



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

(21) BR 112020014849-0 A2



(22) Data do Depósito: 24/01/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 08/12/2020

(54) **Título:** ANTICORPO RECOMBINANTE ISOLADO OU SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA POLINUCLEOTÍDICA ISOLADA, VETOR, CÉLULA, E, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR OU MELHORAR PELO MENOS UM SINTOMA DE INFECÇÃO POR INFLUENZA

(51) **Int. Cl.:** C07K 16/10; A61P 31/16.

(30) **Prioridade Unionista:** 26/01/2018 US 62/622.480.

(71) **Depositante(es):** REGENERON PHARMACEUTICALS, INC..

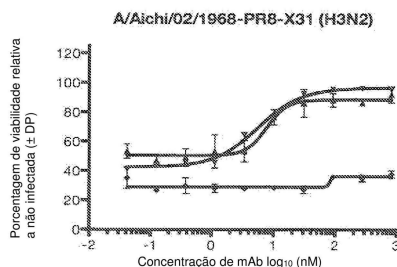
(72) **Inventor(es):** LISA A. PURCELL; JONATHAN VIAU; WILLIAM OLSON.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2019015029 de 24/01/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/147867 de 01/08/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 21/07/2020

(57) **Resumo:** A presente invenção fornece anticorpos monoclonais, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que se ligam à proteína de hemaglutinina de influenza (HA), composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos e métodos de uso. Os anticorpos da invenção são úteis para inibir ou neutralizar a atividade do vírus da influenza, fornecendo assim um meio de tratar ou prevenir a infecção por influenza em seres humanos. Em algumas modalidades, a invenção fornece o uso de um ou mais anticorpos que se ligam à HA da influenza para impedir a ligação viral e/ou a entrada nas células hospedeiras. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados profilaticamente ou terapêuticamente e podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com um ou mais outros agentes ou vacinas antivirais.



ANTICORPO RECOMBINANTE ISOLADO OU SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA POLINUCLEOTÍDICA ISOLADA, VETOR, CÉLULA, E, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR OU MELHORAR PELO MENOS UM SINTOMA DE INFECÇÃO POR INFLUENZA

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] Este pedido reivindica o benefício do pedido de patente provisória dos EUA nº 62/622.480; depositado em 26 de janeiro de 2018; que é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

[002] A presente invenção está relacionada a anticorpos humanos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam especificamente à hemaglutinina do grupo 2 da influenza A (HA), composições compreendendo esses anticorpos e métodos terapêuticos e de diagnóstico para o uso desses anticorpos.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

[003] Uma cópia oficial da listagem de sequências é submetida simultaneamente à especificação eletronicamente via EFS-Web como uma listagem de sequências formatadas em ASCII com um nome de arquivo "10201WO01_SEQ_LIST.txt", uma data de criação em 24 de janeiro de 2019 e um tamanho de aproximadamente 21 KB. A listagem de sequências contida neste documento em formato ASCII é parte do relatório descritivo e está incorporada neste documento por referência na sua totalidade.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[004] A influenza é uma doença altamente contagiosa, com uma longa história caracterizada por ondas de pandemias, epidemias, ressurgimentos e surtos. Apesar dos esforços anuais de vacinação, as infecções por influenza resultam em substancial morbimortalidade.

[005] Os vírus influenza consistem em três tipos, A, B e C. Além disso, os vírus influenza A podem ser classificados em subtipos com base em

variações alélicas nas regiões antigênicas de dois genes que codificam as glicoproteínas de superfície, hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), que são necessários para ligação viral e entrada na célula hospedeira.

[006] A hemaglutinina é uma glicoproteína trimérica que contém dois domínios estruturais, um domínio da cabeça globular que consiste no local de ligação ao receptor (sujeito a deriva antigênica frequente) e na região do tronco (mais conservada entre várias cepas do vírus influenza). A proteína HA é sintetizada como um precursor (HA0), que passa por processamento proteolítico para produzir duas subunidades (HA1 e HA2), que se associam para formar a estrutura do tronco/ cabeça globular. O peptídeo HA1 é responsável pela ligação do vírus à superfície celular. O peptídeo HA2 forma uma estrutura semelhante ao caule que medeia a fusão das membranas virais e celulares nos endossomos, permitindo a liberação do complexo ribonucleoproteico no citoplasma.

[007] Atualmente, existem dezoito subtipos definidos por suas proteínas hemaglutininas (H1-H18). Os 18 HAs podem ser classificados em dois grupos. O grupo 1 consiste nos subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 e H18 e o grupo 2 inclui os subtipos H3, H4, H7, H10, H14 e H15.

[008] Novas cepas do mesmo subtipo podem surgir como resultado de um fenômeno chamado desvio antigênico ou mutações nas moléculas de HA ou NA que geram novos e diferentes epítomos. Uma consequência disso é que uma nova vacina deve ser produzida todos os anos contra vírus que estão previstos para emergir, um processo que não é apenas caro, mas altamente ineficiente. Embora os avanços tecnológicos tenham melhorado a capacidade de produzir antígeno(s) de influenza melhorado(s) para as composições de vacinas, ainda é necessário fornecer fontes adicionais de proteção para lidar com os subtipos e cepas emergentes de influenza.

[009] Embora a ideia de uma composição de vacina compreendendo

o antígeno de interesse (por exemplo, HA e/ou NA) para gerar anticorpos amplamente neutralizantes em um paciente seja geralmente considerada uma boa abordagem, nem sempre é desejável usar essa abordagem em certas populações de pacientes. Por exemplo, em certos pacientes, uma composição de vacina que compreende o antígeno de interesse nem sempre pode ser eficaz, como em idosos, em pacientes muito jovens, em pacientes imunocomprometidos etc. Nessas populações de pacientes, ou em qualquer paciente que não é capaz de montar uma resposta imune eficaz, pode ser mais benéfico fornecer uma composição que já contenha anticorpos neutralizantes amplamente que possam atingir epítomos comuns a uma variedade de cepas do grupo 1 e/ou Subtipos do grupo 2.

[0010] Até o momento, houve um sucesso limitado na identificação de tais anticorpos que neutralizam ou inibem amplamente os vírus influenza. Okuno *et al.* imunizaram camundongos com influenza A/Okuda/57 (H2N2) e isolaram um anticorpo designado C179, que se ligou a um epítipo conformacional conservado em HA2 e neutralizou os vírus influenza A do grupo 1 H2, H1 e H5 *in vitro* e *in vivo* (Okuno *et al.* (1993) J. Virol. 67 (5): 2552-2558). Throsby *et al.* identificaram 13 anticorpos monoclonais de células B humanas que tinham ampla atividade contra os subtipos do grupo 1 (Throsby *et al.* (2008), PLOS one 3 (2): e3942). Sui *et al.* identificaram um anticorpo monoclonal humano (F10), que ligou o H5 e outros vírus do grupo 1 (Sui, *et al.* (2009), Nat. Struct. Mol. Biol. 16 (3): 265-273). Tarakaraman *et al.* identificou um anticorpo amplamente neutralizante designado VIS410, que foi eficaz na neutralização das cepas de vírus da influenza do grupo 2, incluindo cepas H3N2 e H7N9, *in vitro* e *in vivo* (Tarakaraman, K, EUA *et al.*, (2015), Proc Natl Acad Science 112 (35):10890-10895).

[0011] No entanto, após décadas de pesquisa nessa área, apenas alguns anticorpos estão atualmente em testes clínicos para avaliar sua capacidade de neutralizar vírus da influenza de diferentes subtipos (consulte,

por exemplo, anticorpos em desenvolvimento pela Crucell Holland ((US2012/0276115, US2014/0065156, US8470327, US2014/0120113, EP2731967, US8691223, US2013/0243792, US2014/0065165, WO2008/028946 e WO2010/130636); Osaka University (US2011/0319600, EP2380976, US2012/0058124, US2012/0058124), Celltrion (US2013/0004505, EP2545074; WO2014/158001); Vanderbilt University (US2013/0289246), SeaLane Biotechnologies (US2012/0128671), Trellis Bioscience, Inc. (US2012/0020971 EP2582721); Visterra, Inc. (US2013/0302349); Burnham Institute/Dana Farber (US2014/011982, EP2222701, WO2010/027818); Temasek (US8444986, US8574581, US8637644, US8637645, US8383121, US8540996, US8574830, US8540995); HUMABS Biosciences/Institute for Research in Biomedicine (US8871207, US8685402, EP2313433); MedImmune (WO2015/051010); AIMM Therapeutics (WO2013/081463, EP12798020) e Genentech (US2014/0161822), mas ainda não existem anticorpos comercializados que neutralizem ou inibam amplamente a infecção pelo vírus influenza A ou atenuem a doença causada por vários subtipos deste vírus.. Conseqüentemente, ainda é necessário na técnica identificar novos anticorpos que neutralizem múltiplos subtipos do vírus influenza A, que podem ser usados para prevenir ou tratar uma infecção pelo vírus influenza.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0012] A presente invenção fornece anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à hemaglutinina do grupo 2 da influenza A (HA). Os anticorpos da presente invenção são úteis, *inter alia*, para inibir ou neutralizar a atividade da HA do grupo 2 da influenza. Em algumas modalidades, os anticorpos são úteis para bloquear a ligação do vírus influenza à célula hospedeira e/ou para impedir a entrada do vírus influenza nas células hospedeiras. Em algumas modalidades, os anticorpos funcionam inibindo a transmissão célula-a-célula do vírus. Em certas modalidades, os

anticorpos são úteis na prevenção, tratamento ou melhoria de pelo menos um sintoma de infecção pelo vírus influenza em um indivíduo. Em certas modalidades, os anticorpos podem ser administrados profilaticamente ou terapêuticamente a um indivíduo que tem, ou corre o risco de adquirir, uma infecção pelo vírus influenza. Em certas modalidades, as composições que contêm pelo menos um anticorpo da invenção podem ser administradas a um indivíduo para o qual uma vacina é contraindicada ou para quem uma vacina é menos eficaz, por exemplo, um paciente idoso, um paciente muito jovem, um paciente que pode ser alérgico a qualquer um ou mais componentes de uma vacina ou um paciente imunocomprometido que pode não responder aos imunógenos de uma vacina. Em certas modalidades, composições contendo pelo menos um anticorpo da invenção podem ser administradas à equipe médica, pacientes hospitalizados ou residentes de asilos ou outros pacientes de alto risco durante um surto de influenza. Em certas modalidades, as composições que contêm pelo menos um anticorpo da invenção podem ser administradas como um tratamento de primeira linha a pacientes no caso de uma vacina anual prevista ser ineficaz ou no caso de uma pandemia com uma cepa que tenha sofrido um importante antígeno mudança.

[0013] Os anticorpos da invenção podem ser de comprimento completo (por exemplo, um anticorpo IgG1 ou IgG4) ou podem compreender apenas uma porção de ligação ao antígeno (por exemplo, um Fab, F(ab')₂ ou fragmento scFv) e podem ser modificados para afetar a funcionalidade, por exemplo, para aumentar a persistência no hospedeiro ou aumentar a função efetiva ou eliminar as funções efetoras residuais (Reddy *et al.*, 2000, J. Immunol. 164: 1925-1933). Em certas modalidades, os anticorpos podem ser biespecíficos.

[0014] Em um primeiro aspecto, a presente invenção fornece anticorpos monoclonais recombinantes isolados ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam especificamente à hemaglutinina do grupo 2

da influenza A (HA).

[0015] Em uma modalidade, a presente invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou um fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao grupo 2 HA da influenza A, em que o anticorpo tem duas ou mais das seguintes características:

- (a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano;
- (b) liga-se aa HA do grupo 2 da influenza A com uma constante de dissociação (K_D) inferior a $10^{-8}M$, medido por ressonância plasmônica de superfície;
- (c) demonstra meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) superior a 75 minutos;
- (d) demonstra neutralização dos vírus do grupo 2 da influenza A selecionados das cepas H3N2 e H7N9 com um IC_{50} inferior a 200 nM e 500nM, respectivamente;
- (e) demonstra lise mediada por complemento de células infectadas pelo vírus da influenza com um EC_{50} inferior a cerca de 150 nM;
- (f) demonstra citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos de células-alvo infectadas por vírus usando um bioensaio repórter com um EC_{50} inferior a cerca de 0,9 nM;
- (g) demonstra citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos de células-alvo infectadas por vírus na presença de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) com um EC_{50} inferior a cerca de 0,180 nM;
- (h) demonstra um aumento na sobrevida em um animal infectado por influenza quando administrado 24, 48, 72 ou 96 horas após o desafio do vírus;
- (i) demonstra um aumento na sobrevida em um animal infectado por influenza quando administrado em combinação com oseltamivir 96 horas após a infecção; ou

(j) em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende três regiões determinantes da complementaridade da cadeia pesada (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas em qualquer uma das sequências da região variável da cadeia pesada (HCVR) listadas na Tabela 1; e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em qualquer uma das sequências da região variável da cadeia leve (LCVR) listadas na Tabela 1.

