau simptome. Cantitatea de doză poate varia în funcție de vârsta și greutatea unui subiect cărui urmează să îi fie administrată, de boala țintă, de stări, de calea de administrare și altele asemenea. Într-un exemplu de realizare a invenției, o doză eficientă sau eficientă terapeutic de anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia din prezenta invenție, pentru tratarea sau prevenirea infecției virale, *de ex.*, la un subiect uman adult, este de aproximativ 0,01 până la aproximativ 200 mg/kg, *de ex.*, până la aproximativ 150 mg/kg. Într-un exemplu de realizare a invenției, doza este de până la aproximativ 10,8 sau 11 grame (*de ex.*, aproximativ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 sau 11 grame). În funcție de gravitatea infecției, frecvența și durata tratamentului pot fi ajustate. În anumite exemple de realizare, proteina care leagă antigenul conform prezentei invenții poate fi administrată la o doză inițială, urmată de una sau mai multe doze secundare. În anumite exemple de realizare, doza inițială poate fi urmată de administrarea unei a doua doze, sau a mai multor doze ulterioare de anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia într-o cantitate care poate fi aproximativ aceeași sau mai mică decât cea a dozei inițiale, în care dozele sunt separate prin cel puțin 1 zi până la 3 zile; cel puțin o săptămână, cel puțin 2 săptămâni; cel puțin 3 săptămâni; cel puțin 4 săptămâni; cel puțin 5 săptămâni; cel puțin 6 săptămâni; cel puțin 7 săptămâni; cel puțin 8 săptămâni; cel puțin 9 săptămâni; cel puțin 10 săptămâni; cel puțin 12 săptămâni; sau cel puțin 14 săptămâni.

Așa cum este utilizat aici, termenul "subiect" se referă la un mamifer (*de ex.*, șobolan, șoarece, pisică, câine, vacă, oaie, cal, capră, iepure), de preferință un om, de exemplu, care are nevoie de prevenire și/sau tratament al unei boli sau tulburări precum infecția virală sau cancerul. Subiectul poate avea o infecție virală, *de ex.*, o infecție gripală, sau poate fi predispus la dezvoltarea unei infecții. Subiecții predispuși la dezvoltarea unei infecții sau subiecții care pot prezenta un risc crescut de a contracta o infecție (*de ex.*, a virusului gripal), includ subiecți cu sistem imunitar compromis din cauza bolii autoimune, subiecți care primesc terapie imunosupresivă (de exemplu, după transplant de organe), subiecți afectați de sindromul imunodeficienței umane (HIV), sau sindromul imunodeficienței dobândite (SIDA), subiecți cu forme de anemie care epuizează sau distrug globulele albe din sânge, subiecții care primesc radiații sau chimioterapie, sau subiecții afectați de o tulburare inflamatorie. În plus, subiecții foarte tineri (*de ex.*, cu vârsta de 5 ani sau mai mică) sau bătrâni (*de ex.*, 65 de ani sau peste) prezintă un risc crescut. Mai mult, un subiect poate fi expus riscului de a contracta o infecție virală din cauza apropierei de un focar al bolii, *de ex.*, subiectul se află într-un oraș dens populat, sau în imediata apropiere a subiecților cu infecții confirmate sau suspectate ale unui virus, sau la alegerea unui loc de muncă; *de ex.*, lucrător în spital, cercetător farmaceutic, călător în zona infectată sau care călătorește cu avionul frecvent.

"Tratare" sau "tratament" înseamnă administrarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment de legare la antigen din prezenta invenție (*de ex.*,

H1H7017N sau H4H7017N), unui subiect care are unul sau mai multe semne sau simptome ale unei boli sau infecții, *de ex.*, infecție virală, pentru care proteina care leagă antigenul este eficientă atunci când este administrată subiectului într-o cantitate sau doză eficientă sau eficientă terapeutic (așa cum s-a discutat aici).

5 Prezenta dezvăluire cuprinde, de asemenea, administrarea profilactică a unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment al acestuia care leagă antigenul conform prezentei invenții (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), unui subiect care prezintă un risc de infecție virală, astfel încât să prevină o astfel de infecție. Imunoprofilaxia pasivă bazată pe anticorpi s-a dovedit o strategie eficientă pentru prevenirea unei infecții virale la un subiect. Vezi
10 *de ex.*, Berry ș.a., Passive broad-spectrum influenza immunoprophylaxis. Influenza Res Treat. 2014 ;2014:267594. Epub 2014 Sep 22; și Jianqiang ș.a., Passive immune neutralization strategies for prevention and control of influenza A infections, Immunotherapy. 2012 February ; 4(2): 175-186; Prabhu ș.a., Antivir Ther. 2009; 14(7):911-21, Prophylactic and therapeutic efficacy of a chimeric monoclonal antibody specific for H5 hemagglutinin against lethal H5N1 influenza.
15 "Prevenire" sau "care previne" înseamnă administrarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment de legare la antigen din prezenta invenție (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), unui subiect pentru a inhiba manifestarea unei boli sau infecții (*de ex.*, infecție virală) în corpul unui subiect, pentru care proteina care leagă antigenul este eficientă atunci când este administrată subiectului într-o cantitate sau doză eficientă sau eficientă terapeutic (așa cum s-a discutat aici).

20 Într-un exemplu de realizare a invenției, un semn sau simptom al unei infecții virale la un subiect este supraviețuirea sau proliferarea virusului în corpul subiectului, *de ex.*, determinat prin testul de titru viral (*de ex.*, propagarea virusului gripal în ouă de pui embrionate, sau analiza hemaglutinării virusului gripal). Alte semne și simptome ale infecției virale sunt discutate aici.

25 Prezenta dezvăluire oferă o metodă pentru tratarea sau prevenirea infecției virale (*de ex.*, virusul gripal sau infecția cu virusul corona), sau pentru inducerea regresiei, sau eliminării, sau inhibării progresiei a cel puțin unui semn sau simptom al infecției virale, cum ar fi:

- Febra sau senzație de febră/frisoane;
- Tuse;
- 30 • Durere de gat;
- Nas care curge sau infundat;
- Strănut;
- Dureri musculare sau corporale;
- Dureri de cap;
- 35 • Oboseală (oboseală);
- vărsături ;
- diaree;
- infecție a tractului respirator;
- disconfort în piept;
- 40 • dificultăți de respirație;
- bronșită; și/sau
- pneumonie,

semn sau simptom care este secundar infecției virale, la un subiect care are nevoie de acesta (*de ex.*, un om), prin administrarea unei cantități eficiente terapeutic de proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N) unui subiect, de exemplu, prin injectarea proteinei în corpul subiectului.

Prezenta dezvăluire include, de asemenea, metode pentru tratarea sau prevenirea cancerului, *de ex.*, cancer metastatic, *de ex.*, cancer de prostată (*de ex.*, care se caracterizează prin exprimarea unei fuziuni TMPRSS2:ERG), cancer de colon, cancer pulmonar, cancer de pancreas, cancer al tractului urinar, cancer mamar, cancer ovarian, adenocarcinom de prostată, carcinom cu celule renale, adenocarcinom colorectal, adenocarcinom pulmonar, carcinom pulmonar cu celule scuamoase și/sau mezoteliom pleural, la un subiect, prin administrarea subiectului unei cantități eficiente terapeutic de proteină care leagă antigenul TMPRSS2 (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), de exemplu, prin injectarea de proteine în corpul subiectului. Într-un aspect al dezvoltării, subiectului i se administrează, de asemenea, proteina TMPRSS2 care leagă antigenul în asociere cu un alt agent terapeutic, de exemplu, un agent terapeutic anticancer. Într-un aspect al dezvoltării, cancerul este o tumoare ale cărei celule exprimă TMPRSS2, sau o variantă a acesteia.

Combinații și compoziții farmaceutice

60 Pentru a prepara compoziții farmaceutice ale proteinelor anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi și fragmente care leagă antigenul acestora (*de ex.*, H1H7017N sau

H4H7017N), proteina care leagă antigenul este amestecată cu un purtător sau excipient acceptabil farmaceutic. Vezi, *de ex.*, Remington's Pharmaceutical Sciences și U.S. Pharmacopeia: National Formulary, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1984); Hardman, ș.a. (2001) Goodman și Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, și Wilkins, New York, N.Y.; Avis, ș.a. (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, ș.a. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, ș.a. (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner și Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y. In prezenta invenție, este furnizată o compoziție farmaceutică care cuprinde o proteină de legare a antigenului conform invenției și un purtător acceptabil farmaceutic și, opțional, un alt agent terapeutic. Într-un exemplu de realizare a invenției, compoziția farmaceutică este sterilă. Astfel de compoziții fac parte din prezenta invenție.

Scopul prezentei dezvăluiri include compoziții deshidratate *de ex.*, liofilizate, care cuprind proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), sau o compoziție farmaceutică a acestuia care include un purtător acceptabil farmaceutic, dar substanțial fără apă.

Într-un alt aspect al dezvăluirii, un alt agent terapeutic care este administrat unui subiect în asociere cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), dezvăluit aici este administrat subiectului în conformitate cu Physicians' Desk Reference 2003 (Thomson Healthcare; ediția a 57-a (1 nov. 2002)).

Modul de administrare poate varia. Căile de administrare includ oral, rectal, transmucosal, intestinal, parenteral; intramuscular, subcutanat, intradermic, intramedular, intratecal, intraventricular direct, intravenos, intraperitoneal, intranasal, intraocular, prin inhalare, insuflație, topic, cutanat, transdermic sau intra-arterial.

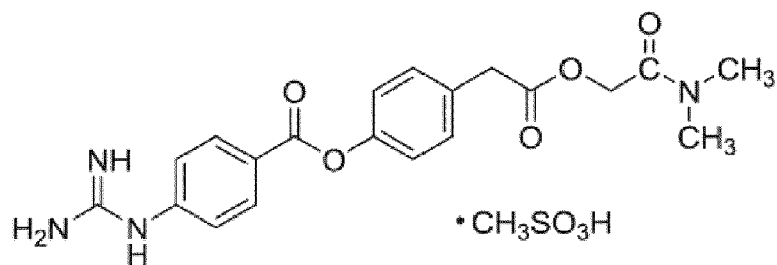
Prezenta dezvăluire oferă metode pentru administrarea unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), care cuprind introducerea proteinei în corpul unui subiect. De exemplu, metoda cuprinde străpungerea corpului subiectului cu un ac al unei seringi și injectarea proteinei care leagă antigenul în corpul subiectului, *de ex.*, în vena, artera, tumora, țesutul muscular sau subcutanat al subiectului.

Prezenta dezvăluire oferă un vas (*de ex.*, un flacon din plastic sau sticlă, *de ex.*, cu un capac, sau o coloană cromatografică, ac tubular gol sau un cilindru de seringă) care cuprinde oricare dintre proteinele anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi sau fragmente care leagă antigenul al acestora (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), polipeptide (*de ex.*, un HC, LC, V_H sau V_L al H1H7017N sau H4H7017N) sau polinucleotide sau vectori stabiliți aici, sau o compoziție farmaceutică a acestora care cuprinde un purtător acceptabil farmaceutic. Dispozitivele de injectare conform prezentei invenții cuprind o proteină care leagă antigenul conform prezentei invenții. Un dispozitiv de injectare conform invenției poate cuprinde o compoziție conform invenției. Într-un exemplu de realizare, dispozitivul de injectare cuprinde o compoziție farmaceutică conform invenției.

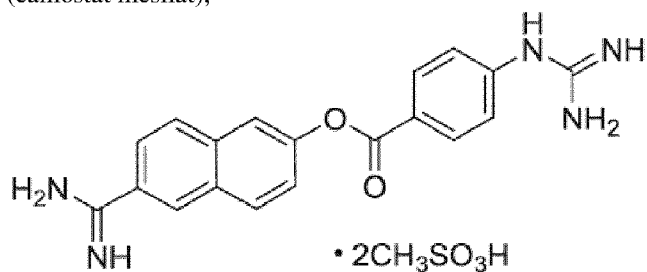
O proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorp sau fragment al acestuia care leagă antigenul conform prezentei invenții (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), pot fi în asociere cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari. De exemplu, agentul terapeutic suplimentar poate fi un medicament antiviral și/sau un vaccin. Așa cum este utilizat aici, termenul "medicament antiviral" se referă la orice medicament antiinfecțios sau terapie utilizată pentru a trata, preveni sau ameliora o infecție virală la un subiect. Termenul "medicament antiviral" include, dar nu se limitează la acesta, un steroid cationic antimicrobian, leupeptină, aprotinină, amantadină, rimantadină, oseltamivir, zanamivir, ribavirină sau interferon-alfa2b. Metodele pentru tratarea sau prevenirea infecției cu virus (*de ex.*, gripa) la un subiect care are nevoie de tratamentul sau prevenirea menționată prin administrarea H1 H7017N sau H4H7017N în asociere cu un alt agent terapeutic fac parte din prezenta dezvăluire.

De exemplu, agentul terapeutic suplimentar poate fi un vaccin, *de ex.*, un vaccin antigripal. Opțional, un vaccin este un vaccin cu virus inactivat/ucis, un vaccin cu virus viu atenuat, sau un vaccin cu subunitate de virus.

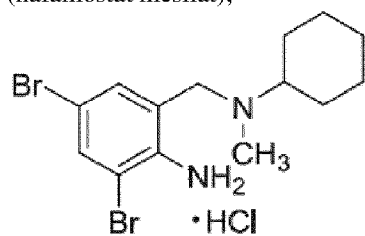
De exemplu, agentul terapeutic suplimentar poate fi:



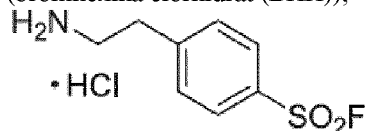
(camostat mesilat);



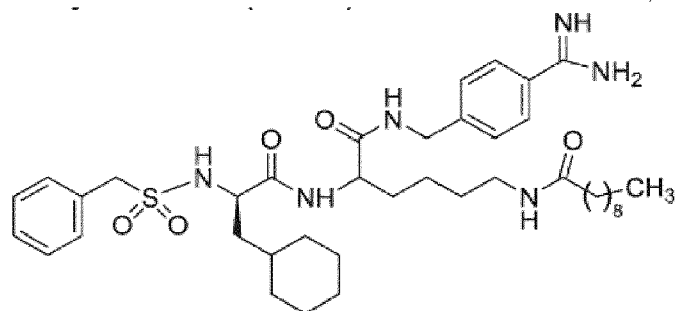
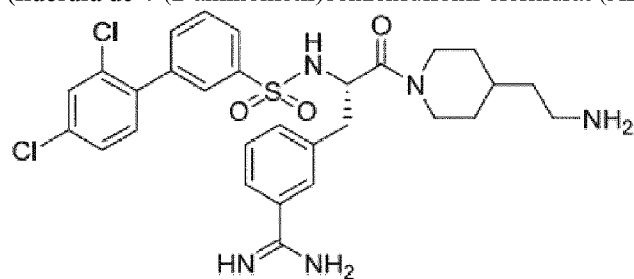
(nafamostat mesilat);



(bromhexină clorhidrat (BHH));

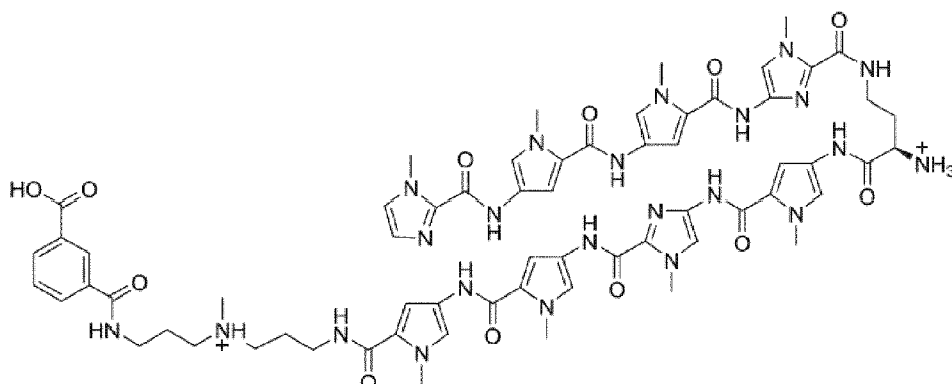


(fluorură de 4-(2-aminometil)benzensulfonil clorhidrat (AEBSF));



10

sau



(poliamidă). Vezi Shen ș.a. Biochimie 142: 1-10 (2017).

Opțional, medicamentul antiviral este un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se leagă în mod specific de virusul gripal, *de ex.*, gripă HA. De exemplu, anticorpul anti-HA poate fi oricare dintre H1H14611N2; H1H14612N2; H1H11723P; H1H11729P; H1H11820N; H1H11829N; H1H11829N2; H2aM11829N; H2M11830N; H1H11830N2; H1H11903N; H1H14571N; H2a14571N ; H1H11704P; H1H11711P; H1H11714P; H1H11717P; H1H11724P; H1H11727P; H1H11730P2; H1H11731P2; H1H11734P2; H1H11736P2; H1H11742P2; H1H11744P2; H1H11745P2; H1H11747P2; H1H11748P2; H1H17952B; H1H17953B; H1H17954B; H1H17955B; H1H17956B; H1H17957B; H1H17958B; H1H17959B; H1H17960B; H1H17961B; H1H17962B; H1H17963B; H1H17964B; H1H17965B; H1H17966B; H1H17967B; H1H17968B; H1H17969B; H1H17970B; H1H17971B; H1H17972B; H1H17973B; H1H17974B; H1H17975B; H1H17976B; H1H17977B; H1H17978B; H1H17979B; H1H17980B; H1H17981B; H1H17982B; H1H17983B; H1H17984B; H1H17985B; H1H17986B; H1H17987B; H1H17988B; H1H17989B; H1H17990B; H1H17991B; H1H17992B; H1H17993B; H1H17994B; H1H17995B; H1H17996B; H1H17997B; H1H17998B; H1H17999B; H1H18000B; H1H18001B; H1H18002B; H1H18003B; H1H18004B; H1H18005B; H1H18006B; H1H18007B; H1H18008B; H1H18009B; H1H18010B; H1H18011B; H1H18012B; H1H18013B; H1H18014B; H1H18015B; H1H18016B; H1H18017B; H1H18018B; H1H18019B; H1H18020B; H1H18021B; H1H18022B; H1H18023B; H1H18024B; H1H18025B; H1H18026B; H1H18027B; H1H18028B; H1H18029B; H1H18030B; H1H18031B; H1H18032B; H1H18033B; H1H18034B; H1H18035B; H1H18037B; H1H18038B; H1H18039B; H1H18040B; H1H18041B; H1H18042B; H1H18043B; H1H18044B; H1H18045B; H1H18046B; H1H18047B; H1H18048B; H1H18049B; H1H18051B; H1H18052B; H1H18053B; H1H18054B; H1H18055B; H1H18056B; H1H18057B; H1H18058B; H1H18059B; H1H18060B; H1H18061B; H1H18062B; H1H18063B; H1H18064B; H1H18065B; H1H18066B; H1H18067B; H1H18068B; H1H18069B; H1H18070B; H1H18071B; H1H18072B; H1H18073B; H1H18074B; H1H18075B; H1H18076B; H1H18077B; H1H18078B; H1H18079B; H1H18080B; H1H18081B; H1H18082B; H1H18083B; H1H18084B; H1H18085B; H1H18086B; H1H18087B; H1H18088B; H1H18089B; H1H18090B; H1H18091B; H1H18092B; H1H18093B; H1H18094B; H1H18095B; H1H18096B; H1H18097B; H1H18098B; H1H18099B; H1H18100B; H1H18101B; H1H18102B; H1H18103B; H1H18104B; H1H18105B; H1H18107B; H1H18108B; H1H18109B; H1H18110B; H1H18111B; H1H18112B; H1H18113B; H1H18114B; H1H18115B; H1H18116B; H1H18117B; H1H18118B; H1H18119B; H1H18120B; H1H18121B; H1H18122B; H1H18123B; H1H18124B; H1H18125B; H1H18126B; H1H18127B; H1H18128B; H1H18129B; H1H18130B; H1H18131B; H1H18132B; H1H18133B; H1H18134B; H1H18135B; H1H18136B; H1H18137B; H1H18138B; H1H18139B; H1H18140B; H1H18141B; H1H18142B; H1H18143B; H1H18144B; H1H18145B; H1H18146B; H1H18147B; H1H18148B; H1H18149B; H1H18150B; H1H18151B; H1H18152B; H1H18153B; H1H18154B; H1H18155B; H1H18156B; H1H18157B; H1H18158B; H1H18159B; H1H18160B; H1H18161B; H1H18162B; H1H18163B; H1H18164B; H1H18165B; H1H18166B; H1H18167B; H1H18168B; H1H18169B; H1H18170B; H1H18171B; H1H18172B; H1H18173B; H1H18174B; H1H18175B; H1H18176B; H1H18177B; H1H18178B; H1H18179B; H1H18180B; H1H18181B; H1H18182B; H1H18183B; H1H18184B; H1H18185B; H1H18186B; H1H18187B; H1H18188B; H1H18189B; H1H18190B; H1H18191B; H1H18192B; H1H18193B; H1H18194B; H1H18195B; H1H18196B; H1H18197B; H1H18198B; H1H18199B; H1H18200B; H1H18201B; H1H18202B; H1H18203B; H1H18204B; H1H18205B; H1H18206B; H1H18207B; H1H18208B; H1H18209B; H1H18210B; H1H18211B; H1H18212B; H1H18213B; H1H18214B; H1H18216B; H1H18217B; H1H18218B; H1H18219B; H1H18220B; H1H18221B; H1H18222B; H1H18223B; H1H18224B; H1H18225B; H1H18226B; H1H18227B; H1H18228B; H1H18229B; H1H18230B; H1H18231B; H1H18232B; H1H18233B; H1H18234B; H1H18235B; H1H18236B; H1H18237B;

- 5 H1H18238B; H1H18239B; H1H18240B; H1H18241B; H1H18242B; H1H18243B; H1H18244B;
H1H18245B; H1H18246B; H1H18247B; H1H18248B; H1H18249B; H1H18250B; H1H18251B;
H1H18252B; H1H18253B; H1H18254B; H1H18255B; H1H18256B; H1H18257B; H1H18258B;
H1H18259B; H1H18261B; H1H18262B; H1H18263B; H1H18264B; H1H18265B; H1H18266B;
10 H1H18267B; H1H18268B; H1H18269B; H1H18270B; H1H18271B; H1H18272B; H1H18274B;
H1H18275B; H1H18276B; H1H18277B; H1H18278B; H1H18279B; H1H18280B; H1H18281B;
H1H18282B; H1H18283B; H1H18284B; H1H18285B; H1H18286B; H1H18287B; H1H18288B;
H1H18289B; H1H18290B; H1H18291B; H1H18292B; H1H18293B; H1H18294B; H1H18295B;
H1H18297B; H1H18298B; H1H18299B; H1H18300B; H1H18301B; H1H18302B; H1H18303B;
15 H1H18304B; H1H18305B; H1H18306B; H1H18307B; H1H18308B; H1H18309B; H1H18310B;
H1H18311B; H1H18312B; H1H18313B; H1H18314B; H1H18315B; H1H18316B; H1H18317B;
H1H18318B; H1H18319B; H1H18320B; H1H18321B; H1H18322B; H1H18323B; H1H18324B;
H1H18325B; H1H18326B; H1H18327B; H1H18328B; H1H18329B; H1H18330B; H1H18331B;
H1H18332B; H1H18333B; H1H18334B; sau H1H18335B; așa cum se prevede în publicația de
brevet internațional nr. WO2016/100807; sau un fragment de legare a antigenului al acestuia, de
exemplu, în care anticorpul sau fragmentul cuprinde un lanț ușor de imunoglobulină care include
CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 (de ex., V_L sau lanțul ușor al acestuia); și un lanț greu care include
CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 (de exemplu, V_H sau lanțul greu al acestuia) al oricăruia dintre
anticorpii anti-gripali HA de mai sus.
- 20 Un alt agent terapeutic poate fi un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se
leagă de proteina gripală HA a Grupului II, cum ar fi, H1H14611N2; sau un anticorp sau fragment
care cuprinde V_H și V_L al H1H14611N2; sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-
H1, CDR-H2 și CDR-H3 al H1H14611N2 (de ex., SECV ID NR. 25-27) și un lanț ușor de
imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 din H1H14611N2 (de ex., SECV ID
25 NR. 29-31). "H1H14611N2" se referă la orice anticorp HA anti-grupa II care cuprinde astfel de
secvențe.

H1H14611N2**Regiune variabilă a lanțului greu**

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSFGFSMNWVRQVPGKGLEWVSSISTSGNYMYADSVKGRTISRDNAAK

SFSLQMNLSLRAEDSAIYYCARGGGYNWNLFQDYWGQGLVTVSS (SECV ID NR: 24)

30

CDR-H1: GFTFSFGFS (ID SECV NR: 25)

CDR-H2: ISTSGNYM (SECV ID NR: 26)

CDR-H3: ARGGGYNWNLFQDY (SECV ID NR: 27)

Regiune variabilă a lanțului ușor

EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSLNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP

DRFSGSGSGTDFTLTITRLESEDAFYCYCQQYGNISPLTFGGGTKVEIK (SECV ID NR: 28)

35

CDR-L1: QSLNSNY (ID SECV NR: 29)

CDR-L2: GAZ (SECV ID NR: 30)

CDR-L3: QQYGNISPLT (ID SECV NR: 31)

40

- Un alt agent terapeutic poate fi un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se
leagă de proteina HA din Grupa II gripală, cum ar fi, H1 H14612N2; sau un anticorp sau fragment
care cuprinde V_H și V_L al H1H14612N2; sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-
H1, CDR-H2 și CDR-H3 din H1H14612N2 (de ex., SECV ID NR: 41-43) și un lanț ușor de
45 imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 al H1H14612N2 (de ex., SECV ID
NR. 45-47). "H1H14612N2" se referă la orice anticorp HA anti-grupa II care cuprinde astfel de
secvențe.

H1H14612N2**Regiune variabilă a lanțului greu**

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFSFGFSMNWVRQAPGKGLEWVSSISTSGNYMY

ADSVKGRTISRDNAAKKSFSLQMNLSLRAEDSAIYYCARGGGYNWNLFQDYWGQGLVTVSS (SECV ID NR: 40)

50

CDR-H1: GFSFGFS (SECV ID NR: 41)

CDR-H2: ISTSGNYM (SECV ID NR: 42)

CDR-H3: ARGGGYNWNLFQDY (SECV ID NR: 43)

Regiune variabilă a lanțului ușorEIVLTQSPGTL~~SLSPGERATL~~SCRASQSLNSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGADFTLTISRLESEDAVYYCQQYGN~~SPLT~~FGGGTKVEIK (SECV ID NR: 44)

CDR-L1: QSLNSNY (ID SECV NR: 45)

CDR-L2: GAZ (SECV ID NR: 46)

5 CDR-L3: QQYGN~~SPLT~~ (SECV ID NR: 47)

Un alt agent terapeutic poate fi un anticorp sau un fragment care leagă antigenul care se leagă de proteina HA a grupei I gripale, cum ar fi H1H11729P; sau un anticorp sau fragment care cuprinde V_H și V_L al H1H11729P; sau un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde CDR-H1, CDR-H2 și CDR-H3 al H1H11729P (*de ex.*, SECV ID NR. 33-35) și un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde CDR-L1, CDR-L2 și CDR-L3 al H1H11729P (*de ex.*, SECV ID NR. 37-39). "H1H11729P" se referă la orice anticorp anti-grupa I HA care cuprinde astfel de secvențe.

H1H11729P15 **Regiune variabilă a lanțului greu**

QVQLVQSGAEVKKSGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGLEWMGGIIPIFGTPSY

AQKFQDRVTITTDSTVYME~~LSLRSEDAVYYCARQQPVYQYNMDVWGQGT~~TVTVSS (SECV ID NR: 32)

CDR-H1: GGTFSSYA (SECV ID NR: 33)

CDR-H2: IPIFGTP (SECV ID NR: 34)

CDR-H3: ARQQPVYQYNMDV (SECV ID NR: 35)

20 **Regiune variabilă a lanțului ușor**

DIQMTQSPFSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNNLGWYQQKPLKAPKRLIYAASSLQSGVPS

RFSGSGSGTEFTLTIS~~SLQPEDFATYYCLQYNNYPWT~~FGGQTKVEIK (SECV ID NR: 36)

CDR-L1: QGIRNN (SECV ID NR: 37)

CDR-L2: AAS (ID SECV NR: 38)

CDR-L3: LQYNNYPWT (SECV ID NR: 39)

25

Opțional, agentul terapeutic suplimentar nu este amantadina, rimantadina, oseltamivirul, zanamivirul, aprotinina, leupeptina, un steroid cationic antimicrobian, un vaccin antigripal (*de ex.*, ucis, viu, vaccin integral sau subunitate atenuat), sau un anticorp împotriva virusului gripal (*de ex.*, un anticorp anti-hemagglutinină).

30 Termenul "în asociere cu" indică faptul că componentele, o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpul sau fragmentul acestuia care leagă antigenul conform prezentei invenții, împreună cu un alt agent, cum ar fi, oseltamivir, se pot formula într-o singură compoziție, *de ex.*, pentru livrare simultană, sau pot fi formulate separat în două sau mai multe compoziții (*de ex.*, un kit). Fiecare componentă poate fi administrată unui subiect la un moment diferit față de

35 momentul de administrare al celeilalte componente; de exemplu, fiecare administrare poate fi dată non-simultan (*de ex.*, separat sau secvențial) la intervale pe o anumită perioadă de timp. Mai mult, componentele separate pot fi administrate unui subiect pe aceeași cale sau pe o cale diferită (*de ex.*, în care un anticorp anti-TMPRSS2 sau un fragment de legare a antigenului acestuia.