[0016] Em certas modalidades, um anticorpo da invenção demonstra um aumento na proteção quando administrado a um mamífero infectado pelo vírus influenza como uma dose intravenosa única de cerca de 7 a 15 mg/kg a partir do dia 3 após a infecção em comparação com a administração oral de oseltamivir administrado duas vezes diariamente durante 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg, começando no dia 3 após a infecção (e continuando até o dia 7 após a infecção).

[0017] Em uma modalidade relacionada, um anticorpo da invenção confere um aumento na proteção em um mamífero infectado com o vírus da influenza quando administrado por via subcutânea ou intravenosa e/ou quando administrado antes da infecção ou após a infecção pelo vírus da influenza.

[0018] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção demonstra um aumento na proteção, em comparação com um animal administrado com um anticorpo de controle isotipo (negativo), quando administrado a um mamífero infectado como uma única dose subcutânea ou intravenosa que varia de cerca de 5 mg/kg a cerca de 15 mg/kg.

[0019] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção demonstra um aumento na proteção quando administrado a um mamífero infectado pelo vírus influenza como uma dose intravenosa única de cerca de 7 mg/kg a cerca de 15 mg/kg em comparação com a administração oral de oseltamivir administrado duas vezes ao dia por 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg.

[0020] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção demonstra uma taxa de sobrevivência de cerca de 100% em um mamífero infectado com o vírus da influenza, quando administrado como uma dose única de cerca de 15 mg/kg, 24 horas ou mais após a infecção.

[0021] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção demonstra uma taxa de sobrevivência de 100% em um mamífero infectado com o vírus da influenza, quando administrado como uma dose intravenosa única de cerca de 15 mg/kg às 24, 48, 72 ou 96 horas após a infecção.

[0022] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção demonstra uma taxa de sobrevivência de cerca de 100% em um mamífero infectado pelo vírus da influenza, quando administrado como uma dose intravenosa única de cerca de 15 mg/kg, em comparação com uma taxa de sobrevivência de 80% observada com oseltamivir quando administrado por via oral duas vezes por dia durante 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg.

[0023] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção fornece um efeito protetor aditivo em um mamífero infectado com vírus influenza quando administrado com oseltamivir por mais de 48 horas após a infecção.

[0024] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção fornece um efeito protetor aditivo em um mamífero infectado com vírus influenza quando administrado com oseltamivir 72 horas após a infecção.

[0025] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção fornece um efeito protetor aditivo quando usado em combinação com oseltamivir quando o anticorpo é administrado a um mamífero infectado pelo vírus da influenza como uma dose intravenosa única que varia de cerca de 7 mg/kg a cerca de 15 mg/kg e o oseltamivir é administrado por via oral duas vezes ao dia por 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg.

[0026] Em uma modalidade relacionada, um anticorpo da invenção fornece um efeito protetor aditivo quando usado em combinação com oseltamivir 96 horas após a infecção pelo vírus influenza, em que o anticorpo

é administrado como uma dose intravenosa única que varia de cerca de 7 mg/kg a cerca de 15 mg/kg e o oseltamivir é administrado por via oral duas vezes ao dia por 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg.

[0027] Em uma modalidade, um anticorpo da invenção pode ser administrado por via intravenosa, intranasal, subcutânea, intradérmica ou intramuscular e o oseltamivir pode ser administrado por via oral.

[0028] Em uma modalidade, o oseltamivir é administrado antes, simultaneamente ou após a administração de um anticorpo da invenção.

[0029] Em uma modalidade, o anticorpo e/ou o oseltamivir podem ser administrados como uma dose única ou como doses múltiplas.

[0030] Anticorpos de HA do grupo 2 anti-influenza A exemplificativos da presente invenção estão listados nas Tabelas 1 e 2 deste documento. A Tabela 1 apresenta os identificadores da sequência de aminoácidos das regiões variáveis de cadeia pesada (HCVRs), regiões variáveis de cadeia leve (LCVRs), regiões determinantes da complementaridade de cadeia pesada (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) e regiões determinantes da complementaridade de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) de exemplos de anticorpos anti-influenza HA. A Tabela 2 apresenta os identificadores de sequência de ácido nucleico dos HCVRs, LCVRs, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3 dos exemplos de anticorpos anti-influenza HA.

[0031] A presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma HCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos da HCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0032] Em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, que se ligam especificamente ao grupo 2

HA da influenza A, compreendendo uma HCVR com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 2 ou 18.

[0033] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma LCVR compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCVR listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0034] Em uma modalidade, a invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, que se ligam especificamente ao grupo 2 HA da influenza A, compreendendo uma LCVR com uma sequência de aminoácidos de SEQ ID NOs: 10 ou 26.

[0035] Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente ao grupo 2 HA da influenza A compreende um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10 ou 18/26.

[0036] Em certas modalidades, o par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10 (por exemplo, H1H14611N2) ou 18/26 (por exemplo, H1H14612N2).

[0037] Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno compreende:

(a) um domínio HCDR1 com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4 ou 20;

(b) um domínio HCDR2 com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 6 ou 22;

(c) um domínio HCDR3 com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8 ou 24;

(d) um domínio LCDR1 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 12 ou 28;

(e) um domínio LCDR2 com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 14 ou 30; e

(f) um domínio LCDR3 com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 16 ou 32.

[0038] Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno, que se liga especificamente ao grupo 2 HA da influenza A, compreende (a) uma HCDR1 da SEQ ID NO: 4, (b) uma HCDR2 da SEQ ID NO: 6; (c) uma HCDR3 da SEQ ID NO: 8; (d) uma LCDR1 da SEQ ID NO: 12; (e) uma LCDR2 da SEQ ID NO: 14 e (f) uma LCDR3 da SEQ ID NO: 16.

[0039] Em uma modalidade, o anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno, que se liga especificamente à HA do grupo 2 da influenza A, compreende (a) uma HCDR1 da SEQ ID NO: 20, (b) uma HCDR2 da SEQ ID NO: 22; (c) uma HCDR3 da SEQ ID NO: 24; (d) uma LCDR1 da SEQ ID NO: 28; (e) uma LCDR2 da SEQ ID NO: 30 e (f) uma LCDR3 da SEQ ID NO: 32.

[0040] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR1 de cadeia pesada (HCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR1 listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante possuindo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0041] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR2 de cadeia pesada (HCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR2 listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de

sequência.

[0042] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR3 de cadeia pesada (HCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCDR3 listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0043] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR1 de cadeia leve (LCDR1) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR1 listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0044] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR2 de cadeia leve (LCDR2) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR2 listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0045] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo uma CDR3 de cadeia leve (LCDR3) compreendendo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCDR3 listadas na Tabela 1, ou uma sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0046] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um par de sequências de aminoácidos HCDR3 e LCDR3 (HCDR3/LCDR3) compreendendo qualquer

uma das seqüências de aminoácidos HCDR3 listadas na Tabela 1, emparelhadas com qualquer uma das seqüências de aminoácidos LCDR3 listadas na Tabela 1. De acordo com certas modalidades, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um par de seqüências de aminoácidos HCDR3/LCDR3 contido em qualquer um dos anticorpos HA de grupo 2 anti-influenza A exemplificativos listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o par de seqüências de aminoácidos HCDR3/LCDR3 é selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8/16 (por exemplo, H1H14611N2) ou 24/32 (por exemplo, H1H14612N2).

[0047] A presente invenção também fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um conjunto de seis CDRs (ou seja, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contido em qualquer um dos exemplos de anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza A listados na Tabela 1. Em certas modalidades, o conjunto de seqüências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 é selecionado a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4-6-8-12-14-16 (por exemplo, H1H14611N2); ou SEQ ID NOs: 20-22-24-28-30-32 (por exemplo, H1H14612N2).

[0048] Em uma modalidade relacionada, a presente invenção fornece anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo um conjunto de seis CDRs (ou seja, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3) contido em um par de seqüências de aminoácidos HCVR/LCVR, conforme definido por qualquer um dos anticorpos de HA do grupo 2 anti-influenza A exemplificativos listados na Tabela 1. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos, ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, compreendendo as seqüências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 definidas em um par de seqüências de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10 (por

exemplo, H1H14611N2) ou SEQ ID NOs: 18/26 (por exemplo, H1H14612N2). Métodos e técnicas para identificar CDRs nas sequências de aminoácidos de HCVR e LCVR são bem conhecidos na técnica e podem ser usados para identificar CDRs nas sequências de aminoácidos de HCVR e/ou LCVR especificadas divulgadas neste documento. Convenções exemplares que podem ser usadas para identificar os limites das CDRs incluem, por exemplo, a definição de Kabat, a definição de Chothia e a definição de AbM. Em termos gerais, a definição de Kabat baseia-se na variabilidade da sequência, a definição de Chothia baseia-se na localização das regiões de alça estrutural e a definição AbM é um ajuste entre as abordagens de Kabat e Chothia. *Ver, por exemplo*, Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani *et al.*, *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); e Martin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EUA* 86:9268-9272 (1989). Bancos de dados públicos também estão disponíveis para identificar sequências de CDR em um anticorpo.

[0049] A presente invenção também fornece anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que competem pela ligação específica aa HA do grupo 2 da influenza A com um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, compreendendo as CDRs de uma HCVR e as CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e a LCVR, cada, possuem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das sequências HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[0050] A presente invenção também fornece anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que competem cruzadamente pela ligação aa HA do grupo 2 da influenza A ou que se ligam ao mesmo epítopo no grupo 2 HA da influenza A, como um anticorpo de referência ou seu fragmento de ligação ao antígeno, compreendendo as CDRs de uma HCVR e CDRs de uma LCVR, em que a HCVR e a LCVR possuem uma sequência de aminoácidos selecionada a partir das sequências da HCVR e LCVR listadas na Tabela 1.

[0051] A presente invenção também fornece anticorpos isolados e seus fragmentos de ligação ao antígeno que bloqueiam a ligação da HA do grupo 2 da influenza A e/ou a entrada em uma célula hospedeira.

[0052] Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção são biespecíficos compreendendo uma primeira especificidade de ligação a um primeiro epítopo na HA 2 do grupo influenza A e uma segunda especificidade de ligação a outro antígeno.

[0053] Em um segundo aspecto, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza A ou porções dos mesmos. Por exemplo, a presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos da HCVR listadas na Tabela 2; em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada a partir de qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos da HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante tendo pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0054] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCVR listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0055] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR1 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre

qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de HCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0056] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR2 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de HCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0057] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de HCDR3 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de HCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0058] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR1 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de LCDR1 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0059] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos

que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR2 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de LCDR2 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0060] A presente invenção fornece moléculas de ácidos nucleicos que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos de LCDR3 listadas na Tabela 1; em determinadas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de LCDR3 listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência.

[0061] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam uma HCVR, em que a HCVR compreende um conjunto de três CDRs (ou seja, HCDR1-HCDR2-HCDR3), em que o conjunto de sequências de aminoácidos HCDR1-HCDR2-HCDR3 é como definido por qualquer um dos anticorpos HA anti-influenza exemplares listados na Tabela 1.

[0062] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam uma LCVR, em que a LCVR compreende um conjunto de três CDRs (ou seja, LCDR1-LCDR2-LCDR3), em que o conjunto de sequências de aminoácidos LCDR1-LCDR2-LCDR3 é como definido por qualquer um dos anticorpos HA anti-influenza exemplares listados na Tabela 1.

[0063] A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam uma HCVR e uma LCVR, em que a HCVR

compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das sequências de aminoácidos da HCVR listadas na Tabela 1 e em que a LCVR compreende uma sequência de aminoácidos de qualquer uma das sequências de aminoácidos LCVR listadas na Tabela 1. Em certas modalidades, a molécula de ácido nucleico compreende uma sequência polinucleotídica selecionada de qualquer uma das sequências de ácido nucleico de HCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência, e uma sequência polinucleotídica selecionada dentre qualquer uma das sequências de ácidos nucleicos de LCVR listadas na Tabela 2, ou uma sequência substancialmente semelhante a esta com pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 98% ou pelo menos 99% de identidade de sequência. Em certas modalidades de acordo com este aspecto da invenção, a molécula de ácido nucleico codifica uma HCVR e LCVR, em que a HCVR e a LCVR são ambas derivadas do mesmo anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A listado na Tabela 1.

[0064] A presente invenção fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos da cadeia pesada listadas na Tabela 1. A presente invenção também fornece moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de aminoácidos da cadeia leve listadas na Tabela 1.

[0065] Em um aspecto relacionado, a presente invenção fornece vetores de expressão recombinantes capazes de expressar um polipeptídeo compreendendo uma região variável da cadeia pesada ou leve de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A. Por exemplo, a presente invenção inclui vetores de expressão recombinantes compreendendo qualquer uma das moléculas de ácido nucleico mencionadas acima, ou seja, moléculas de ácido nucleico que codificam qualquer uma das sequências de HCVR, LCVR e/ou CDR, conforme estabelecido na Tabela 1. Também incluídos

dentro do escopo da presente invenção são células hospedeiras em que tais vetores foram introduzidos, bem como métodos de produção de anticorpos ou porções deles por meio da cultura das células hospedeiras em condições que permitem a produção de anticorpos ou fragmentos de anticorpos, e recuperação dos anticorpos e fragmentos de anticorpos assim produzidos.