Kituri

40 În plus, sunt furnizate kituri care conțin una sau mai multe componente care includ, dar nu se limitează la, o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, un anticorp sau un fragment de legare la antigen așa cum s-a discutat aici (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), în asociere cu una sau mai multe componente suplimentare care includ, dar fără a se limita la, un alt agent terapeutic, așa cum s-a discutat aici. Proteina care leagă antigenul și/sau agentul terapeutic

45 suplimentar poate fi formulată ca o singură compoziție sau separat în două sau mai multe compoziții, *de ex.*, cu un purtător acceptabil farmaceutic, într-o compoziție farmaceutică. În prezenta invenție, este furnizat un kit care cuprinde o proteină care leagă antigenul conform invenției și un alt agent terapeutic, în care kitul cuprinde proteina care leagă antigenul și agentul terapeutic suplimentar formulat ca o singură compoziție, sau separat în două sau mai multe

50 compoziții.

Intr-un caz, kitul include o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, un anticorp sau fragment al acestuia care leagă antigenul conform invenției (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), sau o compoziție farmaceutică a acestora într-un singur recipient (*de ex.*, într-un

flacon de sticlă sau material plastic steril) și un alt agent terapeutic într-un alt recipient (*de ex.*, într-o sticlă sterilă sau flacon din material plastic).

Intr-un alt caz, trusa cuprinde o combinație descrisă aici, incluzând o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpul sau fragmentul acestuia care leagă antigenul conform invenției (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), sau compoziția farmaceutică a acestora în combinație cu unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari formulați împreună, opțional, într-o compoziție farmaceutică, într-un singur recipient comun.

Dacă kitul include o compoziție farmaceutică pentru administrare parenterală unui subiect, trusa poate include un dispozitiv (*de ex.*, un dispozitiv de injectare) pentru efectuarea unei astfel de administrări. De exemplu, trusa poate include unul sau mai multe ace hipodermice, sau alte dispozitive de injectare, așa cum s-a discutat anterior, care conțin proteina anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpul sau fragmentul acestuia care leagă antigenul conform prezentei invenției (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N).

Kitul poate include un prospect care include informații despre compozițiile farmaceutice și formele de dozare din kit. În general, astfel de informații ajută pacienții și medicii să utilizeze compozițiile farmaceutice închise și formele de dozare în mod eficient și sigur. De exemplu, în prospect pot fi furnizate următoarele informații despre o combinație a invenției: farmacocinetică, farmacodinamică, studii clinice, parametri de eficacitate, indicații și utilizare, contraindicații, avertismente, precauții, reacții adverse, supradozaj, dozare și administrare adecvate, cum sunt furnizate, condiții adecvate de depozitare, referințe, informații despre producător/distribuitor și informații despre brevet.

Utilizări pentru diagnosticare ale anticorpilor

Proteinele anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi sau fragmente ale acestora care leagă antigenul conform prezentei invenției (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N), pot fi utilizate pentru a detecta și/sau măsura TMPRSS2 într-o probă. Testele exemplificative pentru TMPRSS2 pot include, *de ex.*, contactarea unei probe cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform invenției, în care proteina anti-TMPRSS2 care leagă antigenul este marcată cu o etichetă detectabilă, sau o moleculă reporter, sau este utilizată ca ligand de captare pentru a izola selectiv TMPRSS2 din probe. Prezența unei proteine anti-TMPRSS2 care leagă antigenul complexată cu TMPRSS2 indică prezența TMPRSS2 în probă. Alternativ, un anticorp anti-TMPRSS2 nemarcat poate fi utilizat în combinație cu un anticorp secundar care este el însuși marcat detectabil. Eticheta detectabilă sau molecula reporter poate fi un radioizotop, cum ar fi ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , sau ^{125}I ; o porțiune fluorescentă sau chemiluminiscentă, cum ar fi, fluorescein izotiocianatul sau rodamina; sau o enzimă, cum ar fi, fosfataza alcalină, β -galactozidaza, peroxidaza de hrean, sau luciferaza. Testele exemplificative specifice care pot fi utilizate pentru a detecta sau măsura TMPRSS2 într-o probă includ testul imunosorbent legat de enzime (ELISA), testul radioimuno (RIA) și sortarea celulelor activate de fluorescență (FACS). Astfel, este descrisă aici o metodă pentru detectarea prezenței polipeptidei TMPRSS2 într-o probă care cuprinde contactarea probei cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul și detectarea prezenței unei proteine care leagă antigenul TMPRSS/anti-TMPRSS2 în care prezența complexului indică prezența TMPRSS2.

Prezența dezvoltării include metode ELISA pe bază de celule care utilizează proteinele anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, *de ex.*, anticorpi și fragmente ale acestora care leagă antigenul conform prezentei invenției (*de ex.*, H1H7017N), pentru a detecta prezența TMPRSS2 pe o celulă. Opțional, metoda include etapele:

(i) contactarea celulelor imobilizate pe o suprafață solidă (*de ex.*, o microplacă) care urmează să fie testate pentru prezența TMPRSS2 cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform prezentei invenției;

(ii) opțional, spălarea amestecului pentru a îndepărta proteina anti-TMPRSS2 care nu se leagă la antigen;

(iii) contactarea proteinei anti-TMPRSS2 care leagă antigenul cu un anticorp secundar marcat, sau un fragment de legare a antigenului al acestuia care se leagă de proteina anti-TMPRSS2 care leagă antigenul;

(iv) opțional, spălarea complexului pentru a îndepărta proteina care nu se leagă la antigen;

și
(v) detectarea prezenței etichetei pe anticorpul secundar sau fragment, în care detectarea etichetei indică faptul că celulele conțin TMPRSS2. De exemplu, prezența dezvoltării include astfel de metode ELISA bazate pe celule pentru identificarea celulelor TMPRSS2⁺ dintr-o probă.

O proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform invenției (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N) poate fi utilizată într-o procedură Western blot sau imunoterapie proteică pentru

detectarea prezenței TMPRSS2 sau a unui fragment al acestuia într-o probă. O astfel de procedură face parte din prezenta dezvoltare și include *de ex.*, etapele:

- (1) furnizarea unei membrane sau a unui alt substrat solid care cuprinde o probă care urmează să fie testată pentru prezența TMPRSS2, *de ex.*, opțional, inclusiv etapa de transfer a proteinelor dintr-o probă care urmează să fie testată pentru prezența TMPRSS2 (*de ex.*, dintr-o separare electroforetică PAGE, sau SDS-PAGE a proteinelor din probă) pe o membrană, sau pe alt substrat solid utilizând o metodă cunoscută în domeniu (*de ex.*, ștergere semi-uscă sau ștergere a godeului); și contactarea membranei sau a altui substrat solid care urmează a fi testat pentru prezența TMPRSS2 sau a unui fragment al acestuia cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform invenției.

O astfel de membrană poate avea forma, de exemplu, unei membrane de nitroceluloză sau pe bază de vinil (*de ex.*, membrană de fluorură de poliviniliden (PVDF)) pe care au fost transferate proteinele care urmează să fie testate pentru prezența TMPRSS2 într-un gel PAGE nedegradat (electroforeză cu gel poliacrilamidă) sau gel SDS-PAGE (electroforeză cu gel dodecil sulfat de poliacrilamidă) care a fost transferat (*de ex.*, după separarea electroforetică în gel). Înainte de a contacta membrana cu proteina anti-TMPRSS2 care leagă antigenul, membrana este, opțional, blocată, de exemplu, cu lapte uscat fără grăsimi sau altele asemenea, astfel încât să se lege situsuri de legare nespecifice ale proteinelor pe membrană.

- (2) spălarea membranei o dată sau de mai multe ori pentru a îndepărta proteina anti-TMPRSS2 care leagă antigenul și alte substanțe nelegate; și

(3) detectarea proteinei anti-TMPRSS2 care leagă antigenul.

Detectarea proteinei care leagă antigenul indică faptul că proteina TMPRSS2 este prezentă pe membrană sau substrat și în probă. Detectarea proteinei care leagă antigenul legat poate fi prin legarea proteinei care leagă antigenul cu un anticorp secundar (un anticorp anti-imunoglobulină) care este marcat detectabil și, apoi, prin detectarea prezenței etichetei anticorpului secundar.

Proteinele anti-TMPRSS2 care leagă antigenul (*de ex.*, anticorpi și fragmente care leagă antigenul (*de ex.*, H1H7017N sau H4H7017N)) dezvoltate aici pot fi, de asemenea, utilizate pentru imunohistochimie. O astfel de metodă face parte din prezenta dezvoltare și cuprinde, *de ex.*,

- (1) contactarea țesutului care urmează să fie testat pentru prezența proteinei TMPRSS2 cu o proteină anti-TMPRSS2 care leagă antigenul conform invenției; și

(2) detectarea proteinei care leagă antigenul pe sau în țesut.

Dacă proteina care leagă antigenul în sine este marcată detectabil, ea poate fi detectată direct. Alternativ, proteina care leagă antigenul poate fi legată de un anticorp secundar marcat detectabil în care este apoi detectată eticheta.

35 **EXEMPLE**

Următoarele exemple sunt prezentate astfel încât să ofere persoanelor de specialitate în domeniu o dezvoltare completă și o descriere a modului de realizare și utilizare a metodelor și compozițiilor invenției și nu sunt destinate să limiteze domeniul avut în vedere de inventatori pentru invenția lui. S-au depus eforturi pentru a asigura precizia cu privire la numerele utilizate (*de ex.*, cantități, temperatură, *etc.*), dar ar trebui luate în considerare unele erori experimentale și abateri. Cu excepția cazului în care se indică altfel, părțile sunt părți în greutate, greutatea moleculară este greutatea moleculară medie, temperatura este în grade Celsius, temperatura camerei este de aproximativ 25°C și presiunea este la, sau aproape atmosferică.

Exemplul 1: Replicare multiciclu *in vitro*.

45 A fost evaluată capacitatea virusului gripal, A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)-GFP, de a se replica în celulele Calu3, A549, MDCK și HepG2.

Tabelul 1. Reactivi utilizați.

Descriere	Vânzător
Celule Calu-3	American Type Culture Collection (ATCC)
Celule A549	American Type Culture Collection (ATCC)
Celulele MDCK (Londra)	IRR
Celulele HepG2	American Type Culture Collection (ATCC)
A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)-GFP	N/A
DMEM	Gibco
F12	Gibco
Pen/Strep	Gibco

Descriere	Vânzător
IgG BSA scăzută	Sigma
PBS	Life Technologies
Ser fetal bovin	Life Technologies

Procedura experimentală

5 Celulele Calu-3 (ATCC HTB55), celulele A549 (ATCC CCL-185), celulele MDCK (IRR FR-58) și celulele HepG2 (ATCC HB-8065) au fost diluate la 40.000 celule/godeu într-o placă cu 96 de godeuri în mediu DMEM:F12 cu 5% FBS. A doua zi, a fost preparat A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) purtând o genă reporter *GFP* din segmentul NS B. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Jun 22;107(25): 11531-6) la un MOI (multiplicitate de infecție) de 0,1 și 0,01 în DMEM:F12 cu IgG BSA scăzută după trei spălări. Virusul a fost incubat pe celule timp de 1 oră la 37°C, după care virusul a fost îndepărtat și godeurile s-au spălat de încă trei ori. Numărul de celule infectate a fost cuantificat la 24, 48, 72 și 142 h după infecție pe un analizor universal CTL-ImmunoSpot® S6 (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH).

Rezumatul rezultatelor și concluziile

15 Calu-3 este o linie celulară epitelială a căilor respiratorii umane imortalizată care s-a dovedit a permite replicarea pe mai multe cicluri a virusurilor gripale umane în absența tripsinei exogene (Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology. 81, 12439-12449 (2007)). În plus, s-a demonstrat că celulele Calu-3 exprimă atât TMPRSS2, cât și TMPRSS4, dar nu TMPRSS11D (HAT) cel puțin la nivelul mRNA (Bottcher-Friebertshauser ș.a., Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011)). Pentru a confirma că celulele Calu-3 pot sprijini activarea proteolitică a virusului gripal care posedă hemagglutinină cu un loc de scindare monobazic, creșterea unui virus reporter H1N1 GFP în celulele Calu-3 a fost analizată și s-a comparat replicarea în timp cu A549 (epitelial bazal alveolar uman) a celulelor MDCK (rinichi canin Madin Darby) și celulelor HepG2 (carcinom hepatic uman) în absența tripsinei. Celulele au fost infectate la un MOI scăzut și, la momentul indicat, au fost determinate titrurile virale prin numărarea punctelor de focar fluorescente. Tabelul 2 și Figura 1 arată niveluri scăzute de infecție în celulele A549, MDCK și HepG2, în timp ce celulele Calu-3 prezintă titruri crescute semnificativ la fiecare punct de timp. Deși s-a demonstrat că celulele Calu-3 exprimă TMPRSS2 și TMPRSS4 la nivelul mRNA, colapsarea TMPRSS2 a redus titrurile virusului gripal de 100 până la 1.000 de ori (Bottcher-Friebertshauser ș.a., Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011)). Nivelul scăzut de titruri virale în celulele A549, MDCK și HepG2 în absența tripsinei se datorează probabil adăugării de virus scindat (recoltat din ouă de pui embrionate, sau din cultura MDCK cu tripsină), dar prezenței unei alte proteaze care activează HA ar putea fi o explicație.

Tabelul 2. Numărul de celule infectate reprezentate de unități de focalizare fluorescente (FFU) în diferite zile după infecție cu un MOI de 0,1 sau 0,01 în diferite tipuri de celule după infecția cu A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)-GFP.

Linie celulară	Ziua(zile) post-infecție	MOI 0,1	MOI 0,01
		FFU	FFU
Calu3	1	697	54
	2	1167	201
	3	1644	376
	4	1530	500
A549	1	238	35
	2	238	46
	3	258	53
	4	228	52

Linie celulara	Ziua(zile) post-infecție	MOI 0,1	MOI 0,01
		FFU	FFU
MDCK	1	740	77
	2	750	60
	3	879	58
	4	796	53
HepG2	1	3	1
	2	14	9
	3	20	13
	4	21	20

Referinte

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. Journal of Virology. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. PLoS ONE. 12, e0179177 (2017). PMID: 27733646.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. Antiviral Research. 116, 76-84 (2015). PMID:25666761.
4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. PLoS ONE. 10, e0138380 (2015). PMID:26379044.
5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. PLoS ONE. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.
6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.
7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. Journal of Virology. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. Journal of Virology (2014), May;88(9):4744-51.doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. Journal of Virology. 2006 Oct;80(19):9896-8. PMID: 16973594.
10. B. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Jun 22; 107(25): 11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. PMID: 20534532 .
11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

Exemplul 2: Anticorpul anti-TMPRSS2 H1H7017N blochează *in vitro* răspândirea gripei.

A fost evaluată capacitatea diferiților anticorpi de a reduce titrurile virusului gripal A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) în celulele Calu-3.

Tabelul 3. Reactivi utilizați.