[0066] Em um terceiro aspecto, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz de pelo menos um anticorpo monoclonal recombinante ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente aa HA do grupo 2 da influenza A e a um carreador farmacêuticamente aceitável. Em um aspecto relacionado, a invenção apresenta uma composição, que é uma combinação de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A e um segundo agente terapêutico. Em uma modalidade, o segundo agente terapêutico é qualquer agente que é vantajosamente combinado com um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza. Agentes exemplares que podem ser vantajosamente combinados com um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza incluem, sem limitação, outros agentes que ligam e/ou inibem a atividade de HA da influenza (incluindo outros anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno, etc.) e/ou agentes que não se ligam diretamente à HA da influenza, mas inibem a atividade viral, incluindo a infectividade das células hospedeiras. Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo: (a) um primeiro anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo; (b) um segundo anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A ou seu fragmento de ligação ao antígeno, em que o primeiro anticorpo se liga a um primeiro epítipo na HA do grupo 2 da influenza A e o segundo anticorpo se liga a um segundo epítipo na HA do grupo 2 da influenza A em que o primeiro e o segundo epítipos são distintos e não se sobrepõem; e (c) um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição

farmacêutica compreendendo: (a) um primeiro anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo; (b) um segundo anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A ou um seu fragmento de ligação ao antígeno, em que o primeiro anticorpo não concorre com o segundo anticorpo para a ligação aa HA do grupo 2 da influenza A; e (c) um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo: (a) um primeiro anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo; (b) um segundo anticorpo anti-influenza ou seu fragmento de ligação ao antígeno, que interage com um antígeno influenza diferente, em que o primeiro anticorpo se liga a um epítopo da HA da influenza A do grupo 2 e o segundo anticorpo se liga a um epítopo de um influenza diferente antígeno; e (c) um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Em certas modalidades, a invenção fornece uma composição farmacêutica compreendendo: (a) um primeiro anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A ou um fragmento de ligação a antígeno do mesmo; (b) um segundo anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno, que interage com um antígeno viral (não influenza) diferente, em que o primeiro anticorpo se liga a um epítopo no grupo 2 HA da influenza A e o segundo anticorpo se liga a um epítopo em um antígeno viral (não influenza) diferente; e (c) um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável. Terapias combinadas e co-formulações adicionais envolvendo os anticorpos HA do grupo 2 anti-influenza A da presente invenção são divulgadas em outras partes deste documento.

[0067] Em um quarto aspecto, a invenção fornece métodos terapêuticos para o tratamento de uma doença ou distúrbio associado aa HA do grupo 2 da influenza A (como infecção viral em um indivíduo) ou pelo menos um sintoma associado à infecção viral, usando um anticorpo HA anti-influenza A do grupo 2 ou porção de ligação ao antígeno de um anticorpo da

invenção, em que os métodos terapêuticos compreendem a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da invenção ao indivíduo em necessidade do mesmo. O distúrbio tratado é qualquer doença ou condição que é melhorada, mitigada, inibida ou impedida pela inibição da atividade de HA da influenza. Em certas modalidades, a invenção fornece métodos para prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um sintoma da infecção por influenza A, o método compreendendo a administração de uma quantidade terapêuticamente eficaz de um anticorpo HA anti-influenza ou seu fragmento de ligação a antígeno da invenção a um indivíduo em necessidade disso.

[0068] Em algumas modalidades, a presente invenção fornece métodos para melhorar ou reduzir a gravidade, duração ou frequência de ocorrência de pelo menos um sintoma de infecção por influenza em um indivíduo, administrando um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A da invenção, em que pelo menos um sintoma é selecionado do grupo que consiste em dor de cabeça, febre, dores, rinorréia (congestão nasal), calafrios, fadiga, fraqueza, dor de garganta, tosse, falta de ar, vômito, diarreia, pneumonia, bronquite e morte.

[0069] Em certas modalidades, a invenção fornece métodos para diminuir a carga viral em um indivíduo, os métodos compreendendo a administração ao indivíduo de uma quantidade eficaz de um anticorpo ou fragmento do mesmo da invenção que liga a HA do grupo 2 da influenza A e bloqueia a ligação do vírus da influenza e/ou a entrada na célula hospedeira.

[0070] Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno pode ser administrado profilaticamente ou terapêuticamente a um indivíduo com, ou em risco de ter, ou pré-disposto para desenvolver uma infecção por influenza. Os indivíduos em risco incluem, mas não estão limitados a, uma pessoa imunocomprometida, por

exemplo, uma pessoa imunocomprometida por causa de doença autoimune ou aquelas que recebem terapia imunossupressora (por exemplo, após o transplante de órgão) ou as pessoas afetadas por síndrome de imunodeficiência humana (HIV) ou síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), certas formas de anemia que empobrecem ou destroem os glóbulos brancos, as pessoas que recebem radiação ou quimioterapia ou as pessoas afetadas por um distúrbio inflamatório. Outros indivíduos em risco de adquirir uma infecção por influenza incluem um adulto idoso (mais de 65 anos), crianças com menos de 2 anos de idade, profissionais de saúde e pessoas com condições médicas subjacentes, como infecção pulmonar, doença cardíaca ou diabetes. Além disso, qualquer pessoa que tenha contato físico ou proximidade física com um indivíduo infectado tem um risco aumentado de desenvolver uma infecção pelo vírus influenza. Além disso, um indivíduo corre o risco de contrair uma infecção por influenza devido à proximidade de um surto da doença, por exemplo, reside em uma cidade densamente povoada ou nas proximidades de indivíduos com infecções confirmadas ou suspeitas de vírus da influenza ou escolha de emprego, por exemplo, funcionário de hospital, pesquisador farmacêutico, viajante da área infectada ou passageiro frequente.

[0071] Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção é administrado em combinação com um segundo agente terapêutico ao indivíduo em necessidade. O segundo agente terapêutico pode ser selecionado do grupo que consiste em um fármaco anti-inflamatório (como corticosteróides e fármacos anti-inflamatórios não esteroidais), um fármaco anti-infeccioso, um anticorpo diferente para a HA da influenza, um anticorpo para um diferente antígeno da influenza (por exemplo, neuraminidase), um medicamento antiviral, um descongestionante, um anti-histamínico, uma vacina para influenza, um suplemento dietético como antioxidantes e qualquer outro medicamento ou terapia conhecido na

técnica útil para melhorar pelo menos um sintoma da infecção por influenza ou para reduzir a carga viral em um paciente. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico pode ser um agente que ajuda a neutralizar ou reduzir qualquer efeito colateral possível associado a um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno da invenção, se tais efeitos colaterais ocorrerem. O anticorpo ou seu fragmento pode ser administrado por via subcutânea, intravenosa, intradérmica, intraperitoneal, oral, intranasal, intramuscular ou intracraniana. Em uma modalidade, o anticorpo pode ser administrado como uma infusão intravenosa única para concentração máxima do anticorpo no soro do indivíduo. O anticorpo ou seu fragmento pode ser administrado a uma dose de cerca de 0,01 mg/kg de peso corporal a cerca de 100 mg/kg de peso corporal do indivíduo. Em certas modalidades, um anticorpo da presente invenção pode ser administrado em uma ou mais doses compreendendo entre 50 mg a 5000 mg.

[0072] A presente invenção também inclui o uso de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção para tratar uma doença ou distúrbio que se beneficiaria do bloqueio da ligação e/ou atividade da HA da influenza. A presente invenção também inclui o uso de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença ou distúrbio que se beneficiaria do bloqueio da ligação aa HA da influenza e/ou atividade.

[0073] Outras modalidades ficarão evidentes a partir de uma revisão da descrição detalhada subsequente.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[0074] Figuras 1A, 1B, 1C: Mostram que uma dose única de H1H14611N2 e H1H14612N2 neutraliza potentemente três cepas diferentes de vírus da influenza A do grupo 2 *in vitro*. 1A: A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2); 1B: A/Filipinas/01/1982 (H3N2) and 1C: A/Xangai/01/2013-PR8

(H7N9).

[0075] Figura 2: Mostra que H1H14611N2 e H1H14612N2 mediam acitotoxicidade complemento-dependente de células infectadas com A/Aichi/02/1968-PR8-X31.

[0076] Figura 3: Mostra uma curva de resposta à dose de anticorpos HA anti-grupo 2, anticorpos H1H14611N2 e H1H14612N2 em um ensaio de ativação de FcγRIIIA.

[0077] Figura 4: Mostra uma curva de resposta à dose dos anticorpos H1H14611N2 e H1H14612N2 do anti-grupo 2 em um ensaio ADCC usando PBMCs de doadores humanos.

[0078] Figuras 5A, 5B, 5C: Mostram que uma dose única de antianticorpos anti-HA do grupo 2 H1H14611N2 e H1H14612N2 demonstram proteção completa contra uma infecção letal por influenza quando administrados em dose única de 15 mg/kg nas 24 (A), 48 (B) ou 72 (C) horas após a infecção com 5X MLD₅₀ de A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2).

[0079] Figura 6: Mostra que o anticorpo HA anti-grupo 2 H1H14611N2 tem um efeito aditivo no tratamento da infecção por influenza quando administrado em combinação com oseltamivir 96 horas após a infecção.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0080] Antes de os métodos presentes serem descritos, entende-se que esta invenção não esteja limitada a métodos particulares e condições experimentais descritas, visto que estes métodos e condições podem variar. Entende-se também que a terminologia usada neste documento tem o propósito de descrever modalidades particulares apenas, e não se destina a ser um fator limitante, uma vez que o escopo da presente invenção estará limitado apenas pelas reivindicações anexas.

[0081] Salvo definido em contrário, todos os termos técnicos e

científicos usados neste documento têm o mesmo significado comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual esta invenção pertence. Embora quaisquer métodos e materiais semelhantes ou equivalentes aos aqui descritos possam ser utilizados na prática ou no teste da presente invenção, métodos e materiais preferenciais são agora descritos. Todas as publicações mencionadas aqui são incorporadas por referência em sua integralidade.

Definições

[0082] O termo "hemaglutinina da influenza", também chamado de "HA da influenza" é uma glicoproteína trimérica encontrada na superfície dos virions da influenza, que medeia a ligação viral (via ligação HA1 aos ácidos α -2,3- ou α -2,6-siálico) e entrada (através de alterações conformacionais) nas células hospedeiras. A HA é composta por dois domínios estruturais: um domínio da cabeça globular contendo o local de ligação ao receptor (sujeito a alta frequência de mutações antigênicas) e a região do tronco (mais conservada entre várias cepas do vírus influenza). A HA da influenza é sintetizado como um precursor (HA0) que sofre processamento proteolítico para produzir duas subunidades (HA1 e HA2), que se associam para formar a estrutura do tronco/cabeça globular. A HA viral é o antígeno mais variável do vírus (18 subtipos podem ser classificados em dois grupos), mas o tronco (HA2) é altamente conservado em cada grupo.

[0083] A sequência de aminoácidos do Influenza HA completo é exemplificada pela sequência de aminoácidos do isolado da influenza H3N2A/Wisconsin/67/X-161/2005 fornecida no GenBank como número de acesso ACF41911.1 (Também mostrado aqui como SEQ ID NO: 33) ou H7N7A/galinha/Holanda/01/2003, número de acesso AAR02640.1 (também mostrado aqui como SEQ ID NO: 34). O termo "influenza-HA" também inclui variantes de proteínas da influenza HA isoladas de diferentes isolados de influenza. O termo "influenza-HA" também inclui HA influenza recombinante ou um fragmento da mesma. O termo também abrange

influenza HA ou um seu fragmento acoplado a, por exemplo, marcador de histidina, Fc de camundongo ou humano, ou uma sequência de sinal.

[0084] O termo "infecção por influenza", conforme usado aqui, também caracterizado como "gripe" refere-se à doença respiratória aguda grave causada pelo vírus da influenza. O termo inclui infecção do trato respiratório e os sintomas que incluem febre alta, dor de cabeça, dores em geral, fadiga e fraqueza, em alguns casos exaustão extrema, nariz entupido, espirros, dor de garganta, desconforto no peito, tosse, falta de ar, bronquite, pneumonia e morte em casos graves.