Descriere	Vânzător
Celule Calu-3	ATCC
F12	Gibco
FBS	Life Technologies

Descriere	Vânzător
A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)	ATCC
DMEM	Gibco
Pen/Strep	Gibco
IgG BSA scăzută	Sigma
PBS	Life Technologies
Paraformaldehidă (16% g/v aq.)	Alfa Aesar
Triton X-100	EMD
Anticorp anti-NP Anticorp anti-gripal A, nucleoproteină, clone A1, amestec A3	Millipore
Conjugat IgG AF488 de capră anti-șoarece	Life Technologies

Procedura experimentală

5 Celulele Calu-3 (ATCC HTB55) au fost diluate la 40.000 celule/godeu într-o placă cu 96 de godeuri în mediu DMEM:F12 cu 5% FBS. A doua zi, anticorpii monoclonali au fost diluați la 166,7 nM în DMEM: F12 cu IgG BSA scăzut și s-au adăugat la celule timp de 3 ore la 37°C și 5% CO₂. Soluția de mAb a fost îndepărtată și celulele au fost infectate cu A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) la un MOI de 0,001. Virusul a fost incubat pe celule timp de 1 oră la 37°C în 5% CO₂ după care virusul a fost îndepărtat și mediul înlocuit cu DMEM:F12 care conține 166,7 nM mAbs. După 24 h și 48 h, mediul a fost înlocuit cu mediu proaspăt care conține mAb și celulele au fost spălate de două ori cu PBS la 72 h. Celulele au fost apoi fixate cu paraformaldehidă 4% în PBS și virusul a fost detectat folosind anticorpul primar anti-NP la o diluție 1:1000. Celulele au fost incubate timp de 1 h și apoi spălate și s-a adăugat soluția secundară la diluția 1:2000. Numărul de celule infectate a fost cuantificat pe un analizor universal CTL-ImmunoSpot® S6 (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH).

Rezumatul rezultatelor și concluziile

15 Calu-3 este o linie celulară epitelială a căilor respiratorii umane imortalizată, care s-a dovedit a permite replicarea multiciclică a virusurilor gripale umane în absența tripsinei exogene (Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology. 2007 Nov;81 (22): 12439-49). În plus, s-a demonstrat că celulele Calu-3 exprimă atât TMPRSS2, cât și TMPRSS4, dar nu TMPRSS11D (HAT) cel puțin la nivelul mRNA (Bottcher-Friebertshauser ș.a., Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011)). S-a demonstrat anterior că celulele Calu-3 au susținut activarea proteolitică a virusului gripal, dar aici s-a testat inhibarea TMPRSS2 utilizând anticorpul monoclonal specific TMPRSS2, H1H7017N. A fost analizată creșterea A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) peste 72 h după tratarea celulelor cu 166,7 nM de H1H7017N. Titrurile virale au fost determinate prin numărarea punctelor de focalizare fluorescente. Tabelul 4 și Figura 2 arată titruri scăzute după tratamentul cu anticorpul H1H7017N. Deși s-a demonstrat că celulele Calu-3 exprimă *TMPRSS2* și *TMPRSS4* la nivelul mRNA, coksul *TMPRSS2* a redus titrurile virusului gripal de 100 până la 1.000 de ori (Bottcher-Friebertshauser ș.a., Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011)). Nivelul scăzut al titrurilor virale existente în absența mAb s-a datorat probabil adăugării de virus scindat (recolat din ouă de pui embrionate sau din cultura MDCK cu tripsină), dar prezența unei alte proteaze care activează HA ar putea explica, de asemenea, prezența de virus în ciuda tratamentului cu anti-TMPRSS2 mAb.

Tabelul 4. Aplicarea H1H7017N în timpul ciclului de infecție scade numărul de unități de focalizare fluorescente (FFU) din A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1) la 72 h după infecție.

Tratament	Descriere	FFU
H1H7017N	Anti-TMPRSS2 mAb	259
H1H11729P	Grup 1 anti-gripal A martor pozitiv	18

Tratament	Descriere	FFU
anti-hlgG4 cu o IgG2a Fc de soarece	Martor izotip IgG1	2338
Fără mAb	Martorulinfecției	2656
Neinfestat	Martor al liniei de bază	6

Referințe

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *Journal of Virology*. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
- 5 2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE*. 12, e0179177 (2017). PMID: 27733646.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*. 116, 76-84 (2015). PMID:25666761.
- 10 4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. *PLoS ONE*. 10, e0138380 (2015). PMID:26379044.
5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. *PLoS ONE*. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.
- 15 6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *Journal of Virology*. 85, 1554-1562 (2011).). PMID: 21123387.
7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of Virology*. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
- 20 8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *Journal of Virology* (2014), May;88(9):4744-51.doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*. 2006 Oct;80(19):9896-8. PMID: 16973594.
- 25 10. B. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jun 22; 107(25): 11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. PMID: 20534532 .
- 30 11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *Journal of Virology*. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

Exemplul 3: Analiza FACS cu celule MDCK/Tet-on, MDCK/Tet-on/hTMPRSS2 și MDCK/Tet-on/MfTMPRSS2.

- 35 A fost evaluată capacitatea anticorpului anti-TMPRSS2, H1H7017N, de a se lega de celulele MDCK care exprimă TMPRSS2, sau care nu exprimă TMPRSS2.

Tabelul 5. Reactivi utilizați.

Reactiv	Sursă
MDCK	ATCC
pLVX-EF1α-Tet3G	Clontech
pLVX Tight hTMPRSS2 Puro	
pLVX Tight MfTMPRSS2 Puro	
DMEM	Irvine Scientific
FBS	Seradigm
Pen/strep/glut	Invitrogen
Piruvat de sodiu 100mM (100X)	Specialty Media
Antibiotic selectiv Geneticin™ (G418 sulfat)	Invitrogen
Puromicină	Sigma

Reactiv	Sursă
Doxiciclină	Sigma
PBS fără $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$	Irvine Scientific
Accutază	Millipore
Plăci filtrante 96- godeuri	Pall
BD CytoFix TM	Becton Dickinson
Aloficocianină (APC) AffiniPure F(ab') ₂ Fragment IgG anti-uman de capră, fragment specific Fc γ	Jackson Immuno
Martor mAb1 (martor izotip hlgG1)	
Citoflex	Beckman Coulter
FlowJo 10.1r5	FlowJo
Prisma 7	Graphpad

Procedura experimentală

Liniile celulare au fost dezvoltate pentru a exprima TMPRSS2 (hTMPRSS2 și mTMPRSS2) umane și de maimuță cynomolgous în celulele MDCK (rinichi canin Madin Darby) la inducerea cu doxiciclină. Celulele MDCK au fost transduse pentru a exprima stabil o proteină transactivatoare controlată de tetraciclină modificată (Clontech) și linia celulară rezultată a fost denumită linia celulară MDCK/Tet-on. Linia celulară MDCK/Tet-on a fost transdusă cu un construct care conține hTMPRSS2 (NP_005647.3 cu un V160M) sau mTMPRSS2 (Ref seq XP_015302311.1 cu S129L, N251S, I415V, R431Q, D492G) sub controlul promotorului inducibil și liniile au fost denumite MDCK/Tet-on/hTMPRSS2 și MDCK/Tet-on/mTMPRSS2. Liniile celulare stabile au fost menținute în medii de creștere care conțin DMEM suplimentate cu 10% FBS, piruvat de sodiu, penicilină/streptomycină/glutamină, 500μg/mL G418 cu sau fără 2μg/mL puromicină.

Pentru analiza legării celulelor prin citometrie în flux, celulele au fost placcate în mediu de creștere și incubate cu doxiciclină la 1μg/mL timp de 16 ore pentru a induce expresia TMPRSS2. Celulele sunt detașate folosind Accutase și resuspendate în 1% FBS în PBS. Anticorpii au fost diluați în serie de la 500 nM la 25 pM și fiecare concentrație de anticorp a fost incubată cu 1×10^6 celule la 4°C timp de 30 de minute. A fost inclusă o afecțiune în care nu s-a adăugat anticorp la celule. După incubare cu anticorpi primari, celulele au fost colorate cu anticorp secundar IgG anti-uman conjugat cu aloficocianină la 1:1000 la 4 ° C timp de 30 de minute. Celulele au fost fixate folosind BD CytoFixTM și analizate folosind citometrul de flux CytoFLEX. S-au inclus, de asemenea, doar anticorpi necolorați și secundari martoripentru toate liniile celulare. Valorile medii geometrice ale fluorescenței pentru celulele viabile s-au determinat utilizând software-ul FlowJo și rezultatele au fost analizate folosind regresia neliniară (logistică cu 4 parametri) cu software-ul Prism 7 (GraphPad) pentru a obține valorile EC₅₀ ale legării celulare de către anticorpi.

Așa cum se arată în Figura 3, anticorpii anti-hTMPRSS2 al invenției, H1H7017N, s-a legat de MDCK/Tet-on/hTMPRSS2 și MDCK/Tet-on/mTMPRSS2 cu valori EC₅₀ de 460 pM și respectiv 1,06 nM. H1H7017N nu a prezentat legare semnificativă la celulele MDCK/Tet-on. Martorul mAb1, un anticorp martor al izotipului irelevant, nu a arătat legarea la niciuna dintre liniile celulare testate.

Exemplul 4: Cinetica legării biacore a anticorpilor monoclonali anti-TMPRSS2 care se leagă la diferiți reactivi TMPRSS2 măsurată la 25°C și 37°C.

Constanta de disociere la echilibru (K_D) pentru diferiți reactivi TMPRSS2 care se leagă de anticorpii monoclonali anti-TMPRSS2 purificați s-a determinat utilizând un biosenzor Biacore 4000 pe bază de rezonanță plasmonică de suprafață în timp real. Toate studiile de legare au fost efectuate în 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA și 0,05% v/v Surfactant Tween-20, pH 7,4 (HBS-ET) care rulează tampon la 25°C și 37°C. Suprafața cipului senzorului Biacore CM5 a fost mai întâi derivatizată prin cuplarea aminei cu anticorpii policlonali specifici Fc iepure anti-soarece (GE Healthcare Cat#BR100838) pentru a captura anticorpii monoclonali anti-TMPRSS2. Studiile de legare au fost efectuate pe domeniul extracelular TMPRSS2 umană exprimat cu o etichetă C-terminală myc-myc-hexahistidină (hTMPRSS2.mmh) și cu un domeniu extracelular de maimuță TMPRSS2 exprimat cu o etichetă C-terminală myc-myc-hexahistidină (mTMPRSS2.mmh). Au fost mai întâi preparate diferite concentrații de HMM-hTMPRSS2 și HMM-mTMPRSS2 (100nM - 6,25nM; diluție în serie de 4 ori) în tampon de rulare HBS-ET și au

- 5 fost injectate pe suprafața anticorpului monoclonal anti-TMPRSS2 capturat Fc anti-șoarece timp de 2,5 minute la un debit de 30 $\mu\text{L}/\text{minut}$, în timp ce disocierea reactivului TMPRSS2 legat de anticorpul monoclonal a fost monitorizată timp de 7 minute în tampon de rulare HBS-ET. Rata de asociere (k_a) și rata de disociere (k_d) au fost determinate prin montarea senzorgamelor de legare în timp real la un model de legare 1:1 cu limitare a transportului de masă utilizând software-ul Scrubber 2.0c curbă-fixare. Constanta de disociere la echilibru (K_D) și timpul de înjumătățire plasmatică disociativă ($t_{1/2}$) au fost calculate din ratele cinetice ca:

$$K_D \text{ (M)} = \frac{k_d}{k_a}, \text{ și } t_{1/2} \text{ (min)} = \frac{\ln(2)}{60 * k_d}$$

- 10 Parametrii cinetici de legare pentru legarea HMM-hTMPRSS2 sau HMM-mfTMPRSS2 la diferiți anticorpi monoclonali anti-TMPRSS2 conform invenției la 25°C și 37°C sunt prezentați în Tabelele 6-9.

- 15 La 25°C, anticorpii monoclonali anti-TMPRSS2 s-au legat de HMM-hTMPRSS2 cu valoarea K_D 2,81 nM, așa cum se prezintă în Tabelul 6. La 37°C, anticorpii monoclonali anti-HMM-hTMPRSS2 s-au legat de HMM-hTMPRSS2 cu valoarea K_D 9,31 nM, așa cum se prezintă în Tabelul 7.

- 20 La 25°C, anticorpii monoclonali anti-TMPRSS2 s-au legat de HMM-mfTMPRSS2 cu valoarea K_D 56,0 nM, așa cum se prezintă în Tabelul 8. La 37°C, anticorpii monoclonali anti-TMPRSS2 s-au legat de HMM-mfTMPRSS2 cu valoarea K_D 140nM, așa cum se prezintă în Tabelul 9.

20 **Proteine TMPRSS2**

hTMPRSS2 knob_mmh (W106-R255).mmh:

aminoacizi 1-150: aminoacizi 106 până la 255 ai TMPRSS2 umană (număr de acces NP_005647.3 cu un V160M)

Aminoacizi: 151-178: eticheta myc-myc-hexahistidină

WKFMGSKCSNSGIECDSSGTCINPSNWCDGVSHCPGGEDENRCVRLYGPNFILQMYSSQKRSWHPVCQDDWNENYGR

AACRDMGYKNNFYSSQGIVDDSGSTSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDACSSKAVVSLRCIACGVNLNSSRQSR**EQKL**

25 ISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH

(SECV ID NR: 20; etichete myc subliniate, eticheta His6 subliniată dublu)

mfTMPRSS2 knob_mmh (W106-R255).mmh:

30 Aminoacizi 1-150: aminoacizi 106-255 ai TMPRSS2 de maimuță (număr de acces XP_005548700.1 cu S129L, N251S)

Aminoacizi 151-178: eticheta myc-myc-hexahistidină

WKFMGSKCSDSGIECDSSGTCISLSNWCDGVSHCPNGEDENRCVRLYGPNFILQVYSSQKRSWHPVCRDDWNENYAR

AACRDMGYKNSFYSSQGIVDNGATSFMKLNTSAGNVDIYKKLYHSDACSSKAVVSLRCIACGVRNLSRQSR**EQKL**

ISEEDLGGEQKLISEEDLHHHHHH

(SECV ID NR: 21; etichete myc subliniate, eticheta His6 subliniată dublu)

Rezultate

- 35 **Tabelul 6. Parametrii cinetici de legare a legării HMM-hTMPRSS2 la anticorpii monoclonali TMPRSS2 la 25°C.**

mAb Capturat	Nivel de captură mAb (RU)	100nM Ag legat(RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t?$ (min)
H2aM7017N	510 $\pm$ 5,3	103	2,65E+05	7,45E-04	2,81 E-09	15,5

* H2aM7017N este un anticorp cu domeniile variabile H1H7017N prezentate aici și un IgG2a Fc de șoarece.

Tabelul 7. Parametrii cinetici de legare a legării HMM-hTMPRSS2 la anticorpii monoclonali TMPRSS2 la 37°C.

mAb Capturat	Nivel de captură mAb (RU)	100nM Ag legat (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t?$ (min)
H2aM7017N	587 $\pm$ 4,5	117	3,47E+05	3,23E-03	9,31E-09	3,6

- 40 **Tabelul 8. Parametrii cinetici de legare a legării HMM-mfTMPRSS2 la anticorpii monoclonali TMPRSS2 la 25°C.**

mAb Capturat	Nivel de captură (RU)	de 100nM mAb legat (RU)	Ag	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t?$ (min)
H2aM7017N	484 ± 1,8	67		2,80E + 05	1,57E-02	5,60E-08	0,7

Tabelul 9. Parametrii cinetici de legare a legării HMM-mfTMPRSS2 la anticorpii monoclonali MSR1 la 37°C.

mAb Capturat	Nivel de captură (RU)	de 100nM mAb legat (RU)	Ag	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t?$ (min)
H2aM7017N	569 ± 1,6	48		3,66E + 05	5,12E-02	1,40E-07	0,2

Exemplul 5: Răspândirea gripală *in vitro* a tulpinilor gripale H1, H3 și FluB.

- 5 În acest exemplu, a fost determinată capacitatea diferitelor tipuri de gripă de a se răspândi într-o cultură *in vitro* de celule Calu-3 și efectul anticorpilor anti-TMPRSS2 asupra acestei răspândiri.

Tabelul 10. Reactivi utilizați și numere de lot.

Cat#	Descriere	Vânzător
HTB55	Celule Calu-3	ATCC (American Type Culture Collection)
11995-073	DMEM	Gibco
211703	F12	Gibco
15140-122	Pen/Strep	Gibco
A033650ML	IgG BSA scăzută	Sigma
10010-023	PBS	Life Technologies
26140079	Ser fetal bovin	Life Technologies
VR-1469	Gripa A A/Puerto Rico/08/1934 (H1_PR34)	ATCC
NR-13658	H1N1 A/California/04/2009 (H1_CA09)	Resurse BEI
FR-28	Gripa A/Brisbane/59/2007 (H1_Bris)	Influenza Reagent Resource
FR-1068	Gripa A/Hong Kong/38982/2009 (H9N2)	Influenza Reagent Resource
3483	Gripa A A H3N2 Kilbourne F108 A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, Re-asortată X-31	Resurse BEI
NR-41795	Gripa B/Florida/04/2006 (Florida)	ATCC
NR-12280	Gripa B Malaezia (Malaezia)	ATCC
MAB8251	Anticorp anti-gripal A, nucleoproteină, clone A1, amestec A3	Millipore
Ab20711	Anticorpul nucleoproteic al virusului anti-gripal B [B017]	Abcam
A-11001	Anticorp secundar absorbit încrucișat IgG (H+L) de capră, Alexa Fluor 488	ThermoFisher Scientific

Procedura experimentală

- 10 Celulele Calu-3 au fost înșămânțate la 40.000 celule/godeu într-o placă cu 96 de godeuri în mediu DMEM: F12 cu 5% FBS. A doua zi, tulpinile de virus gripal au fost diluate la un MOI determinat anterior (vezi Tabelul 11) și anticorpii au fost diluați la 100 μg/mL. În aceste experimente, anticorpii anti-HA și anti-TMPRSS2 au avut mecanisme de acțiune diferite, prin urmare, procedura experimentală a fost diferită pentru acești anticorpi pentru a-i testa în mod corespunzător. Anticorpii anti-HA au fost pre-incubați cu o tulpină individuală de virus gripal timp de o oră la 37°C într-o placă separată. După perioada de preincubare, amestecul anticorp/virus a
- 15 fost adăugat la celulele Calu-3 timp de o oră. Anticorpul anti-TMPRSS2 a fost preincubat cu

celule Calu-3 neinfectate timp de trei ore la 37°C. După perioada de preincubare, virusul a fost adăugat la celulele Calu-3 preincubate cu anticorpi anti-TMPRSS2 timp de o oră. După infecția de o oră, celulele au fost spălate de trei ori cu PBS și a fost adăugat anticorp proaspăt împreună cu un mediu nou în fiecare godeu. A fost adăugat anticorp suplimentar la 24 și 48 de ore după infecție. La 72 de ore după infecție, celulele au fost colorate cu un anti-NP și cuantificate pe un analizor universal CTL-ImmunoSpot® S6 (Cellular Technology Limited, Cleveland, OH).

Tabelul 11A. Experimentul 1.

Tulpina gripală	MOI final
H1_PR34	0,001
H1_CA09	0,001
H1_Bris	0,001
H9N2	0,01
H3N2	0,001

Tabelul 11B. Experimentul 2.

Tulpina gripală	MOI final
H1_PR34	0,01
Florida	0,01
Malaezia	0,001

Rezumatul rezultatelor și concluziile

- Calu-3 este o linie celulară epitelială a căilor respiratorii umane imortalizată, care s-a dovedit a permite replicarea multiciclică a virusurilor gripale umane în absența tripsinei exogene Zeng ș.a., Journal of Virology 81: 12439-12449 (2007)). În plus, s-a demonstrat că celulele Calu-3 exprimă TMPRSS2 (Botcher-Friebertshäuser ș.a., Journal of Virology 85: 1554-1562 (2011)) ceea ce este esențial pentru aceste experimente, deoarece va fi testat un anticorp anti-TMPRSS2.
- În aceste experimente, a fost examinat sau nu H1H7017N, un anticorp anti-TMPRSS2, care poate preveni răspândirea în diferite tulpini de gripă. În plus, s-a rulat anticorpul anti-HA corespunzător pentru diferite tulpini ca martor pozitiv. Așa cum era de așteptat, a existat o infecție inițială în prezența anticorpului anti-TMPRSS2, dar H1 H7017N a împiedicat cu succes răspândirea infecției cu H1_PR34, H1_CA09, H1_Bris, H9N2 și H3N2. Acest lucru poate fi observat prin examinarea diferențelor în numărul de celule infectate între celulele tratate anti-TMPRSS2 și martorii infectați (Tabelul 12). S-a ajuns la concluzia că anticorpul anti-TMPRSS2 nu a fost capabil să prevină răspândirea în niciuna dintre tulpinile de gripă B, deoarece numărul de celule infectate din godeurile martor și tratate a fost același. În comparație, anticorpii anti-HA au fost pre-incubați cu virusul și au prevenit infecția inițială. Acest lucru poate fi văzut și prin compararea numărului de celule infectate. Numărarea celulelor infectate a fost efectuată pe aparatul CTL și sunt raportate în tabelele de mai jos.

Tabelul 12A. Experimentul 1.

Tulpina gripală	Martor neinfestat	Martor infectat	Celule infectate tratate cu anticorp HA specific grupului	Celulele infectate tratate cu anticorp anti-TMPRSS2 H1H7017N
H1_PR34	10	3847.5	3	1496
H1_CA09	3,5	4645.4	1,5	17
H1_Bris	15,5	3882	0,5	1005
H9N2	4,5	4172	4,5	196,5
H3N2	7,5	3922	9	754,5

Tabelul 12B. Experimentul 2.

Tulpina gripală	Martor neinfestat	Martor infestat	Celule infectate tratate cu anticorp HA specific grupului	Celulele infectate tratate cu anticorp anti-TMPRSS2 H1H7017N
H1_PR34	1	2848	18	60
Florida	4	1339	229	1234
Malaezia	10	1184	758	1451

Referințe

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. Journal of Virology. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
- 5 2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. PLoS ONE. 12, e0179177 (2017). PMID: 28636671.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. Antiviral Research. 116, 76-84 (2015). PMID: 25666761.
- 10 4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. PLoS ONE. 10, e0138380 (2015). PMID: 26379044.
5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. PLoS ONE. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.
- 15 6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.
7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. Journal of Virology. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
- 20 8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. Journal of Virology (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. Journal of Virology. 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594.
- 25 10. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 22 Iunie;107(25):11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 7 Iunie. PMID: 20534532.
- 30 11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

Exemplul 6: Efectul tratamentului doar cu H1H7017N la șoareci umanizați TMPRSS2.

- 35 A fost evaluată capacitatea anticorpilor anti-TMPRSS2 de a proteja șoarecii proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 de infecția cu virusul gripal H1N1.

Tabelul 13. Reactivi utilizați și numere de lot.

Cat#	Descriere	Vânzător
VR-1469	Gripa A A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)	ATCC
20012-043	PBS	Gibco
	Ketamină: Xilazină	

Tabelul 14. IDs clonelor mAb.

AbPID	Descriere
H1H7017N	anti-TMPRSS2 mAb
H1H1238N	IgG1 izotip martor

Aceste experimente au fost efectuate la șoareci masculi și femele de 5-8 săptămâni proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană. Șoarecii au fost provocați cu 150 de unități formatoare de plăci (PFUs) de H1N1. Șoarecii au fost sedați cu 200μL de Ketamină: Xilazină (12 mg/ml:0,5 mg/ml) prin injecție intraperitoneală și apoi infectați cu 20μL de virus intranasal. Anticorpul a fost eliberat fie subcutanat (SC) cu o zi înainte de infectare, fie intravenos (IV) în diferite zile după infectare (PI). Programul de dozare a anticorpilor a variat între experimente (Tabelul 15). Greutățile corporale au fost colectate zilnic până în ziua 14 PI și șoarecii au fost sacrificați când au pierdut 20% din greutatea corporală inițială. Rezultatele sunt raportate ca procent de supraviețuire.

Tabelul 15A. Dozarea anticorpilor (Experiment 1).

Anticorp	Zilele PI	Doza	Livrare
H1H1238N	-1	5 mg/kg	SC
H1H7017N	-1, 0	5 mg/kg	SC, IV

Tabelul 15B. Dozarea anticorpilor (Experimentul 2).

Anticorp	Zilele PI	Doza	Livrare
H1H1238N	0	10 mg/kg	IV
H1H7017N	0, 1, 2, 3	10 mg/kg	IV

Rezumatul rezultatelor și concluziile

S-a demonstrat că șoarecii proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană pot fi infectați cu o doză letală de gripă. Scopul acestor experimente a fost să demonstreze că H1H7017N poate proteja șoarecii proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 împotriva grupeii gripale A 1. Anticorpul a fost testat în modele profilactice și terapeutice. Tratamentul cu H1H7017N a avut ca rezultat o supraviețuire mai mare decât la șoarecii tratați cu izotip martor (H1H1238N) în ambele experimente (Figurile 4 și 5). În experimentul profilactic, supraviețuirea a fost 0% pentru șoarecii tratați cu H1H1238N, 85,7% pentru șoarecii tratați în ziua -1 PI și 100% pentru șoarecii tratați în ziua 0 PI cu H1H7017N. Pentru modelul terapeutic, grupul tratat cu H1H1238N a rezultat o supraviețuire de 25%, în timp ce grupurile tratate cu H1H7017N în ziua 0-3 PI au dus la supraviețuire 100%. Datele sunt rezumate în Tabelul 16. H1H7017N arată eficacitatea la șoareci proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană.

Tabelul 16A. Rezumatul datelor tabelate (Experimentul 1).

ID grup	Număr de șoareci pe grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
H1H1238N, Ziua -1 PI, SC	4	0 (0/4)
H1H7017N, Ziua -1 PI, SC	7	85,7 (6/7)
H1H7017N, Ziua 0 PI, IV	6	100 (6/6)

Tabelul 16B. Rezumatul datelor tabelate (Experimentul 2).

ID grup	Număr de șoareci per grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
H1H1238N, Ziua 0 PI, IV	4	25 (1/4)
H1H7017N, Ziua 0 PI, IV	5	100 (5/5)
H1H7017N, Ziua 1 PI, IV	5	100 (5/5)
H1H7017N, Ziua 2 PI, IV	5	100 (5/5)

ID grup	Număr de șoareci per grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
IV		
H1H7017N, Ziua 3 PI, IV	5	100 (5/5)

Referințe

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *Journal of Virology*. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
- 5 2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE*. 12, e0179177 (2017). PMID: 28636671.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*. 116, 76-84 (2015). PMID: 25666761.
- 10 4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. *PLoS ONE*. 10, e0138380 (2015). PMID: 26379044.
5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. *PLoS ONE*. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.
- 15 6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *Journal of Virology*. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.
7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of Virology*. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
- 20 8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *Journal of Virology* (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*. 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594.
- 25 10. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jun 22; 107(25):11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 Jun 7. PMID: 20534532.
- 30 11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *Journal of Virology*. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

Exemplul 7: Activitatea anti-TMPRSS2 mAb, H1H7017N în modelul de șoarece umanizat TMPRSS2.

- 35 A fost evaluată capacitatea anticorpilor anti-TMPRSS2 de a proteja un șoarece conceput pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 de infecția cu virusul gripal H3N2.

Tabelul 17. IDs clonelor mAb.

AbPID	Descriere
H1H7017N	Anticorp anti-TMPRSS2

Tabelul 18. Reactivi utilizați și numere de lot.

Cat#	Descriere	Vânzător
3483	Gripa A H3N2 Kilbourne F108 A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, Reasortată X-31	BEI Resources
20012-043	PBS	Gibco
	Ketamină:Xilazină	

Procedura experimentală

- 40 Șoarecii masculi și femele de unsprezece săptămâni proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană au fost provocați cu 20.000 de unități formatoare de plăci (PFUs) de H3N2. Șoarecii au fost sedați cu 200μL de Ketamină:Xilazină (12 mg/ml: 0,5 mg/ml) prin injecție

intraperitoneală și apoi infectați cu 20μL de virus intranasal. În ziua 1 sau ziua 2 postinfecție (PI), șoarecii au fost injectați intravenos cu anticorp. Șoarecii au fost cântăriți și observați zilnic până în ziua 14 postinfecție (PI). Au fost sacrificați când au pierdut 25% din greutatea corporală inițială.

Rezumatul rezultatelor și concluziile

- 5 Amploarea este o calitate importantă atunci când se ia în considerare o terapie antigripală. S-a demonstrat deja că anticorpul anti-TMPRSS2 H1H7017N a fost eficient împotriva grupului gripal A 1. Scopul acestui experiment a fost să demonstreze că H1H7017N poate proteja șoarecii proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană împotriva grupului gripal A 2. Șoarecii proiectați pentru a exprima proteinele umane TMPRSS2 au fost infectați cu o doză letală de H3N2 și tratați în ziua 1 sau în ziua 2 PI. Ambele grupuri de tratament au avut rate de supraviețuire mai mari decât martorul infectat. Șoarecii tratați în ziua 1 PI au avut o rată de supraviețuire de 100% care a fost mai mare decât a grupului tratat în ziua 2 PI care a avut o supraviețuire de 50%, în timp ce șoarecii netratați au avut 0% supraviețuire. Toți șoarecii au murit între zilele 5-6 PI. Graficul de supraviețuire este prezentat în Figura 6 și % de supraviețuire este rezumat în Tabelul 19. Aceste rezultate au demonstrat că H1H7017 a îmbunătățit rezultatele într-un model letal H3N2.

Tabelul 19. Rezumatul datelor tabelate.

ID grup	Număr de șoareci per grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
Netratat	5	0 (0/5)
H1H7017N, Ziua 1 PI	5	100 (5/5)
H1H7017N, Ziua 0 PI, IV	4	50 (2/4)

Referințe

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *Journal of Virology*. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
 2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE*. 12, e0179177 (2017). PMID: 28636671.
 3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*. 116, 76-84 (2015). PMID: 25666761.
 4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. *PLoS ONE*. 10, e0138380 (2015). PMID: 26379044.
 5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. *PLoS ONE*. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.
 6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *Journal of Virology*. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.
 7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of Virology*. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
 8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *Journal of Virology* (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
 9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*. 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594.
 10. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 22 Iunie;107(25): 11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 7 Iunie. PMID: 20534532.
 11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *Journal of Virology*. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.
- Exemplul 8: Infecția șoarecilor proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 (versus WT).**
- Supraviețuirea șoarecilor proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană infectată cu virusul gripei H1N1 a fost evaluată și comparată cu cea a șoarecilor de tip sălbatic (WT).