[0085] O termo "anticorpo", como aqui utilizado, pretende se referir a moléculas de imunoglobulina compostas por quatro cadeias polipeptídicas, duas cadeias pesadas (H) e duas cadeias leves (L) interconectadas por ligações dissulfeto (ou seja, "moléculas de anticorpo completas"), bem como seus multímeros (por exemplo, IgM) ou seus fragmentos de ligação ao antígeno. Cada cadeia pesada é composta por uma região variável de cadeia pesada ("HCVR" ou "V_H") e uma região constante de cadeia pesada (composta por domínios C_{H1}, C_{H2} e C_{H3}). Cada cadeia leve é composta por uma região variável da cadeia leve ("LCVR ou" V_L") e uma região constante da cadeia leve (C_L). As regiões V_H e V_L podem ser subdivididas em regiões de hipervariabilidade, denominadas regiões determinantes de complementaridade (CDR), intercaladas com regiões mais conservadas, denominadas regiões estruturais (FR). Cada V_H e V_L é composta por três CDRs e quatro FRs, dispostas do terminal amino ao terminal carboxi na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Em certas modalidades da invenção, as FRs do anticorpo (ou seu fragmento de ligação ao antígeno) podem ser idênticas às sequências da linha germinativa humana ou podem ser modificadas natural ou artificialmente. Uma sequência consenso de aminoácidos pode ser definida com base em uma análise lado-a-lado de duas ou mais CDRs.

[0086] A substituição de um ou mais resíduos de CDR ou omissão de uma ou mais CDRs também é possível. Anticorpos foram descritos na literatura científica em que uma ou duas CDRs podem ser dispensados com para ligação. Padlan *et al.* (1995 FASEB J. 9:133-139) analisaram as regiões de contato entre anticorpos e seus antígenos, com base em estruturas cristalinas publicadas e concluíram que apenas cerca de um quinto a um terço dos resíduos de CDR realmente entram em contato com o antígeno. Padlan também encontrou muitos anticorpos nos quais uma ou duas CDRs não tinham aminoácidos em contato com um antígeno (ver também, Vajdos *et al.* 2002 J Mol Biol 320:415-428).

[0087] Resíduos de CDR que não entram em contato com o antígeno podem ser identificados com base em estudos anteriores (por exemplo, resíduos H60-H65 em CDRH2 são muitas vezes não necessários), de regiões de CDRs de Kabat situadas fora de CDRs de Chothia, por modelagem molecular e/ou empiricamente. Se uma CDR ou resíduo(s) dela for(em) omitido(s), geralmente é substituída por um aminoácido ocupado pela posição correspondente em outra sequência de anticorpo humano ou um consenso de tais sequências. As posições para substituição dentro de CDRs e aminoácidos para substituir também podem ser selecionadas empiricamente. Substituições empíricas podem ser substituições conservadoras ou não conservadoras.

[0088] Os anticorpos monoclonais anti-influenza-HA totalmente humanos aqui divulgados podem compreender uma ou mais substituições, inserções e/ou deleções de aminoácidos na estrutura e/ou regiões CDR dos domínios variáveis da cadeia pesada e leve em comparação com as sequências correspondentes da linha germinativa. Tais mutações podem ser facilmente atribuídas comparando as sequências de aminoácidos divulgadas neste documento a sequências de linhagem germinativa disponíveis em, por exemplo, bancos de dados de sequência de anticorpos públicos. A presente invenção inclui anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno, que são

derivados de qualquer uma das sequências de aminoácidos divulgadas neste documento, em que um ou mais aminoácidos dentro de uma ou mais regiões de estrutura e/ou CDR são mutados para o(s) resíduo(s) correspondente(s) da sequência da linha germinativa da qual o anticorpo foi derivado, ou do(s) resíduo(s) correspondente(s) de outra sequência da linha germinativa humana, ou a uma substituição conservadora de aminoácidos do(s) resíduo(s) da(s) linha(s) germinativa(s) como "mutações na linha germinativa"). Uma pessoa versada na técnica, começando com as sequências de região variável de cadeia pesada e leve divulgadas neste documento, pode facilmente produzir inúmeros anticorpos e fragmentos de ligação a antígeno que compreendem uma ou mais mutações de linhagem germinativa individuais ou combinações delas. Em certas modalidades, toda a estrutura e/ou resíduos de CDR dentro dos domínios V_H e/ou V_L são mutados de volta aos resíduos encontrados na sequência germinativa original da qual o anticorpo foi derivado. Em outras modalidades, apenas certos resíduos são transformados de volta à sequência original da linha germinativa, por exemplo, apenas os resíduos mutados encontrados nos primeiros 8 aminoácidos de FR1 ou nos últimos 8 aminoácidos de FR4 ou apenas os resíduos mutados encontrados em CDR1, CDR2 ou CDR3. Em outras modalidades, um ou mais da estrutura e/ou resíduo(s) de CDR são mutados no(s) resíduo(s) correspondente(s) de uma sequência de linha germinativa diferente (ou seja, uma sequência da linha germinativa diferente da sequência da linha germinativa da qual o anticorpo foi originalmente derivado). Além disso, os anticorpos da presente invenção podem conter qualquer combinação de duas ou mais mutações na linha germinativa dentro da estrutura e/ou regiões CDR, por exemplo, em que certos resíduos individuais são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linha germinativa específica, enquanto outros resíduos que diferem da sequência de linha germinativa original são mantidos ou são mutados para o resíduo correspondente de uma sequência de linha

germinativa diferente. Uma vez obtidos, os anticorpos e os fragmentos de ligação ao antígeno que contêm uma ou mais mutações na linha germinativa podem ser facilmente testados para uma ou mais propriedades desejadas, como especificidade de ligação aprimorada, afinidade de ligação aumentada, propriedades biológicas antagonistas ou agonísticas aprimoradas ou melhoradas (conforme o caso) imunogenicidade reduzida, etc. Os anticorpos e fragmentos de ligação ao antígeno obtidos desta maneira geral estão incluídos na presente invenção.

[0089] A presente invenção também inclui anticorpos monoclonais anti-influenza-HA totalmente humanos compreendendo variantes de qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR, LCVR e/ou CDR aqui divulgadas tendo uma ou mais substituições conservadoras. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-influenza-HA com sequências de aminoácidos HCVR, LCVR e/ou CDR com, por exemplo, 10 ou menos, 8 ou menos, 6 ou menos, 4 ou menos, etc. substituições conservadoras de aminoácidos em relação a qualquer uma das sequências de aminoácidos HCVR, LCVR e/ou CDR aqui divulgadas.

[0090] O termo "anticorpo humano", como aqui utilizado, pretende incluir anticorpos com regiões variáveis e constantes derivadas de sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os mAbs humanos da invenção podem incluir resíduos de aminoácidos não codificados por sequências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas por mutagênese aleatória ou específica do local *in vitro* ou por mutação somática *in vivo*), por exemplo, nas CDRs e, em particular, CDR3. No entanto, o termo "anticorpo humano", conforme usado aqui, não se destina a incluir mAbs nos quais as sequências de CDR derivadas da linha germinativa de outras espécies de mamíferos (por exemplo, camundongo) foram enxertadas em sequências FR humanas. O termo inclui anticorpos produzidos de forma recombinante em um mamífero não humano ou em

células de um mamífero não humano. O termo não se destina a incluir anticorpos isolados de ou gerados em um sujeito humano.

[0091] O termo "recombinante", como aqui utilizado, refere-se a anticorpos ou seus fragmentos de ligação a antígeno da invenção criados, expressos, isolados ou obtidos por tecnologias ou métodos conhecidos na técnica como tecnologia de DNA recombinante, que incluem, por exemplo, splicing de DNA e expressão transgênica. O termo refere-se a anticorpos expressos em mamíferos não humanos (incluindo mamíferos transgênicos não humanos, por exemplo, camundongos transgênicos) ou uma célula (por exemplo, células CHO) ou isolados a partir de uma biblioteca de anticorpos humanos combinatória recombinante.

[0092] O termo "se liga especificamente", ou "se liga especificamente a", ou similares, significa que um anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno dele forma um complexo com um antígeno que é relativamente estável sob condições fisiológicas. A ligação específica pode ser caracterizada por uma constante de dissociação de equilíbrio de pelo menos cerca de 1×10^{-8} M ou menos (por exemplo, um K_D menor denota uma ligação mais apertada). Os métodos para determinar se duas moléculas se ligam especificamente são bem conhecidos na técnica e incluem, por exemplo, diálise de equilíbrio, ressonância plasmônica de superfície e similares. Como aqui descrito, os anticorpos foram identificados por um teste de interferometria de biocamada livre de marcador em tempo real em um biossensor Octet® HTX, que se liga especificamente à HA da influenza. Além disso, os anticorpos multiespecíficos que se ligam a um domínio na HA da influenza e um ou mais antígenos adicionais ou um biespecífico que se liga a duas regiões diferentes da HA da influenza são, no entanto, considerados anticorpos que "se ligam especificamente", como usado aqui.

[0093] O termo anticorpo de "alta afinidade" refere-se aos mAbs com uma afinidade de ligação à HA da influenza, expresso como K_D , de pelo

menos 10^{-8} M; preferencialmente 10^{-9} M; mais preferencialmente 10^{-10} M, ainda mais preferencialmente 10^{-11} M, ainda mais preferencialmente 10^{-12} M, medido em tempo real, pelo teste de interferometria de biocamada sem marcador, por exemplo, um biossensor Octet® HTX ou por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, BIACORE™ ou por ELISA de afinidade por solução.

[0094] O termo "taxa de desaceleração", "Koff" ou "kd" significa um anticorpo que se dissocia da HA da influenza, com uma taxa constante de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ou menos, preferencialmente $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ou menos, conforme determinado em tempo real, pelo teste de interferometria de camada biológica livre de marcador, por exemplo, um biossensor Octet® HTX ou por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, BIACORE™.

[0095] Os termos "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo, e similares, conforme usado neste documento, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtenível, sintética ou geneticamente manipulada que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", como aqui utilizados, referem-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar à Influenza HA.

[0096] Em modalidades específicas, o anticorpo ou fragmentos de anticorpo da invenção podem ser conjugados a uma fração tal ligante ou fração terapêutica ("imunoconjugado"), como um fármaco antiviral, um segundo anticorpo anti-influenza ou qualquer outra fração terapêutica útil para tratar uma infecção causada pelo vírus influenza.

[0097] Um "anticorpo isolado", como aqui utilizado, destina-se a se referir a um anticorpo substancialmente livre de outros anticorpos (Abs) com diferentes especificidades antigênicas (por exemplo, um anticorpo isolado que

se liga especificamente à HA da influenza ou um fragmento do mesmo está substancialmente livre de Abs que se liga especificamente a outros antígenos que não a HA da influenza.

[0098] Um "anticorpo bloqueador" ou um "anticorpo neutralizante", conforme usado aqui (ou um "anticorpo que neutraliza a atividade da HA da influenza" ou "anticorpo antagonista"), pretende se referir a um anticorpo cuja ligação à HA da influenza resulta em inibição de pelo menos uma atividade biológica da influenza-HA. Por exemplo, um anticorpo da invenção pode impedir ou bloquear a ligação à influenza ou a entrada em uma célula hospedeira. Além disso, um "anticorpo neutralizante" é aquele que pode neutralizar, isto é, impedir, inibir, reduzir ou interferir com a capacidade de um patógeno de iniciar e/ou perpetuar uma infecção em um hospedeiro. Os termos "anticorpo neutralizante" e "um anticorpo que neutraliza" ou "anticorpos que neutralizam" são usados aqui de forma intercambiável. Estes anticorpos podem ser utilizados, isoladamente ou em combinação, como agentes profiláticos ou terapêuticos com outros agentes antivirais mediante formulação apropriada, ou em associação com a vacinação ativa, ou como uma ferramenta de diagnóstico.

[0099] O termo "ressonância plasmônica de superfície" refere-se a um fenômeno óptico que permite a análise de interações biomoleculares em tempo real pela detecção de alterações nas concentrações de proteínas dentro de uma matriz de biossensores, por exemplo, usando o sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suécia e Piscataway, NJ).

[00100] A interferometria de camada biológica é uma tecnologia sem marcador para medir interações biomoleculares. É uma técnica analítica óptica que analisa o padrão de interferência da luz branca refletida em duas superfícies: uma camada de proteína imobilizada na ponta do biossensor e uma camada de referência interna. Qualquer alteração no número de moléculas ligadas à ponta do biossensor causa uma alteração no padrão de

interferência que pode ser medida em tempo real (Abdiche, YN, *et al.* Analytical Biochemistry, (2008), 377(2), 209-217). Em certas modalidades da invenção, um "biossensor baseado em interferômetro de camada biológica em tempo real (ensaio Octet HTX)" foi usado para avaliar as características de ligação de alguns dos anticorpos anti-influenza HA.

[00101] O termo " K_D ", como aqui utilizado, pretende referir-se à constante de dissociação de equilíbrio de uma interação anticorpo-antígeno particular.