Tabelul 20. Reactivi utilizați și numere de lot.

Cat#	Descriere	Vânzător
VR-1469	Gripa A A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)	ATCC
20012-043	PBS	Gibco
	Ketamină:Xilazină	

Procedura experimentală

Experimentul a fost efectuat la șoareci masculi și femele în vârstă de 7,5-8 săptămâni proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 sau codescendenți de tip sălbatic. Șoarecii au fost provocați cu 150, 750 sau 1.500 de unități formatoare de plăci (PFUs) din A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1). Șoarecii au fost sedați cu 200μL de Ketamină:Xilazină (12 mg/ml; 0,5 mg/ml) prin injecție intraperitoneală și apoi infectați cu 20μL de virus intranasal. Greutățile corporale au fost colectate zilnic până în ziua 14 PI și șoarecii au fost sacrificați când au pierdut 20% din greutatea corporală inițială. Rezultatele sunt raportate ca procent de supraviețuire (Figura 7).

Rezumatul rezultatelor și concluziile

Șoarecii proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană au fost generați pentru a testa eficacitatea terapeutică a anticorpilor anti-TMPRSS2 într-un model de gripă *in vivo*. În acest experiment, au fost comparate ratele de supraviețuire ale șoarecilor proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 și șoarecii de tip sălbatic infectați cu 150, 750 sau 1.500 PFUs dintr-o tulpină istorică de H1N1. A existat 0% de supraviețuire pentru șoareci proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 și șoarecii de tip sălbatic în toate cele trei grupuri de infecție. Toți șoarecii au murit între ziua 5 și ziua 8 PI, cei care au primit o doză mai mare de virus au murit mai devreme decât cei care au primit o doză mai mică de virus. Modelele de supraviețuire ale șoarecilor proiectate pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană au fost similare cu cele ale șoarecilor de tip sălbatic. Acest lucru arată că șoarecii proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană pot fi folosiți ca model de gripă *in vivo* pentru a evalua eficacitatea anticorpilor specifici TMPRSS2. Vezi Tabelul 21.

Tabelul 21. Rezumatul datelor tabelate.

ID grup	Număr de șoareci pe grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
Genul sălbatic; 150 PFUs H1N1	4	0 (0/4)
Genul sălbatic; 750 PFUs H1N1	4	0 (0/4)
Genul sălbatic; 1.500 PFUs H1N1	3	0 (0/3)
Șoareci proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană; 150 PFUs H1N1	4	0 (0/4)
Șoareci proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană; 750 PFUs H1N1	3	0 (0/3)
Șoareci proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană; 1.500 PFUs H1N1	3	0 (0/3)

Referințe

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *Journal of Virology*. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE*. 12, e0179177 (2017). PMID: 28636671.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*. 116, 76-84 (2015). PMID: 25666761.

4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, Tmprss2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. PLoS ONE. 10, e0138380 (2015). PMID: 26379044.

5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of Tmprss2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. PLoS ONE. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.

6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease Tmprss2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.

7. S. Bertram ș.a., Tmprss2 and Tmprss4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. Journal of Virology. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.

8. C. Tarnow ș.a., Tmprss2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. Journal of Virology (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.

9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases Tmprss2 and HAT from Human Airway Epithelium. Journal of Virology. 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594.

10. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Jun 22;107(25):11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 7 Iunie. PMID: 20534532.

11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

Exemplul 9: Efectul tratamentului cu combinația de H1H14611N2 și H1H7017N la șoareci după infecția cu H3N2.

A fost evaluată capacitatea unei combinații de anticorpi anti-Tmprss2 și anti-gripali de a proteja șoarecii proiectați pentru a exprima proteina umană Tmprss2 de infecția cu virusul gripal H3N2.

Tabelul 22. IDs clonelor mAb.

AbPID	Descriere
H1H7017N	Anticorp anti-Tmprss2
H1H14611N2	Anticorp anti-gripal A grupa 2
H1H1238N	IgG1 martor izotip

Tabelul 23. Reactivi utilizați și numere de lot.

Descriere	Vânzător
Gripa A H3N2 Kilbourne F108 A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, Reasortată X-31	BEI Resources
PBS	Gibco
Ketamină:Xilazină	

Procedura experimentală

Șoarecii masculi și femele de opt săptămâni proiectați pentru a exprima proteina Tmprss2 umană au fost provocați cu 20.000 de unități formatoare de plăci (PFUs) de A/Aichi/2/68 (HA, NA) x A/PR/8/34, Re*assorted X-31 (H3N2). Șoarecii au fost sedați cu 200μL de Ketamină:Xilazină (12 mg/ml; 0,5 mg/ml) prin injecție intraperitoneală și apoi infectați cu 20μL de virus intranasal. În ziua 4 postinfecție (PI), șoarecii au fost injectați intravenos cu anticorp. Greutățile corporale au fost colectate zilnic până în ziua 14 PI și șoarecii au fost sacrificați când au pierdut 25% din greutatea corporală inițială. Rezultatele sunt raportate ca procent de supraviețuire.

Rezumatul rezultatelor și concluziile

S-a demonstrat că, în mod individual, anticorpul Tmprss2, H1H7017N și anticorpul gripal larg A din grupa 2, H1H14611N2, au eficacitate terapeutică împotriva unei provocări letale la șoarece cu o tulpină istorică de H3N2. De asemenea, s-a arătat că supraviețuirea șoarecilor infectați cu o provocare letală cu H1N1 poate fi semnificativ crescută după tratamentul cu mai puțin anticorp total decât fie singur, prin combinația H1H7017N și anticorp gripal larg A grupa 1, H1H1729P. Scopul acestui experiment a fost de a evalua efectul sinergic al H1H7017N și H1H14611N2 în combinație. Așa cum se arată în Figura 8, 3 din 4 șoareci tratați cu anticorpul martor izotip hlgG1 în ziua 4 PI au murit până în ziua 7 PI. 3 din 5 animale au supraviețuit când au

- 5 fost dozate cu 10 mg/kg de H1H14611N2 și 4 din 5 animale au supraviețuit când au fost dozate cu 10 mg/kg de H1H7017N. Când a fost administrat într-o combinație de 5 mg/kg din fiecare anticorp, H1H14611N2 și H1H7017N, a existat o supraviețuire de 40%. Sută la sută dintre șoarecii tratați cu combinația de 2,5 mg/kg din fiecare anticorp, H1H14611N2 și H1H7017N, au supraviețuit provocării. Supraviețuirea șoarecilor infectați cu o provocare letală de H3N2 a fost crescută prin combinația de concentrații mai mici de H1H7017N și H1H14611N2 comparativ cu concentrații mai mari de anticorpi combinați sau din oricare dintre anticorpi singuri. Procentul de supraviețuire este rezumat în Tabelul 24.

Tabelul 24. Rezumatul datelor tabelate.

ID grup	Număr de șoareci per grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
10 mg/kg hlgG1 martor izotip	5	20 (1/5)
10 mg/kg H1H14611N2	5	60 (3/5)
10 mg/kg H1H7017N	5	80 (4/5)
5 mg/kg H1H7017N + 5 mg/kg H1H14611N2	5	40 (2/5)
2,5 mg/kg H1H7017N + 2,5 mg/kg H1H14611N2	5	100 (5/5)

10

Referințe

1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. *Journal of Virology*. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. *PLoS ONE*. 12, e0179177 (2017). PMID: 28636671.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. *Antiviral Research*. 116, 76-84 (2015). PMID: 25666761.
4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. *PLoS ONE*. 10, e0138380 (2015). PMID: 26379044.
5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. *PLoS ONE*. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964
6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. *Journal of Virology*. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.
7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. *Journal of Virology*. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. *Journal of Virology* (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. *Journal of Virology*. 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594.
10. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010 Jun 22; 107(25):11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 7 Iunie. PMID: 20534532.
11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. *Journal of Virology*. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

Exemplul 10: Efectul tratamentului cu combinația de H1H1729P și H1H7017N la șoareci după infecția cu H1N1.

- 45 A fost evaluată capacitatea unei combinații de anticorpi anti-TMPRSS2 și anti-gripali de a proteja șoarecii proiectați pentru a exprima proteina TMPRSS2 umană de infecția cu virusul gripei H1N1.

Tabelul 25. IDs clonelor mAb.

AbPID	Descriere
H1H7017N	Anticorp anti-TMPRSS2
H1H11729P	Anticorp anti-gripal A grupa 1
H1H1238N	IgG1 martor izotip

Tabelul 26. Reactivi utilizați și numere de lot.

Cat#	Descriere	Vânzător
VR-1469	Gripa A A/Puerto Rico/08/1934 (H1N1)	ATCC
20012-043	PBS	Gibco
	Ketamină:Xilazină	

Procedura experimentală

- 5 Șoarecii masculi și femele de cinci săptămâni proiectați pentru a exprima proteina umană TMPRSS2 au fost provocați cu 1.500 de unități formatoare de plăci (PFUs) de H1N1. Virusul a fost eliberat prin sedarea șoarecilor cu 200μL de Ketamină:Xilazină (12 mg/ml: 0,5 mg/ml) și eliberarea a 20μL de virus intranasal. În ziua 3 post-infecție (PI), șoarecii au fost injectați intravenos cu anticorp. Greutățile corporale au fost colectate zilnic până în ziua 14 PI și șoarecii au fost sacrificați când au pierdut 25% din greutatea corporală inițială.

Rezumatul rezultatelor și concluziile

- 10 S-a demonstrat că, în mod individual, anticorpul TMPRSS2, H1H7017N și anticorpul gripal larg A din grupa 1, H1H11729P, au eficacitate terapeutică împotriva unei provocări letale de șoarece cu o tulpină istorică de H1N1. Cu toate acestea, scopul acestui experiment a fost de a evalua efectul sinergic al anticorpilor în combinație. Toți șoarecii tratați cu anticorp de hlgG1 martor izotip în ziua 3 PI au murit până în ziua 6 PI. Când animalele au primit 5 mg/kg de H1H11729P sau H1H7017N, 40% și respectiv 0% dintre animale au supraviețuit infecției. Cu 15 toate acestea, combinația a 2,5 mg/kg din fiecare anticorp, H1H11729P și H1H7017N, a dus la o supraviețuire de 60%. Optzeci la sută dintre șoarecii tratați cu combinația de 1 mg/kg de H1H7017N și 2 mg/kg de H1H11729P (3 mg/kg în total) au supraviețuit provocării.
- 20 Supraviețuirea șoarecilor infectați cu o provocare letală cu H1N1 a fost semnificativ crescută după tratamentul cu mai puțini anticorpi totali decât fie doar singuri prin combinația H1H7017N și H1H11729P (vezi Figura 9 și Tabelul 27).

Tabelul 27. Rezumatul datelor tabelate.

ID grup	Număr de șoareci pe grup	Procent de supraviețuire (numărul de șoareci supraviețuitori/numărul total de șoareci din grup)
5 mg/kg hlgG1 martor izotip	3	0 (0/3)
5 mg/kg H1H11729P	5	40 (2/5)
5 mg/kg H1H7017N	5	0 (0/5)
2,5 mg/kg H1H7017N + 2,5 mg/kg H1H11729P	5	60 (3/5)
1 mg/kg H1H7017N + 2 mg/kg H1H11729P	5	80 (4/5)

Referințe

- 25 1. K. Shirato, K. Kanou, M. Kawase, S. Matsuyama, Clinical Isolates of Human Coronavirus 229E Bypass the Endosome for Cell Entry. Journal of Virology. 91, e01387-16 (2017). PMID: 27733646.
- 30 2. L. M. Reinke ș.a., Different residues in the SARS-CoV spike protein determine cleavage and activation by the host cell protease TMPRSS2. PLoS ONE. 12, e0179177 (2017). PMID: 28636671.
3. Y. Zhou ș.a., Protease inhibitors targeting coronavirus and filovirus entry. Antiviral Research. 116, 76-84 (2015). PMID: 25666761.

4. P. Zmora, A.-S. Moldenhauer, H. Hofmann-Winkler, S. Pohlmann, TMPRSS2 Isoform 1 Activates Respiratory Viruses and Is Expressed in Viral Target Cells. PLoS ONE. 10, e0138380 (2015). PMID: 26379044.
5. P. Zmora ș.a., Non-human primate orthologues of TMPRSS2 cleave and activate the influenza virus hemagglutinin. PLoS ONE. 12, e0176597 (2017). PMID: 28493964.
6. E. Bottcher-Friebertshauser, D. A. Stein, H.-D. Klenk, W. Garten, Inhibition of influenza virus infection in human airway cell cultures by an antisense peptide-conjugated morpholino oligomer targeting the hemagglutinin-activating protease TMPRSS2. Journal of Virology. 85, 1554-1562 (2011). PMID: 21123387.
10. 7. S. Bertram ș.a., TMPRSS2 and TMPRSS4 facilitate trypsin-independent spread of influenza virus in Caco-2 cells. Journal of Virology. 84, 10016-10025 (2010). PMID: 20631123.
8. C. Tarnow ș.a., TMPRSS2 is a host factor that is essential for pneumotropism and pathogenicity of H7N9 influenza A virus in mice. Journal of Virology (2014), doi:10.1128/JVI.03799-13. PMID: 24522916.
15. 9. E. Bottcher ș.a., Proteolytic Activation of Influenza Viruses by Serine Proteases TMPRSS2 and HAT from Human Airway Epithelium. Journal of Virology. 80, 9896-9898 (2006). PMID: 16973594.
10. Manicassamy ș.a., Analysis of in vivo dynamics of influenza virus infection in mice using a GFP reporter virus. Proc Natl Acad Sci USA. 2010 Jun 22;107(25):11531-6. doi: 10.1073/pnas.0914994107. Epub 2010 7 Iunie. PMID: 20534532.
20. 11. H. Zeng ș.a., Highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses elicit an attenuated type I interferon response in polarized human bronchial epithelial cells. Journal of Virology. 81, 12439-12449 (2007). PMID: 17855549.

25 LISTA DE SECVENȚE

- <110> Purcell , Lisa
- <120> ANTICORPI ANTI-TMPRSS2 ȘI FRAGMENTE DE LEGARE LA ANTIGEN
- <130> 10378-WO
- <140> Pentru a fi atribuit
- 30 <141> 2019-01-24
- <150> 62/622,292
- <151> 2018-01-26
- <160> 48
- <170> PatentIn version 3.5
- 35 <210> 1
- <211> 360
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 40 <221> CDS
- <222> (1)..(360)
- <400> 1

cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcg tct gga ttc acc ttc agt tcc tat 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 ggc atg cac tgg gtc cgc cag tct cca ggc aag ggg ctc gag tgg gtg 144
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gca gtt ata tgg aat gat gga agt tat gta tac tat gca gac tcc gtg 192
 Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac att tcc aag aac acg ctg ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gcg aga gag ggg gag tgg gta ctt tac tac ttt gac tac tgg ggc cag 336
 Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 360
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 2
 <211> 120
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120
 <210> 3
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(321)
 <400> 3

	gac atc cag atg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gtt gga	48
	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly	
	1 5 10 15	
	gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt agc tgg	96
	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp	
	20 25 30	
	ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aaa ctc ctg atc	144
	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
	35 40 45	
5	tat aag gcg tct act tta gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc	192
	Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
	50 55 60	
	agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct	240
	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
	65 70 75 80	
	gat gat ttt gca act tat tac tgc caa cag tat aat agt tat tcg tac	288
	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr	
	85 90 95	
	act ttt ggc cag ggg acc aag ctg gag atc aaa	321
	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
	100 105	

<210> 4
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

<210> 5
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(24)

15

```

<400> 5
gga ttc acc ttc agt tcc tat ggc
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5
10 <210> 7
<211> 24
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
15 <221> CDS
<222> (1)..(24)
<400> 7
ata tgg aat gat gga agt tat gta
Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val
1 5
20 <210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8
Ile Trp Asn Asp Gly Ser Tyr Val
1 5
25 <210> 9
<211> 39
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
30 <221> CDS
<222> (1)..(39)
<400> 9
gcg aga gag ggg gag tgg gta ctt tac tac ttt gac tac
Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
35 <210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10
Ala Arg Glu Gly Glu Trp Val Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10
40 <210> 11
<211> 18
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
45 <221> CDS
<222> (1)..(18)
<400> 11
cag agt att agt agc tgg
Gln Ser Ile Ser Ser Trp
1 5
50 <210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 12

```

```

      Gln Ser Ile Ser Ser Trp
      1               5
5      <210> 13
      <211> 9
      <212> ADN
      <213> Homo sapiens
      <400> 13
      aagcgctct      9
10     <210> 14
      <211> 3
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens
      <400> 14
      Lys Ala Ser
      1
15     <210> 15
      <211> 27
      <212> ADN
      <213> Homo sapiens
      <220>
20     <221> CDS
      <222> (1)..(27)
      <400> 15
      caa cag tat aat agt tat tcg tac act      27
      Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
      1               5
25     <210> 16
      <211> 9
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens
      <400> 16
      Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr Thr
      1               5
30     <210> 17
      <211> 450
      <212> PRT
      <213> Homo sapiens
      <400> 17

```

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Val	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ser	Tyr	Val	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Glu	Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160

```

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
      165                      170                      175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
      180                      185                      190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
      195                      200                      205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
      210                      215                      220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
      225                      230                      235                      240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
      245                      250                      255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
      260                      265                      270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
      275                      280                      285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
      290                      295                      300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
      305                      310                      315                      320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
      325                      330                      335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
      340                      345                      350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
      355                      360                      365

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
      370                      375                      380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
      385                      390                      395                      400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
      405                      410                      415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
      420                      425                      430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
      435                      440                      445

Gly Lys
      450
<210> 18
<211> 214
<212> PRT

```

<213> Homo sapiens

<400> 18

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp
 20 25 30

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

Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

5

210

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 19

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

60

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg	1	5	10	15
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	20	25	30	
Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	35	40	45	
Ala	Val	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	Ser	Tyr	Val	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Ile	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe	65	70	75	80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Glu	Gly	Glu	Trp	Val	Leu	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	100	105	110	
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	130	135	140	
Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	145	150	155	160
Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	165	170	175	

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

61

```

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180                      185                      190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195                      200                      205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210                      215                      220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225                      230                      235                      240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245                      250                      255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
260                      265                      270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275                      280                      285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290                      295                      300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                      310                      315                      320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
325                      330                      335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340                      345                      350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
355                      360                      365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370                      375                      380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                      390                      395                      400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405                      410                      415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420                      425                      430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435                      440                      445
<210> 20
<211> 178
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 20

```

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

62

```

Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys Cys Ser Asn Ser Gly Ile Glu Cys Asp
1          5          10          15

Ser Ser Gly Thr Cys Ile Asn Pro Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser
          20          25          30

His Cys Pro Gly Gly Glu Asp Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly
          35          40          45

Pro Asn Phe Ile Leu Gln Met Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His
          50          55          60

Pro Val Cys Gln Asp Asp Trp Asn Glu Asn Tyr Gly Arg Ala Ala Cys
65          70          75          80

Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn Asn Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val
          85          90          95

Asp Asp Ser Gly Ser Thr Ser Phe Met Lys Leu Asn Thr Ser Ala Gly
          100          105          110

Asn Val Asp Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr His Ser Asp Ala Cys Ser Ser
          115          120          125

Lys Ala Val Val Ser Leu Arg Cys Ile Ala Cys Gly Val Asn Leu Asn
          130          135          140

Ser Ser Arg Gln Ser Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
145          150          155          160

Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
          165          170          175

```

```

His His
<210> 21
<211> 178
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis
<400> 21

```

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

63

Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys Cys Ser Asp Ser Gly Ile Glu Cys Asp
1 5 10 15

Ser Ser Gly Thr Cys Ile Ser Leu Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser
20 25 30

His Cys Pro Asn Gly Glu Asp Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly
35 40 45

Pro Asn Phe Ile Leu Gln Val Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His
50 55 60

Pro Val Cys Arg Asp Asp Trp Asn Glu Asn Tyr Ala Arg Ala Ala Cys
65 70 75 80

Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn Ser Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val
85 90 95

Asp Asn Ser Gly Ala Thr Ser Phe Met Lys Leu Asn Thr Ser Ala Gly
100 105 110

Asn Val Asp Ile Tyr Lys Lys Leu Tyr His Ser Asp Ala Cys Ser Ser
115 120 125

Lys Ala Val Val Ser Leu Arg Cys Ile Ala Cys Gly Val Arg Ser Asn
130 135 140

Leu Ser Arg Gln Ser Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu
145 150 155 160

Gly Gly Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His
165 170 175

His His

<210> 22

<211> 492

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Ala Leu Asn Ser Gly Ser Pro Pro Ala Ile Gly Pro Tyr Tyr Glu
1 5 10 15

```

Asn His Gly Tyr Gln Pro Glu Asn Pro Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Val
    20                      25                      30

Val Pro Thr Val Tyr Glu Val His Pro Ala Gln Tyr Tyr Pro Ser Pro
    35                      40                      45

Val Pro Gln Tyr Ala Pro Arg Val Leu Thr Gln Ala Ser Asn Pro Val
    50                      55                      60

Val Cys Thr Gln Pro Lys Ser Pro Ser Gly Thr Val Cys Thr Ser Lys
    65                      70                      75                      80

Thr Lys Lys Ala Leu Cys Ile Thr Leu Thr Leu Gly Thr Phe Leu Val
    85                      90                      95

Gly Ala Ala Leu Ala Ala Gly Leu Leu Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys
   100                      105                      110

Cys Ser Asn Ser Gly Ile Glu Cys Asp Ser Ser Gly Thr Cys Ile Asn
   115                      120                      125

Pro Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser His Cys Pro Gly Gly Glu Asp
   130                      135                      140

Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly Pro Asn Phe Ile Leu Gln Met
   145                      150                      155                      160

Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His Pro Val Cys Gln Asp Asp Trp
   165                      170                      175

Asn Glu Asn Tyr Gly Arg Ala Ala Cys Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn
   180                      185                      190

Asn Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val Asp Asp Ser Gly Ser Thr Ser
   195                      200                      205

Phe Met Lys Leu Asn Thr Ser Ala Gly Asn Val Asp Ile Tyr Lys Lys
   210                      215                      220

Leu Tyr His Ser Asp Ala Cys Ser Ser Lys Ala Val Val Ser Leu Arg
   225                      230                      235                      240

Cys Ile Ala Cys Gly Val Asn Leu Asn Ser Ser Arg Gln Ser Arg Ile
   245                      250                      255

Val Gly Gly Glu Ser Ala Leu Pro Gly Ala Trp Pro Trp Gln Val Ser
   260                      265                      270

```

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

65

Leu His Val Gln Asn Val His Val Cys Gly Gly Ser Ile Ile Thr Pro
275 280 285

Glu Trp Ile Val Thr Ala Ala His Cys Val Glu Lys Pro Leu Asn Asn
290 295 300

Pro Trp His Trp Thr Ala Phe Ala Gly Ile Leu Arg Gln Ser Phe Met
305 310 315 320

Phe Tyr Gly Ala Gly Tyr Gln Val Glu Lys Val Ile Ser His Pro Asn
325 330 335

Tyr Asp Ser Lys Thr Lys Asn Asn Asp Ile Ala Leu Met Lys Leu Gln
340 345 350

Lys Pro Leu Thr Phe Asn Asp Leu Val Lys Pro Val Cys Leu Pro Asn
355 360 365

Pro Gly Met Met Leu Gln Pro Glu Gln Leu Cys Trp Ile Ser Gly Trp
370 375 380

Gly Ala Thr Glu Glu Lys Gly Lys Thr Ser Glu Val Leu Asn Ala Ala
385 390 395 400

Lys Val Leu Leu Ile Glu Thr Gln Arg Cys Asn Ser Arg Tyr Val Tyr
405 410 415

Asp Asn Leu Ile Thr Pro Ala Met Ile Cys Ala Gly Phe Leu Gln Gly
420 425 430

Asn Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Thr Ser
435 440 445

Lys Asn Asn Ile Trp Trp Leu Ile Gly Asp Thr Ser Trp Gly Ser Gly
450 455 460

Cys Ala Lys Ala Tyr Arg Pro Gly Val Tyr Gly Asn Val Met Val Phe
465 470 475 480

Thr Asp Trp Ile Tyr Arg Gln Met Arg Ala Asp Gly
485 490

<210> 23

<211> 492

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 23

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

66

```

Met Ala Leu Asn Ser Gly Ser Pro Pro Gly Val Gly Pro Tyr Tyr Glu
1          5          10          15

Asn His Gly Tyr Gln Pro Glu Asn Pro Tyr Pro Ala Gln Pro Thr Val
          20          25          30

Ala Pro Asn Val Tyr Glu Val His Pro Ala Gln Tyr Tyr Pro Ser Pro
          35          40          45

Val Pro Gln Tyr Thr Pro Arg Val Leu Thr His Ala Ser Asn Pro Ala
50          55          60

Val Cys Arg Gln Pro Lys Ser Pro Ser Gly Thr Val Cys Thr Ser Lys
65          70          75          80

Thr Lys Lys Ala Leu Cys Val Thr Met Thr Leu Gly Ala Val Leu Val
          85          90          95

Gly Ala Ala Leu Ala Ala Gly Leu Leu Trp Lys Phe Met Gly Ser Lys
          100          105          110

Cys Ser Asp Ser Gly Ile Glu Cys Asp Ser Ser Gly Thr Cys Ile Ser
          115          120          125

Leu Ser Asn Trp Cys Asp Gly Val Ser His Cys Pro Asn Gly Glu Asp
130          135          140

Glu Asn Arg Cys Val Arg Leu Tyr Gly Pro Asn Phe Ile Leu Gln Val
145          150          155          160

Tyr Ser Ser Gln Arg Lys Ser Trp His Pro Val Cys Arg Asp Asp Trp
          165          170          175

Asn Glu Asn Tyr Ala Arg Ala Ala Cys Arg Asp Met Gly Tyr Lys Asn
          180          185          190

Ser Phe Tyr Ser Ser Gln Gly Ile Val Asp Asn Ser Gly Ala Thr Ser
          195          200          205

Phe Met Lys Leu Asn Thr Ser Ala Gly Asn Val Asp Ile Tyr Lys Lys
210          215          220

Leu Tyr His Ser Asp Ala Cys Ser Ser Lys Ala Val Val Ser Leu Arg
225          230          235          240

Cys Ile Ala Cys Gly Val Arg Ser Asn Leu Ser Arg Gln Ser Arg Ile

```

67

<400> 24

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

68

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

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

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 25

Gly Phe Thr Phe Ser Gly Phe Ser
1 5

<210> 26

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met
1 5

<210> 27

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

20 <210> 28

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asn Ser Asn
20 25 30

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

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

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

Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 29

Gln Ser Leu Asn Ser Asn Tyr
1 5

<210> 30

<211> 3

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Gly Ala Ser
1

15 <210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 31

20 Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Leu Thr
1 5

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

25 <213> Homo sapiens

<400> 32

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

70

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Ser Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro Ser Tyr Ala Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Asp Arg Val Thr Ile Thr Thr Asp Glu Ser Thr Ser Thr Val Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gln Gln Pro Val Tyr Gln Tyr Asn Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 33

Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 34

<211> 8

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Pro
1 5

<210> 35

15 <211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Arg Gln Gln Pro Val Tyr Gln Tyr Asn Met Asp Val
1 5 10

20 <210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 36

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

71

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asn
20 25 30

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

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 37

Gln Gly Ile Arg Asn Asn
1 5

<210> 38

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 38

Ala Ala Ser
1

<210> 39

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 39

Leu Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 40

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

72

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Ser Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Gly Phe Ser Phe Ser Gly Phe Ser
1 5

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

Ile Ser Thr Ser Gly Asn Tyr Met
1 5

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 43

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Asn Trp Asn Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 44

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

MD/EP 3638698 T2 2021.07.31

73

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Leu Asn Ser Asn
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Ser Gly Ala Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro
85 90 95

Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 45

<211> 7

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 45

Gln Ser Leu Asn Ser Asn Tyr

1 5

<210> 46

10 <211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

Gly Ala Ser

1

15 <210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Leu Thr

20 1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> Secvență Artificială

25 <220>

<223> Linker GS

<400> 48

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

(56) Referințe bibliografice citate în raportul de documentare:

- DE NARDIS CAMILLA ET AL: "Recombinant Expression of the Full-length Ectodomain of LDL Receptor-related Protein 1 (LRP1) Unravels pH-dependent Conformational Changes and the Stoichiometry of Binding with Receptor-associated Protein (RAP).", THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 20 01 2017, vol. 292, no. 3, 20 January 2017 (2017-01-20), pages 912-924, XP002790847, ISSN: 1083-351X
- WO-A2-02/04953
- WILSON SUSAN ET AL: "The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells.", THE BIOCHEMICAL JOURNAL 15 JUN 2005, vol. 388, no. Pt 3, 15 June 2005 (2005-06-15), pages 967-972, XP002790848, ISSN: 1470-8728
- WO-A2-2008/076379
- SHEN LI WEN ET AL: "TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections", BIOCHIMIE, vol. 142, 1 August 2017 (2017-08-01), pages 1-10, XP085244550, ISSN: 0300-9084, DOI: 10.1016/J.BIOCHI.2017.07.016
- WO-A2-2018/175749
- DATABASE UniParc [Online] UniParc; 12 March 2003 (2003-03-12), "UniParc - UPI00001178DF", XP002790849, Database accession no. UPI00001178DF & "https://www.uniprot.org/uniparc/UP100001178DF", UniParc , 12 March 2003 (2003-03-12), Retrieved from the Internet: URL:https://www.uniprot.org/uniparc/UP100001178DF [retrieved on 2019-04-25]
- US-A1- 2013 273 070

(57) Revendicări:

1. Proteină care leagă antigenul uman care se leagă în mod specific la TMPRSS2 umană și care este un anticorp sau un fragment de legare a antigenului al acestuia și în care proteina care leagă antigenul cuprinde:

- o regiune variabilă a lanțului greu al imunoglobulinei care cuprinde
 - (a) un CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi: G F T F S S Y G (SECV ID NR: 6),
 - (b) un CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi: I W N D G S Y V (SECV ID NR: 8), and
 - (c) un CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi: A R E G E W V L Y Y F D Y (SECV ID NR: 10); and
- o regiune variabilă a lanțului ușor al imunoglobulinei care cuprinde
 - (a) a CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q S I S S W (SECV ID NR: 12),
 - (b) a CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi: K A S (SECV ID NR: 14), and
 - (c) a CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q Q Y N S Y S Y T (SECV ID NR: 16).