[00102] O termo "epítopo" refere-se a um determinante antigênico que interage com um sítio de ligação a antígeno específico na região variável de uma molécula de anticorpo conhecida como um parátopo. Um único antígeno pode ter mais de um epítopo. Assim, diferentes anticorpos podem se ligar a diferentes áreas em um antígeno e podem ter efeitos biológicos diferentes. O termo "epítopo" também se refere a um sítio em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Refere-se também a uma região de um antígeno que é ligada por um anticorpo. Os epítopos podem ser definidos como estrutural ou funcional. Epítopos funcionais são geralmente um subconjunto dos epítopos estruturais e possuem aqueles resíduos que contribuem diretamente para a afinidade da interação. Epítopos podem também ser conformacionais, isto é, composto de aminoácidos não lineares. Em determinadas modalidades, os epítopos podem incluir determinantes que são agrupamentos de superfície quimicamente ativos das moléculas tais como aminoácidos, cadeias laterais de açúcar, grupos fosforil ou grupos sulfonil e, em determinadas modalidades, podem ter características estruturais tridimensionais específicas e/ou características específicas da carga.

[00103] O termo "competição cruzada", como aqui utilizado, significa que um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno se liga a um antígeno e inibe ou bloqueia a ligação de outro anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno. O termo também inclui competição entre dois anticorpos

em ambas as orientações, ou seja, um primeiro anticorpo que se liga e bloqueia a ligação do segundo anticorpo e vice-versa. Em certas modalidades, o primeiro anticorpo e o segundo anticorpo podem se ligar ao mesmo epítipo. Alternativamente, o primeiro e o segundo anticorpos podem se ligar a epítopos diferentes, mas sobrepostos, de modo que a ligação de um iniba ou bloqueie a ligação do segundo anticorpo, por exemplo, através de impedimento estérico. A competição cruzada entre anticorpos pode ser medida por métodos conhecidos na técnica, por exemplo, por um ensaio de interferometria de biocamada sem marcador em tempo real. Para determinar se um anticorpo de teste compete com um anticorpo de referência do grupo 2 anti-influenza A da invenção, é permitido que o anticorpo de referência se ligue a um peptídeo ou vírus HA da influenza sob condições de saturação. Em seguida, é avaliada a capacidade de um anticorpo de teste se ligar ao vírus influenza HA. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar à HA do vírus da influenza após a ligação de saturação com o anticorpo da HA do vírus anti-influenza de referência, pode-se concluir que o anticorpo de teste se liga a um epítipo diferente do anticorpo da HA do vírus anti-influenza de referência. Por outro lado, se o anticorpo de teste não for capaz de se ligar à HA do vírus da influenza após a ligação de saturação com o anticorpo da HA do vírus anti-influenza de referência, o anticorpo de teste poderá se ligar ao mesmo epítipo que o epítipo ligado pelo anticorpo HA do vírus anti-influenza de referência da invenção.

[00104] O termo "identidade substancial" ou "substancialmente idêntico", quando se refere a um ácido nucleico ou fragmento do mesmo, indica que, quando perfeitamente alinhado com inserções ou deleções de nucleotídeos apropriadas ou deleções com outro ácido nucleico (ou sua cadeia complementar), há identidade de sequência nucleotídica em pelo menos cerca de 90% e mais preferencialmente pelo menos cerca de 95%, 96%, 97%, 98% ou 99% das bases nucleotídicas, conforme medido por qualquer algoritmo

bem conhecido de identidade de sequência, como FASTA, BLAST ou GAP, conforme discutido abaixo. Uma molécula de ácido nucleico possuindo identidade substancial com uma molécula de ácido nucleico de referência pode, em certos casos, codificar um polipeptídeo que possui a mesma ou substancialmente semelhante sequência de aminoácidos que o polipeptídeo codificado pela molécula de ácido nucleico de referência.

[00105] Como aplicado a polipeptídeos, o termo "similaridade substancial" ou "substancialmente similar" significa que duas sequências de peptídeo, quando idealmente alinhadas, tais como pelos programas GAP ou BESTFIT usando pesos de lacuna padrão, compartilham pelo menos 90% de identidade de sequência, ainda mais preferencialmente pelo menos 95%, 98% ou 99% de identidade de sequência. Preferencialmente, posições de resíduo, que não são idênticas, diferem por substituições conservadoras de aminoácidos. Uma "substituição de aminoácido conservativa" é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido com uma cadeia lateral (grupo R) com propriedades químicas semelhantes (por exemplo, carga ou hidrofobicidade). Em geral, uma substituição de aminoácido conservativa não vai mudar substancialmente as propriedades funcionais de uma proteína. Nos casos em que duas ou mais sequências de aminoácidos diferem umas das outras por substituições conservadoras, o percentual ou grau de similaridade pode ser ajustado para cima para corrigir a natureza conservadora da substituição. Os meios para fazer esse ajuste são bem conhecidos pelos versados na técnica. Ver, por exemplo, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307-331, que é incorporado neste documento por referência. Exemplos de grupos de aminoácidos que possuem cadeias laterais com propriedades químicas semelhantes incluem 1) cadeias laterais alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; 2) cadeias laterais alifáticas-hidroxil: serina e treonina; 3) cadeias laterais contendo amida: asparagina e glutamina; 4) cadeias laterais aromáticas: fenilalanina, tirosina e triptofano; 5)

cadeias laterais básicas: lisina, arginina e histidina; 6) cadeias laterais ácidas: aspartato e glutamato, e 7) cadeias laterais contendo enxofre: cisteína e metionina. Grupos de substituição de aminoácidos conservativa preferíveis são: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato e asparagina-glutamina. Alternativamente, uma substituição conservadora é qualquer mudança tendo um valor positivo na matriz de probabilidade de log PAM250 divulgada em Gonnet *et al.* (1992) Science 256: 1443-45, incorporado neste documento por referência. Uma substituição "moderadamente conservadora" é qualquer alteração que tenha um valor não negativo na matriz de probabilidade de log PAM250.

[00106] A similaridade de sequência para polipeptídeos é tipicamente medida usando software de análise de sequência. O software de análise de proteína combina sequências semelhantes usando medidas de similaridade atribuídas a várias substituições, deleções e outras modificações, incluindo substituições conservadoras de aminoácidos. Por exemplo, o software GCG contém programas como GAP e BESTFIT que podem ser usados com parâmetros padrão para determinar a homologia de sequência ou identidade de sequência entre polipeptídeos intimamente relacionados, tais como polipeptídeos homólogos de espécies diferentes de organismos ou entre uma proteína do tipo selvagem e uma muteína respectiva. Ver, por exemplo, GCG Versão 6.1. Sequências de polipeptídeos também podem ser comparadas usando FASTA com parâmetros padrão ou recomendados; um programa em GCG Versão 6.1. FASTA (*por exemplo*, FASTA2 e FASTA3) fornece alinhamentos e identidade de sequência percentual das regiões da melhor sobreposição entre as sequências de pesquisa e busca (Pearson (2000) *supra*). Outro algoritmo preferível ao se comparar uma sequência da invenção a um banco de dados contendo um grande número de sequências de organismos diferentes é o programa de computador BLAST, especialmente BLASTP ou TBLASTN, usando parâmetros padrão. Ver, *por exemplo*, Altschul *et al.*

(1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410 e (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, cada um dos quais é incorporado neste documento por referência.

[00107] A expressão "quantidade terapeuticamente eficaz" significa uma quantidade que produz o efeito desejado para o qual é administrada. A quantidade exata dependerá da finalidade do tratamento e será determinável por um versado na técnica usando técnicas conhecidas (ver, por exemplo, Lloyd (1999) The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding).

[00108] Como usado aqui, o termo "indivíduo" refere-se a um animal, preferencialmente um mamífero, mais preferencialmente um humano, necessitando de melhoria, prevenção e/ou tratamento de uma doença ou distúrbio, como infecção viral. O indivíduo pode ter uma infecção por influenza ou está predisposto a desenvolver uma infecção pelo vírus influenza. Os indivíduos "predispostos a desenvolver uma infecção pelo vírus influenza" ou indivíduos "que podem estar em risco elevado de contrair uma infecção pelo vírus influenza" são aqueles indivíduos com sistema imunológico comprometido por causa de doença autoimune, aquelas pessoas que recebem terapia imunossupressora (por exemplo, após transplante de órgãos), aquelas pessoas afetadas pela síndrome da imunodeficiência humana (HIV) ou síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), certas formas de anemia que empobrecem ou destroem os glóbulos brancos, as pessoas que recebem radiação ou quimioterapia ou as pessoas afetadas por um distúrbio inflamatório. Além disso, indivíduos de extrema idade jovem ou avançada estão em maior risco. Qualquer pessoa que tenha contato físico ou proximidade física com um indivíduo infectado tem um risco aumentado de desenvolver uma infecção pelo vírus Influenza. Além disso, um indivíduo está em risco de contrair uma infecção por influenza devido à proximidade a um surto da doença, por exemplo, reside em uma cidade densamente povoada ou nas proximidades de indivíduos com infecções confirmadas ou suspeitas pelo

vírus Influenza ou escolha de emprego por exemplo, funcionário de hospital, pesquisador farmacêutico, viajante da área infectada ou passageiro frequente.

[00109] Conforme usado aqui, os termos "tratar", "tratando" ou "tratamento" se referem à redução ou melhoria da gravidade de pelo menos um sintoma ou indicação de infecção por influenza devido à administração de um agente terapêutico, como um anticorpo de presente invenção a um indivíduo em necessidade. Os termos incluem inibição da progressão da doença ou agravamento da infecção. Os termos também incluem prognóstico positivo da doença, isto é, o indivíduo pode estar livre de infecção ou pode ter títulos virais reduzidos ou inexistentes após a administração de um agente terapêutico, como um anticorpo da presente invenção. O agente terapêutico pode ser administrado em uma dose terapêutica ao indivíduo.

[00110] Os termos "prevenir", "prevenindo" ou "prevenção" referem-se à inibição da manifestação da infecção por influenza ou a quaisquer sintomas ou indicações de infecção por influenza após a administração de um anticorpo da presente invenção. O termo inclui a prevenção da propagação da infecção em um indivíduo exposto ao vírus ou em risco de ter infecção por influenza.

[00111] Como aqui utilizado, um "efeito protetor" pode ser demonstrado por qualquer procedimento padrão conhecido na técnica para determinar se um agente como um agente antiviral ou um anticorpo como um anticorpo anti-influenza-HA da invenção pode demonstrar qualquer um ou mais dos seguintes: por exemplo, aumento da sobrevivência após exposição a um agente infeccioso, diminuição da carga viral ou melhoria de pelo menos um sintoma associado ao agente infeccioso.

[00112] Conforme usado aqui, o termo "medicamento antiviral" refere-se a qualquer medicamento ou terapia anti-infecciosa usada para tratar, prevenir ou melhorar uma infecção viral em um indivíduo. O termo "medicamento antiviral" inclui, mas não está limitado a, TAMIFLU® (Oseltamivir), RELENZA® (Zanamivir), ribavirina ou interferon-alfa2b. Na

presente invenção, a infecção a ser tratada é causada por um vírus influenza.

Descrição Geral

[00113] A (gripe) influenza é uma doença infecciosa causada por vírus RNA da família Orthomyxoviridae (vírus influenza). Os vírus influenza são classificados com base na proteína principal em três gêneros A, B e C, que são divididos em subtipos determinados pelas glicoproteínas do envelope viral hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA). Os vírus da influenza A infectam uma variedade de espécies de mamíferos e aves, enquanto as infecções do tipo B e C são amplamente restritas aos seres humanos. Somente os tipos A e B causam doenças humanas de qualquer preocupação.

[00114] Altas taxas de mutação e frequentes rearranjos genéticos dos vírus influenza contribuem para uma grande variabilidade dos antígenos HA e NA. Mutações pontuais menores que causam pequenas alterações ("desvio antigênico") ocorrem com relativa frequência. O desvio antigênico permite que o vírus evite o reconhecimento imunológico, resultando em surtos repetidos de influenza durante anos interpandêmicos. As principais alterações no antígeno HA ("deslocamento antigênico") são causadas pela rearranjo de material genético de diferentes subtipos de influenza A. Mudanças antigênicas que resultam em novas cepas pandêmicas são eventos raros, ocorrendo através de uma reorganização entre os subtipos animal e humano, por exemplo, em porcos co-infectados.

[00115] A resposta do anticorpo neutralizante ao vírus Influenza A é tipicamente específica para um determinado subtipo viral. Existem 18 subtipos de influenza A definidos por suas proteínas de hemaglutinina ("HA"). As 18 HAs, H1-H18, podem ser classificados em dois grupos. O grupo 1 consiste nos subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 e H18 e o grupo 2 inclui os subtipos H3, H4, H7, H10, H14 e H15. Por essas razões, seria altamente desejável ter uma vacina que induza anticorpos neutralizantes amplamente capazes de neutralizar todos os subtipos do vírus

influenza A, bem como suas variantes anuais. Além disso, anticorpos heterossubípicos amplamente neutralizantes podem ser administrados como medicamentos para prevenção ou terapia da infecção por influenza A.