2. Proteină care leagă antigenul conform revendicării 1 care cuprinde:

- (a) un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR:2
- și
- (b) un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi stabilită în SECV ID NR: 18 sau o regiune variabilă a lanțului ușor de imunoglobulină care cuprinde secvența de aminoacizi prezentată în SECV ID NR: 4.

3. Proteină care leagă antigenul conform revendicării 1 sau 2, care este multispecifică.

4. Complex care cuprinde o proteină care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1-3 legată de o polipeptidă TMPRSS2.

5. Metodă pentru obținerea unei proteine care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1-3 care cuprinde:

- (a) introducerea într-o celulă gazdă: (i) o polinucleotidă care codifică un lanț greu de imunoglobulină și un lanț ușor de imunoglobulină al proteinei care leagă antigenul; sau (ii) o polinucleotidă care codifică un lanț greu de imunoglobulină al respectivei proteine care leagă antigenul și o polinucleotidă care codifică un lanț ușor de imunoglobulină al respectivei proteine care leagă antigenul;

- (b) cultivarea celulei gazdă în condiții favorabile exprimării polinucleotidelor; și

(c) opțional, izolarea proteinei de legare a antigenului de celula gazdă și/sau mediu în care este cultivată celula gazdă.

6. Metodă conform revendicării 5, în care celula gazdă este o celulă ovariană de hamster chinezesc.

7. Polinucleotidă care codifică:

un lanț greu de imunoglobulină care cuprinde:

(a) un CDR-H1 care cuprinde secvența de aminoacizi: G F T F S S Y G (SECV ID NR: 6),

(b) un CDR-H2 care cuprinde secvența de aminoacizi: I w N D G S Y V (SECV ID NR: 8),

și

(c) un CDR-H3 care cuprinde secvența de aminoacizi: A R E G E W V L Y Y F D Y (SECV ID NR: 10); și

un lanț ușor de imunoglobulină care cuprinde:

(a) un CDR-L1 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q S I S S W (SECV ID NR: 12),

(b) un CDR-L2 care cuprinde secvența de aminoacizi: K A S (SECV ID NR: 14), and

(c) un CDR-L3 care cuprinde secvența de aminoacizi: Q Q Y N S Y S Y T (SECV ID NR:

16).

8. Vector care cuprind polinucleotida conform revendicării 7.

9. Celulă gazdă care cuprind proteina care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1 la 3, polinucleotida conform revendicării 7, sau vectorul conform revendicării 8.

10. Compoziție sau kit care cuprinde proteina care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1-3 și un alt agent terapeutic, în care trusa cuprinde proteina care leagă antigenul și agentul terapeutic suplimentar formulat ca o singură compoziție, sau separat în două sau mai multe compoziții.

11. Compoziție farmaceutică care cuprinde proteina care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1-3 și un purtător acceptabil farmaceutic și, opțional, un alt agent terapeutic.

12. Compoziție sau kit conform revendicării 10 sau 11, în care: (i) agentul terapeutic suplimentar este un medicament antiviral, sau un vaccin; sau (ii) agentul terapeutic suplimentar este un membru selectat din grupul format din: oseltamivir, zanamivir, ribavirină și interferon-alfa2b, interferon-alfa2a și un anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia care se leagă în mod specific de HA gripal.

13. Vas sau dispozitiv de injecție care cuprind proteina care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1-3, sau compoziția oricăreia dintre revendicările 10-12.

14. Proteină care leagă antigenul conform oricăreia dintre revendicările 1-3 pentru utilizare într-o metodă pentru tratarea sau prevenirea infecției cu un virus gripal la un subiect care are nevoie de acesta, care cuprinde administrarea unei cantități eficiente terapeutic din proteina menționată care leagă antigenul.

15. Proteină care leagă antigenul pentru utilizare conform revendicării 14, în care:

(i) subiectului i se administrează unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari;

(ii) subiectului i se administrează unul sau mai mulți agenți terapeutici suplimentari care sunt un medicament antiviral, sau un vaccin;

(iii) subiectului i se administrează unul sau mai mulți agenți terapeutici care sunt un membru selectat din grupul format din: oseltamivir, zanamivir, ribavirină și interferon-alfa2b, interferon-alfa2a și un anticorp sau fragment de legare a antigenului al acestuia care se leagă în mod specific de HA gripal; sau

(iv) proteina care leagă antigenul este injectată în corpul subiectului, opțional, subcutanat, intravenos sau intramuscular.

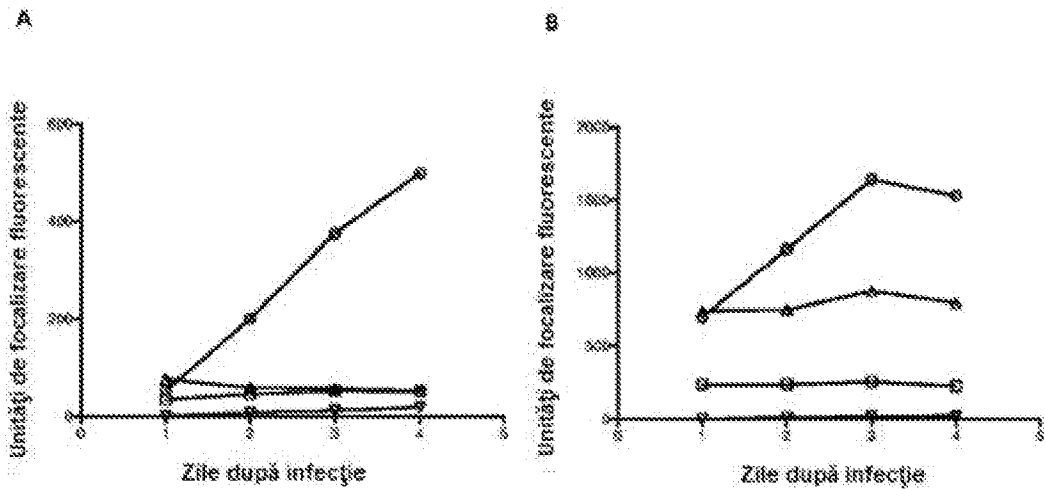


Fig. 1

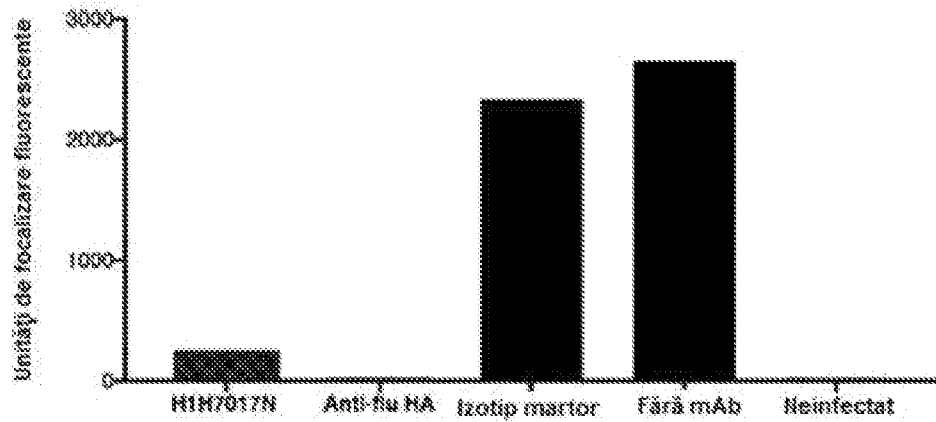


Fig. 2

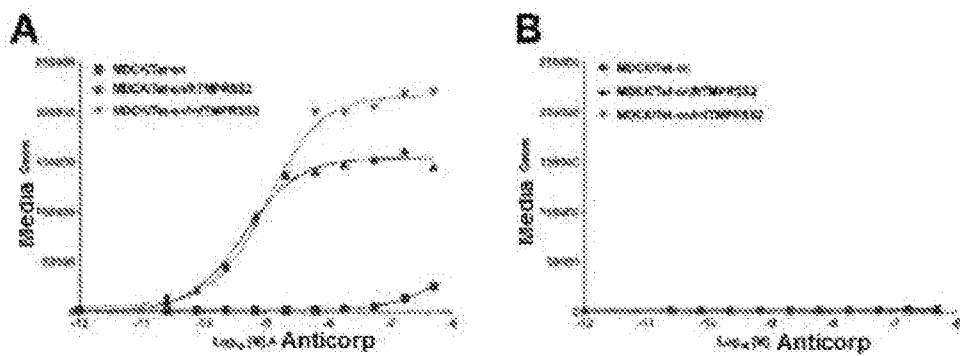


Fig. 3

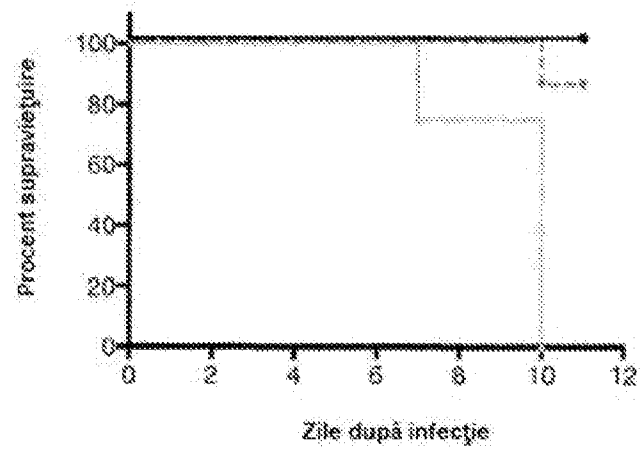


Fig. 4

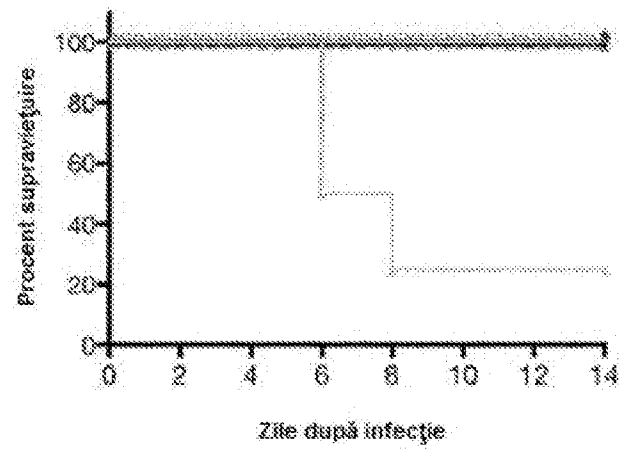


Fig. 5

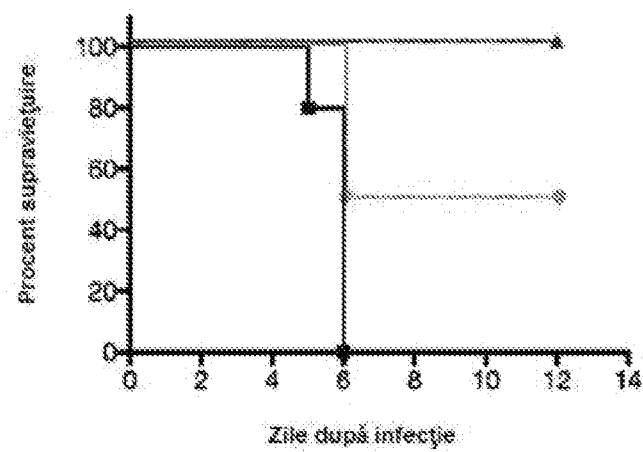


Fig. 6

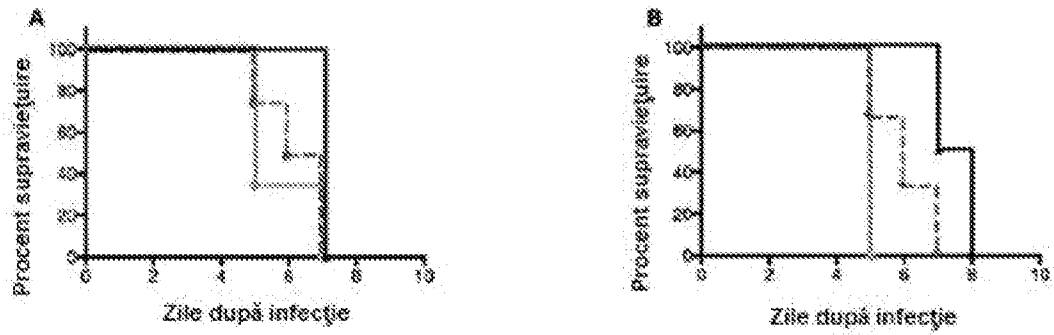


Fig. 7

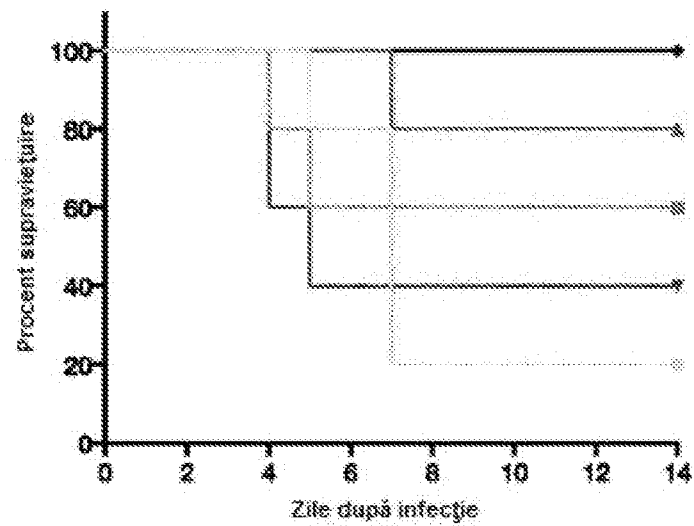


Fig. 8

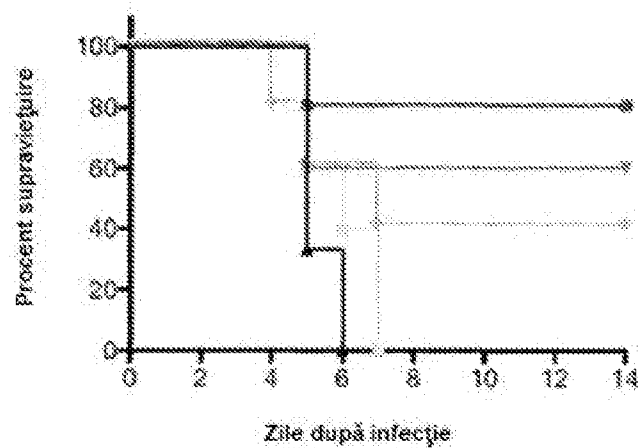


Fig. 9