[00116] O HA é sintetizado como um polipeptídeo precursor homotrimérico HA0. Cada monômero pode ser clivado independentemente após a tradução para formar dois polipeptídeos, HA1 e HA2, ligados por uma única ligação dissulfeto. O fragmento N-terminal maior (aminoácidos HAL 320-330) forma um domínio globular distal da membrana que contém o local de ligação ao receptor e a maioria dos determinantes reconhecidos pelos anticorpos neutralizantes do vírus. O polipeptídeo HA1 do HA é responsável pela ligação do vírus à superfície celular. A porção C-terminal menor (HA2, aproximadamente 180 aminoácidos) forma uma estrutura semelhante a uma haste que ancora o domínio globular à membrana celular ou viral. O polipeptídeo HA2 medeia a fusão das membranas virais e celulares nos endossomos, permitindo a liberação do complexo de ribonucleoproteínas no citoplasma.

[00117] Houve apenas sucesso limitado na identificação de anticorpos que neutralizam mais de um subtipo do vírus influenza A. Além disso, a respiração da neutralização dos anticorpos identificados até o momento é estreita e sua potência é baixa. Okuno et al, imunizaram camundongos com o vírus influenza A/Okuda/57 (H2N2) e isolaram um anticorpo monoclonal (C179) que se liga a um epítipo conformacional conservado no HA2 e neutraliza os vírus influenza A do subtipo H2, H1 e H5 do grupo 1 *in vitro* e *in vivo* em modelos animais ((Okuno *et al.*, J. Virol. 67: 2552-8, 1993).

[00118] Apesar de décadas de pesquisa, não existem anticorpos comercializados que neutralizem ou inibam amplamente a infecção pelo vírus influenza A ou atenuem a doença causada pelo vírus influenza A. Portanto, é necessário identificar novos anticorpos que neutralizem vários subtipos do vírus influenza A e possam ser usados como medicamentos para prevenção ou

terapia da infecção por influenza A.

[00119] A imunoterapia passiva para profilaxia ou tratamento de doenças infecciosas é utilizada há mais de um século, geralmente na forma de soros humanos convalescentes que contêm altos títulos de anticorpos neutralizantes (Good *et al.* 1991; *Cancer* 68: 1415-1421). Atualmente, vários anticorpos monoclonais purificados estão atualmente em desenvolvimento clínico e pré-clínico para uso como antimicrobianos (Marasco *et al.* 2007; *Nature Biotechnology* 25: 1421-1434).

[00120] Os inventores descreveram aqui anticorpos totalmente humanos e seus fragmentos de ligação a antígeno que ligam-se especificamente à hemaglutinina da influenza e modulam a interação do vírus da influenza com as células hospedeiras. Os anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza podem se ligar ao vírus da influenza HA com alta afinidade. Em certas modalidades, os anticorpos da presente invenção são anticorpos bloqueadores em que os anticorpos podem se ligar ao HA da influenza e bloquear a ligação e/ou entrada do vírus nas células hospedeiras. Em algumas modalidades, os anticorpos bloqueadores da invenção podem bloquear a ligação do vírus influenza às células e, como tal, podem inibir ou neutralizar a infectividade viral das células hospedeiras. Em algumas modalidades, os anticorpos bloqueadores podem ser úteis para o tratamento de um indivíduo que sofre de uma infecção pelo vírus influenza. Os anticorpos quando administrados a um indivíduo em necessidade do mesmo podem reduzir a infecção por um vírus como a gripe no indivíduo. Eles podem ser usados para diminuir as cargas virais em um indivíduo. Eles podem ser utilizados sozinhos ou como terapia adjuvante com outras porções ou modalidades terapêuticas conhecidas na técnica para o tratamento de uma infecção viral. Em certas modalidades, esses anticorpos podem se ligar a um epítipo na região do tronco do HA viral. Além disso, os anticorpos identificados podem ser utilizados profilaticamente (antes da infecção) para proteger um mamífero

da infecção, ou podem ser usados terapêuticamente (após o estabelecimento da infecção) para melhorar uma infecção previamente estabelecida ou para melhorar pelo menos um sintoma associado à infecção.

[00121] As sequências completas de aminoácidos de dois HAs exemplares do grupo 2 da gripe A são mostradas no GenBank como números de acesso ACF41911.1 (de A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2), consulte também SEQ ID NO: 33) e número de acesso AAR02640.1 (de A/galinha/Holanda/01/2003 (H7N7) (ver também SEQ ID NO: 34).

[00122] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são obtidos de camundongos imunizados com um imunogênio primário, como um HA influenza completo ou com uma forma recombinante de HA influenza ou seus fragmentos, seguido de imunização com um imunógeno secundário ou com um imunogenicamente fragmento ativo de HA da influenza. Em certas modalidades, os anticorpos são obtidos de camundongos imunizados com uma composição de vacina contra influenza seguida de imunização de reforço com um ou mais peptídeos de HA produzidos de forma recombinante.

[00123] Em certas modalidades, os camundongos foram imunizados com A/Hong Kong/08/1968 (H3N2), seguido de A/Hong Kong/05/1972-PR8-X36 (H3N2) e depois novamente com A/Hong Kong/08/1968 (H3N2). Todos os camundongos foram reforçados com uma mistura 1:1 de DNAs que codificam o HA de A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2) e A/galinha/Holanda/01/2003 (H7N7).

[00124] O imunogênio pode ser um fragmento biologicamente ativo e/ou imunogênico da HA ou DNA da influenza que codifica o seu fragmento ativo. O fragmento pode ser derivado da região do tronco da proteína HA. (Ver Sui *et. al.*, Nature Struct. e Mol. Biol. Publicado online em 22 de fevereiro de 2009; Páginas 1-9).

[00125] Os peptídeos podem ser modificados para incluir adição ou substituição de certos resíduos para marcação ou para fins de conjugação com

moléculas transportadoras, como KLH. Por exemplo, uma cisteína pode ser adicionada no terminal N ou na extremidade C de um peptídeo, ou uma sequência ligante pode ser adicionada para preparar o peptídeo para conjugação a, por exemplo, KLH para imunização.

[00126] Certos anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza da presente invenção são capazes de se ligar e neutralizar a atividade do HA da influenza, conforme determinado por ensaios *in vitro* ou *in vivo*. A capacidade dos anticorpos da invenção de se ligarem e neutralizarem a atividade do HA do grupo 2 da influenza A e, portanto, a ligação e/ou entrada do vírus em uma célula hospedeira seguida pela infecção viral subsequente, pode ser medida usando qualquer método padrão conhecido dos especialistas na técnica, incluindo ensaios de ligação ou ensaios de atividade, como aqui descrito.

[00127] Ensaios não limitativos exemplares *in vitro* para medir a atividade de ligação são ilustrados no Exemplo 3, neste documento. No Exemplo 3, as constantes de afinidade e dissociação de ligação dos anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza A para o HA do grupo 2 da influenza A foram determinadas por ressonância plasmônica de superfície usando um instrumento Biacore. No Exemplo 4, foram utilizados ensaios de neutralização para determinar a infectividade de diversas cepas do grupo 2 do vírus influenza. No Exemplo 5, certos anticorpos mostraram mediar a citotoxicidade dependente do complemento (CDC), ou no Exemplo 6, certos anticorpos foram mostrados para mediar a citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo (ADCC) de células infectadas por vírus *in vitro*. O Exemplo 7 demonstra que certos anticorpos da invenção são capazes de neutralizar uma infecção por influenza A *in vivo*.

[00128] Os anticorpos específicos para HA do grupo 2 da gripe A podem não conter marcadores ou porções adicionais, ou podem conter um marcador ou porção N-terminal ou C-terminal. Em uma modalidade, o marcador ou porção é biotina. Em um ensaio de ligação, a localização de um

marcador (se houver) pode determinar a orientação do peptídeo em relação à superfície na qual o peptídeo está ligado. Por exemplo, se uma superfície for revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina N-terminal será orientado de modo que a porção C-terminal do peptídeo fique distal à superfície. Em uma modalidade, o marcador pode ser um radionuclídeo, um corante fluorescente ou um marcador detectável por RM. Em certas modalidades, esses anticorpos marcados podem ser utilizados em ensaios de diagnóstico, incluindo ensaios de imagem.

Fragmentos de Anticorpos de Ligação a Antígenos

[00129] Salvo indicação em contrário, o termo "anticorpo", como aqui utilizado, deve ser entendido como abrangendo moléculas de anticorpo compreendendo duas cadeias pesadas de imunoglobulina e duas cadeias leves de imunoglobulina (ou seja, "moléculas de anticorpo completas") bem como seus fragmentos de ligação ao antígeno. Os termos "porção de ligação a antígeno" de um anticorpo, "fragmento de ligação a antígeno" de um anticorpo, e similares, conforme usado neste documento, incluem qualquer polipeptídeo ou glicoproteína de ocorrência natural, enzimaticamente obtível, sintética ou geneticamente manipulada que se liga especificamente a um antígeno para formar um complexo. Os termos "fragmento de ligação ao antígeno" de um anticorpo, ou "fragmento de anticorpo", como usado aqui, refere-se a um ou mais fragmentos de um anticorpo que retêm a capacidade de se ligar especificamente ao HA do grupo 2 da influenza A. Um fragmento de anticorpo pode incluir um fragmento Fab, um fragmento F(ab')₂, um fragmento Fv, um fragmento dAb, um fragmento contendo uma CDR ou uma CDR isolada. Em certas modalidades, o termo "fragmento de ligação ao antígeno" refere-se a um fragmento de polipeptídeo de uma molécula de ligação ao antígeno multiespecífica. Os fragmentos de ligação ao antígeno de um anticorpo podem ser derivados, por exemplo, a partir de moléculas de anticorpo completas usando quaisquer técnicas padrão adequadas, como

digestão proteolítica ou técnicas de engenharia genética recombinante, envolvendo a manipulação e expressão do DNA que codifica a variável de anticorpo e (opcionalmente) os domínios constantes. Esse DNA é conhecido e/ou está prontamente disponível em, por exemplo, fontes comerciais, bibliotecas de DNA (incluindo, por exemplo, bibliotecas de fago-anticorpo) ou podem ser sintetizadas. O DNA pode ser sequenciado e manipulado quimicamente ou por uso de técnicas de biologia molecular, por exemplo, para dispor um ou mais domínios variáveis e/ou constantes em uma configuração adequada, ou para introduzir códon, criar resíduos de cisteína, modificar, adicionar ou deletar aminoácidos, etc.

[00130] Exemplos não limitativos de fragmentos de ligação ao antígeno incluem: (i) fragmentos Fab; (ii) fragmentos F(ab')₂; (iii) fragmentos Fd; (iv) fragmentos Fv; (v) moléculas de Fv de cadeia única (scFv); (vi) fragmentos dAb; e (vii) unidades mínimas de reconhecimento consistindo nos resíduos de aminoácidos que imitam a região hipervariável de um anticorpo (por exemplo, uma região determinante de complementaridade isolada (CDR), como um peptídeo CDR3) ou um peptídeo FR3-CDR3-FR4 restrito. Outras moléculas manipuladas, tais como anticorpos específicos de domínio, anticorpos de domínio único, anticorpos de domínio deletado, anticorpos quiméricos, anticorpos enxertados com CDR, diacorpos, triacorpos, tetracorpos, minicorpos, nanocorpos (por exemplo, nanocorpos monovalentes, nanocorpos bivalentes, etc.), imunofarmacêuticos modulares pequenos (SMIPs) e domínios variáveis de IgNAR de tubarão, também são abrangidas dentro da expressão "fragmento de ligação ao antígeno", conforme usada neste documento.

[00131] Um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo normalmente compreenderá pelo menos um domínio variável. O domínio variável pode ser de qualquer tamanho ou composição de aminoácidos e compreenderá geralmente pelo menos uma CDR que seja adjacente a ou

enquadrada com uma ou mais seqüências de estrutura. Em fragmentos de ligação ao antígeno com um domínio V_H associado a um domínio V_L , os domínios V_H e V_L podem estar situados um em relação ao outro em qualquer arranjo adequado. Por exemplo, a região variável pode ser dimérica e conter dímeros $V_H - V_H$, $V_H - V_L$ ou $V_L - V_L$. Alternativamente, o fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo pode conter um domínio monomérico V_H ou V_L .

[00132] Em certas modalidades, um fragmento de ligação a antígeno de um anticorpo pode conter pelo menos um domínio variável ligado covalentemente a pelo menos um domínio constante. Configurações exemplificativas não limitativas de domínios variáveis e constantes que podem ser encontradas dentro de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção incluem: (i) $V_H - C_H1$; (ii) $V_H - C_H2$; (iii) $V_H - C_H3$; (iv) $V_H - C_H1 - C_H2$; (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) $V_L - C_H1 - C_H2$; (xii) $V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3$; (xiii) $V_L - C_H2 - C_H3$; e (xiv) $V_L - C_L$. Em qualquer configuração de domínios variáveis e constantes, incluindo qualquer uma das configurações exemplares listadas acima, os domínios variáveis e constantes podem ser ligados diretamente um ao outro ou podem ser ligados por uma região de dobradiça ou de ligante inteira ou parcial. Uma região de dobradiça pode consistir em pelo menos 2 (por exemplo, 5, 10, 15, 20, 40, 60 ou mais) aminoácidos, que resultam em uma ligação flexível ou semi-flexível entre domínios variáveis e/ou constantes adjacentes em uma única molécula de polipeptídeo. Além disso, um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção pode compreender um homo-dímero ou hetero-dímero (ou outro multímero) de qualquer uma das configurações de domínio variável e constante listadas acima em associação não covalente entre si e/ou com um ou mais domínios monoméricos V_H ou V_L (por exemplo, por ligação(ões) dissulfeto).

[00133] Como nas moléculas de anticorpo completas, os fragmentos de ligação ao antígeno podem ser monoespecíficos ou multiespecíficos (por exemplo, biespecífico). Um fragmento de ligação a antígeno multiespecífico de um anticorpo compreenderá tipicamente pelo menos dois domínios variáveis diferentes, em que cada domínio variável é capaz de se ligar especificamente a um antígeno separado ou a um epítopo diferente no mesmo antígeno. Qualquer formato de anticorpo multiespecífico, incluindo os exemplos de formatos de anticorpos biespecíficos aqui divulgados, pode ser adaptado para uso no contexto de um fragmento de ligação ao antígeno de um anticorpo da presente invenção utilizando técnicas de rotina disponíveis na técnica.

Preparação de Anticorpos Humanos

[00134] Métodos para gerar anticorpos humanos em camundongos transgênicos são conhecidos na técnica. Quaisquer métodos conhecidos podem ser utilizados no contexto da presente invenção para produzir anticorpos humanos que se ligam especificamente ao HA do grupo 2 da influenza A. Um imunogênio compreendendo qualquer um dos seguintes pode ser usado para gerar anticorpos para o HA do grupo 2 da influenza A. Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são obtidos de camundongos imunizados com HA de influenza A nativa do grupo 2 de comprimento total (ver, por exemplo, números de acesso ao GenBank ACF41911.1 ou AAR02640.1) ou com vírus vivo atenuado ou vírus inativado ou com DNA que codifica a proteína ou seu fragmento. Alternativamente, a proteína HA do grupo 2 da influenza A ou um fragmento da mesma pode ser produzida usando técnicas bioquímicas padrão e modificada e usada como imunógeno. Em uma modalidade, o imunogênio pode ser uma proteína HA do grupo 2 da influenza A produzida por recombinação ou um fragmento da mesma. Em certas modalidades da invenção, o imunogênio pode ser uma vacina do vírus influenza. Em certas modalidades, uma ou mais injeções de

reforço podem ser administradas. Em certas modalidades, as injeções de reforço podem compreender uma ou mais cepas do vírus influenza ou hemaglutininas derivadas dessas cepas, por exemplo, A/Hong Kong/08/1968 (H3N2), seguidas de A/Hong Kong/05/1972-PR8- X36 (H3N2) e depois novamente com A/Hong Kong/08/1968 (H3N2). Todos os camundongos foram reforçados com uma mistura 1:1 de DNAs que codificam o HA de A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2) e A/galinha/Holanda/01/2003 (H7N7). Em certas modalidades, as injeções de reforço podem conter uma mistura 1:1 das cepas de influenza ou uma mistura 1:1 das hemaglutininas derivadas das cepas, ou o DNA que codifica as HAs. Em certas modalidades, o imunogênio pode ser um peptídeo recombinante de HA da influenza expresso em *E. coli* ou em qualquer outra célula eucariótica ou de mamífero, como células de ovário de hamster chinês (CHO) ou o próprio vírus da influenza.

[00135] Usando a tecnologia VELOCIMMUNE® (ver, por exemplo, US 6.596.541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) ou qualquer outro método conhecido para gerar anticorpos monoclonais, os anticorpos quiméricos de alta afinidade a HA da influenza A do grupo 2 são inicialmente isolados com uma região variável humana e um mouse região constante. A tecnologia VELOCIMMUNE® envolve a geração de um camundongo transgênico com um genoma compreendendo regiões variáveis de cadeia pesada e leve humanas operacionalmente ligadas a loci de região constante de camundongo endógenos de modo que o camundongo produz um anticorpo que compreende uma região variável humana e uma região constante de camundongo em resposta à estimulação antigênica. O DNA que codifica as regiões variáveis das cadeias pesadas e leves do anticorpo é isolado e operacionalmente ligado ao DNA que codifica as regiões constantes de cadeia pesada e leve humanas. O DNA é então expresso em uma célula capaz de expressar o anticorpo totalmente humano.

[00136] Geralmente, um camundongo VELOCIMMUNE® é desafiado

com o antígeno de interesse e células linfáticas (tais como células B) são recuperadas dos camundongos que expressam anticorpos. As células linfáticas podem ser fundidas com uma linhagem celular de mieloma para preparar linhagens celulares de hibridoma imortal e essas linhagens celulares de hibridoma são triadas e selecionadas para identificar linhagens celulares de hibridoma que produzem anticorpos específicos ao antígeno de interesse. O DNA que codifica as regiões variáveis da cadeia pesada e da cadeia leve pode ser isolado e ligado a regiões constantes isotípicas desejáveis da cadeia pesada e da cadeia leve. Tal proteína do anticorpo pode ser produzida em uma célula, tal como célula CHO. Alternativamente, o DNA que codifica os anticorpos quiméricos específicos do antígeno ou os domínios variáveis das cadeias leve e pesada pode ser isolado diretamente dos linfócitos específicos do antígeno.

[00137] Inicialmente, anticorpos quiméricos de alta afinidade são isolados tendo uma região variável humana e uma região constante de camundongo. Como na seção experimental abaixo, os anticorpos são caracterizados e selecionados por características desejáveis, incluindo afinidade, seletividade, epítipo etc. As regiões constantes do rato são substituídas por uma região constante humana desejada para gerar o anticorpo totalmente humano da invenção, por exemplo IgG1 ou IgG4 de tipo selvagem ou modificado. Enquanto a região constante selecionada pode variar de acordo com o uso específico, as características de afinidade alta de ligação ao antígeno e especificidade alvo residem na região variável.

Bioequivalentes

[00138] Os anticorpos anti-HA do grupo 2 e os fragmentos de anticorpo da presente invenção abrangem proteínas com sequências de aminoácidos que variam daquelas dos anticorpos descritos, mas que mantêm a capacidade de se ligar à HA da influenza. Tais anticorpos variantes e fragmentos de anticorpos compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácidos quando comparados com a sequência principal,

mas exibem atividade biológica que é essencialmente equivalente à dos anticorpos descritos. Da mesma forma, as sequências de DNA que codificam anticorpos da presente invenção englobam sequências que compreendem uma ou mais adições, deleções ou substituições de nucleotídeos quando comparadas à sequência divulgada, mas que codificam um anticorpo ou fragmento de anticorpo que é essencialmente bioequivalente a um anticorpo ou fragmento de anticorpo da invenção.

[00139] Duas proteínas de ligação a antígeno, ou anticorpos, são consideradas bioequivalentes se, por exemplo, são equivalentes farmacêuticos ou alternativas farmacêuticas cuja taxa e extensão de absorção não mostram uma diferença significativa quando administradas na mesma dose molar sob condições experimentais similares, ou doses únicas ou múltiplas doses. Alguns anticorpos serão considerados equivalentes ou alternativas farmacêuticas se forem equivalentes na extensão de sua absorção, mas não em sua taxa de absorção e, ainda assim, podem ser considerados bioequivalentes porque tais diferenças na taxa de absorção são intencionais e são refletidas na marcação, não são essenciais para a obtenção de concentrações eficazes do fármaco corporal em, por exemplo, uso crônico e são consideradas clinicamente insignificantes para o produto medicamentoso específico estudado.

[00140] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação a antígeno são bioequivalentes se não houver diferenças clinicamente significativas na sua segurança, pureza ou potência.

[00141] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se um paciente puder trocar uma ou mais vezes o produto de referência pelo produto biológico sem um aumento esperado no risco de efeitos adversos, incluindo uma mudança clinicamente significativa na imunogenicidade ou eficácia diminuída em comparação com a terapia contínua sem tal troca.

[00142] Em uma modalidade, duas proteínas de ligação ao antígeno são bioequivalentes se ambas atuarem por um mecanismo comum ou mecanismos de ação para a condição ou condições de uso, na medida em que tais mecanismos são conhecidos.

[00143] Bioequivalência pode ser demonstrada por métodos *in vivo* e/ou *in vitro*. As medidas de bioequivalência incluem, por exemplo, a) um *in vivo* teste em humanos ou outros mamíferos, nos quais a concentração do anticorpo ou de seus metabólitos é medida no sangue, plasma, soro ou outro fluido biológico em função do tempo; (b) um teste *in vitro* que foi correlacionado e é razoavelmente preditivo de dados *in vivo* de biodisponibilidade; (c) um teste *in vivo* em humanos ou outros mamíferos em que o efeito farmacológico agudo apropriado do anticorpo (ou seu alvo) é medido em função do tempo; e (d) em um ensaio clínico bem controlado que estabeleça segurança, eficácia ou biodisponibilidade ou bioequivalência de um anticorpo.

[00144] As variantes bioequivalentes dos anticorpos da invenção podem ser construídas, por exemplo, fazendo várias substituições de resíduos ou sequências ou excluindo resíduos ou sequências terminais ou internos, não necessários para a atividade biológica. Por exemplo, resíduos de cisteína não essenciais para a atividade biológica podem ser deletados ou substituídos por outros aminoácidos para evitar a formação de pontes de dissulfeto intramoleculares desnecessárias ou incorretas após a renaturação. Em outros contextos, anticorpos bioequivalentes podem incluir variantes de anticorpo que compreendem mudanças de aminoácidos, que modificam as características de glicosilação dos anticorpos, por exemplo, mutações que eliminam ou removem a glicosilação.

Anticorpos Anti-Influenza-HA Compreendendo Variantes de Fc

[00145] De acordo com certas modalidades da presente invenção, são fornecidos anticorpos HA do grupo 2 anti-influenza que compreendem um

domínio Fc compreendendo uma ou mais mutações, que aumentam ou diminuem a ligação do anticorpo ao receptor FcRn, por exemplo, em pH ácido em comparação com pH neutro. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-influenza-HA compreendendo uma mutação no C_H2 ou uma região C_H3 do domínio Fc, em que a(s) mutação(ões) aumenta(m) a afinidade do domínio Fc para FcRn em um ambiente ácido (por exemplo, num endossoma em que o pH varia entre cerca de 5,5 e cerca de 6,0). Essas mutações podem resultar em um aumento na meia-vida sérica do anticorpo quando administradas a um animal. Exemplos não limitantes de tais modificações Fc incluem, por exemplo, uma modificação na posição 250 (por exemplo, E ou Q); 250 e 428 (por exemplo, L ou F); 252 (por exemplo, L/Y/F/W ou T), 254 (por exemplo, S ou T) e 256 (por exemplo, S/R/Q/E/D ou T); ou uma modificação na posição 428 e/ou 433 (por exemplo, H/L/R/S/P/Q ou K) e/ou 434 (por exemplo, A, W, H, F ou Y [N434A, N434W, N434H, N434F ou N434Y]); ou uma modificação na posição 250 e/ou 428; ou uma modificação na posição 307 ou 308 (por exemplo, 308F, V308F) e 434. Em uma modalidade, a modificação compreende uma modificação 428L (por exemplo, M428L) e 434S (por exemplo, N434S); uma modificação 428L, 259I (por exemplo, V259I) e 308F (por exemplo, V308F); uma modificação 433K (por exemplo, H433K) e 434 (por exemplo, 434Y); uma modificação 252, 254 e 256 (por exemplo, 252Y, 254T e 256E); uma modificação 250Q e 428L (por exemplo, T250Q e M428L); e uma modificação 307 e/ou 308 (por exemplo, 308F ou 308P). Em ainda outra modalidade, a modificação compreende uma modificação 265A (por exemplo, D265A) e/ou 297A (por exemplo, N297A).

[00146] Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza compreendendo um domínio Fc compreendendo um ou mais pares ou grupos de mutações selecionados do grupo que consiste em: 250Q e 248L (por exemplo, T250Q e M248L); 252Y, 254T e 256E (por

exemplo, M252Y, S254T e T256E); 428L e 434S (por exemplo, M428L e N434S); 257I e 311I (por exemplo, P257I e Q311I); 257I e 434H (por exemplo, P257I e N434H); 376V e 434H (por exemplo, D376V e N434H); 307A, 380A e 434A (por exemplo, T307A, E380A e N434A); e 433K e 434F (por exemplo, H433K e N434F). Todas as combinações possíveis das mutações de domínio Fc precedentes e outras mutações dentro dos domínios variáveis de anticorpo divulgados neste documento são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[00147] A presente invenção também inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza que compreendem uma constante de cadeia pesada quimérica (C_H), em que a região quimérico C_H compreende segmentos derivados das regiões C_H de mais de um isotipo de imunoglobulina. Por exemplo, os anticorpos da invenção podem compreender uma região quimérica C_H compreendendo parte ou todo um domínio C_{H2} derivado de uma molécula de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinada com parte ou a totalidade de um domínio C_{H3} derivado de uma molécula de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. De acordo com certas modalidades, os anticorpos da invenção compreendem uma região quimérica C_H com uma região de dobradiça quimérica. Por exemplo, uma dobradiça quimérica pode compreender uma sequência de aminoácidos "dobradiça superior" (resíduos de aminoácidos das posições 216 a 227 de acordo com a numeração da UE) derivados de uma região de dobradiça IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana, combinada com uma "sequência de dobradiça inferior" (resíduos de aminoácidos das posições 228 a 236 de acordo com a numeração da UE) derivada de uma região de dobradiça de IgG1 humana, IgG2 humana ou IgG4 humana. De acordo com certas modalidades, a região de dobradiça quimérica compreende resíduos de aminoácidos derivados de uma dobradiça superior de IgG1 humana ou IgG4 humana e resíduos de aminoácidos derivados de uma dobradiça inferior de IgG2 humana. Anticorpo compreendendo uma região

quimérica C_H como aqui descrita pode, em certas modalidades, exibir funções efetoras de Fc modificadas sem afetar adversamente as propriedades terapêuticas ou farmacocinéticas do anticorpo. (Ver, por exemplo, Pedido de Patente Provisório dos EUA nº 61/759.578, depositado em 1 de fevereiro de 2013, cuja divulgação é incorporada por referência na íntegra).

Características Biológicas dos Anticorpos

[00148] Em geral, os anticorpos da presente invenção funcionam ligando-se ao grupo 2 HA da influenza A. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos e fragmentos de anticorpos que se ligam ao antígeno que se ligam ao grupo 2 HA da influenza A (por exemplo, a 25°C ou 37°C) com um K_D inferior a 10 nM, conforme medido por ressonância plasmônica de superfície em um instrumento Biacore ou por biossensor baseado em interferômetro de camada biológica em tempo real (ensaio Octet HTX). Em certas modalidades, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno ligam a HA do grupo 2 da influenza A com um K_D inferior a cerca de 5nM, inferior a cerca de 2nM, inferior a cerca de 1nM, inferior a cerca de 500pM, inferior a 250pM ou inferior a 100pM, conforme medido por ressonância plasmônica de superfície, por exemplo, usando o formato de ensaio conforme descrito neste documento, ou um substancial ensaio semelhante.

[00149] A presente invenção também inclui anticorpos e seus fragmentos de ligação ao antígeno que se ligam à HA da influenza A do grupo 2 com uma meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) superior a cerca de 75 minutos, medida pela ressonância plasmônica de superfície a 37°C, por exemplo, usando um formato de ensaio como aqui definido, ou um ensaio substancialmente semelhante. Em certas modalidades, os anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção ligam a Influenza HA com um $t_{1/2}$ superior a cerca de 200 minutos, superior a cerca de 300 minutos, superior a cerca de 400 minutos, superior a cerca de 500 minutos, superior a cerca de 600 minutos, superiores a cerca de 700 minutos, superiores a cerca

de 800 minutos, superiores a cerca de 900 minutos ou superiores a cerca de 1000 minutos, medidos por ressonância plasmônica de superfície a 25°C, por exemplo, usando um formato de ensaio conforme aqui definido (por exemplo, formato de captura de mAb ou captura de antígeno) ou um ensaio substancialmente semelhante.

[00150] A presente invenção também inclui anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que neutralizam a infectividade do vírus influenza para suas células hospedeiras. Em algumas modalidades, os anticorpos exibem uma potência de neutralização contra vários vírus representativos da influenza do grupo 2 A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2); A/Filipinas/01/1982 (H3N2) e A/Shanghai/01/2013-PR8 (H7N9) com um IC₅₀ variando de cerca de 5,7 nM a cerca de 405 nM em um ensaio de microneutralização, por exemplo, como mostrado no Exemplo 4, ou em um ensaio substancialmente semelhante.

[00151] A presente invenção também inclui anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno que mediam a citotoxicidade dependente de complemento de células infectadas com um EC₅₀ de 140 nM com lise máxima de 78,3% (ver o Exemplo 5). Em uma modalidade, os anticorpos ou seus fragmentos de ligação ao antígeno mediam a citotoxicidade mediada por célula (ADCC) dependente de anticorpo de células infectadas, como mostrado por um ensaio repórter e pela capacidade de lisar células decoradas com HA usando células mononucleares do sangue periférico (PBMC). No ensaio repórter, a CE₅₀ foi de 0,8714 nM para H1H14611N2 e 0,6882 nM para H1H14612N2. No ensaio do tipo PBMC, a CE₅₀ foi de 0,1463 nM para H1H14611N2 e 0,1762 nM para H1H14612N2. (Ver Exemplo 6).

[00152] A presente invenção também inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza que demonstram um aumento na proteção ou neutralização potente da infecção por influenza A *in vivo*. Certos anticorpos mostram neutralização potente quando administrados terapêuticamente (após

infecção; ver Exemplo 7). Em uma modalidade, uma dose de H1H14611N2 a 7 mg/kg ou 15 mg/kg administrada 96 horas após a infecção resultou em 80% e 100% de sobrevivência de camundongos (respectivamente) quando administrada terapêuticamente. A sobrevivência de cem por cento também foi observada quando certos anticorpos exemplares (H1H14611N2 e H1H14612N2) foram administrados como uma dose única de 15 mg/kg às 24, 48 ou 72 horas após a infecção. Em uma modalidade, o H1H14611N2 demonstrou um efeito protetor aditivo em mamíferos infectados por influenza quando combinado com um fármaco antiviral, o oseltamivir.

[00153] Em uma modalidade, a invenção fornece um anticorpo recombinante isolado ou um fragmento de ligação a antígeno que se liga especificamente ao grupo 2 HA da influenza A, em que o anticorpo possui duas ou mais das seguintes características: (a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano; (b) se liga ao HA do grupo 2 da influenza A com uma constante de dissociação (K_D) inferior a $10^{-8}M$, medido por ressonância plasmônica de superfície; (c) demonstra meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) superior a 75 minutos;

(d) demonstra neutralização dos vírus influenza A do grupo 2 selecionados das cepas H3N2 e H7N9 com um IC_{50} inferior a 200 nM e 500nM, respectivamente; (e) demonstra lise mediada por complemento de células infectadas pelo vírus influenza com um EC_{50} inferior a cerca de 150 nM; (f) demonstra citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos de células-alvo infectadas por vírus usando um bioensaio repórter com um EC_{50} inferior a cerca de 0,9 nM; (g) demonstra citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos de células-alvo infectadas por vírus na presença de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) com um EC_{50} inferior a cerca de 0,180 nM; (h) demonstra um aumento na sobrevivência em um animal infectado por influenza quando administrado 24, 48, 72 ou 96 horas após o desafio do vírus; (i) demonstra um aumento na sobrevivência em um

animal infectado por influenza quando administrado em combinação com oseltamivir 96 horas após a infecção; ou (j) em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno compreende três regiões determinantes da complementaridade de cadeia pesada (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas em qualquer uma das sequências da região variável de cadeia pesada (HCVR) listadas na Tabela 1; e três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em qualquer uma das sequências da região variável de cadeia leve (LCVR) listadas na Tabela 1.

[00154] Os anticorpos da presente invenção podem possuir duas ou mais das características biológicas acima mencionadas, ou qualquer combinação das mesmas. Outras características biológicas dos anticorpos da presente invenção serão evidentes para aquele versado na técnica a partir de uma revisão da presente divulgação, incluindo os Exemplos de trabalho aqui.

Mapeamento de Epítopos e Tecnologias Relacionadas

[00155] A presente invenção inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza, que interagem com um ou mais aminoácidos encontrados em um ou mais domínios da molécula de HA do grupo 2 da influenza A. O epítipo ao qual os anticorpos se ligam pode consistir em uma única sequência contígua de 3 ou mais (por exemplo, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 ou mais) aminoácidos localizados na molécula de influenza HA (por exemplo, um epítipo linear em um domínio). Alternativamente, o epítipo pode consistir em uma pluralidade de aminoácidos não contíguos (ou sequências de aminoácidos) localizados na molécula de HA do grupo 2 da influenza A (por exemplo, um epítipo conformacional).

[00156] Várias técnicas conhecidas daqueles versados na técnica podem ser usadas para determinar se um anticorpo "interage com um ou mais aminoácidos" dentro de um polipeptídeo ou proteína. Técnicas exemplificativas incluem, por exemplo, ensaios de rotina de bloqueio cruzado, como o descrito em Anticorpos, Harlow e Lane (Cold Spring Harbor

Press, Cold Spring Harbor, NY). Outros métodos incluem análise mutacional de varredura de alanina, análise de transferência de peptídeo (Reineke (2004) *Methods Mol. Biol.* 248: 443-63), estudos cristalográficos de análise de clivagem de peptídeo e análise de RMN. Além disso, métodos como excisão de epítomos, extração de epítomos e modificação química de antígenos podem ser empregados (Tomer (2000) *Prot. Sci.* 9: 487-496). Outro método que pode ser usado para identificar os aminoácidos dentro de um polipeptídeo com o qual um anticorpo interage é troca de hidrogênio/deutério detectada por espectrometria de massa. Em termos gerais, o método de troca de hidrogênio/deutério envolve a marcação com deutério da proteína de interesse, seguida pela ligação do anticorpo à proteína marcada com deutério. Em seguida, o complexo proteína/anticorpo é transferido para a água e os prótons trocáveis dentro dos aminoácidos que são protegidos pelo complexo do anticorpo passam por uma troca reversa de deutério para hidrogênio a uma taxa mais lenta que os prótons trocáveis nos aminoácidos que não fazem parte da interface. Como resultado, os aminoácidos que fazem parte da interface proteína/anticorpo podem reter o deutério e, portanto, exibir massa relativamente maior em comparação com os aminoácidos não incluídos na interface. Após a dissociação do anticorpo, a proteína alvo é submetida à clivagem de protease e análise de espectrometria de massa, revelando assim os resíduos marcados com deutério que correspondem aos aminoácidos específicos com os quais o anticorpo interage. Ver, por exemplo, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267: 252-259; Engen e Smith (2001) *Anal. Chem.* 73: 256A-265A.

[00157] O termo "epítopo" refere-se a um local em um antígeno ao qual as células B e/ou T respondem. Os epítomos de células B podem ser formados tanto a partir de aminoácidos contíguos quanto de aminoácidos não contíguos justapostos pelo dobramento terciário de uma proteína. Epítomos formados de aminoácidos contíguos são retidos tipicamente na exposição para

desnaturalizar solventes, visto que os epítomos formados pelo dobramento terciário são tipicamente perdidos no tratamento com desnaturalização solventes. Um epítomo inclui tipicamente pelo menos 3 e, mais usualmente, pelo menos 5 ou 8-10 aminoácidos em uma conformação espacial única.

[00158] O perfil de modificação assistida por modificação (MAP), também conhecido como perfil de anticorpo baseado em estrutura de antígeno (ASAP) é um método que categoriza um grande número de anticorpos monoclonais (mAbs) direcionados contra o mesmo antígeno, de acordo com as semelhanças do perfil de ligação de cada anticorpo ao antígeno ou superfícies de antígeno modificadas quimicamente ou enzimaticamente (ver US 2004/0101920, aqui incorporado especificamente por referência na sua totalidade). Cada categoria pode refletir um epítomo único distintamente diferente ou parcialmente sobreposto ao epítomo representado por outra categoria. Essa tecnologia permite a filtragem rápida de anticorpos geneticamente idênticos, de modo que a caracterização possa ser focada em anticorpos geneticamente distintos. Quando aplicado ao rastreamento de hibridoma, o MAP pode facilitar a identificação de clones de hibridoma raros que produzem mAbs com as características desejadas. O MAP pode ser utilizado para classificar os anticorpos da invenção em grupos de anticorpos que se ligam a diferentes epítomos.

[00159] Em certas modalidades, os anticorpos HA do grupo 2 do vírus influenza A ou seus fragmentos de ligação ao antígeno se ligam a um epítomo dentro de uma ou mais das regiões exemplificadas na HA influenza, na forma natural ou produzida de forma recombinante, ou a um fragmento do mesmo.

[00160] A presente invenção inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza que se ligam ao mesmo epítomo, ou a uma porção do epítomo. Da mesma forma, a presente invenção também inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 da influenza A que competem pela ligação ao HA do grupo 2 da influenza A ou um fragmento do mesmo com qualquer um dos anticorpos

exemplares específicos aqui descritos. Por exemplo, a presente invenção inclui anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza que competem cruzadamente pela ligação ao HA do grupo 2 da influenza A com um ou mais anticorpos obtidos a partir daqueles anticorpos descritos na Tabela 1.

[00161] Pode-se facilmente determinar se um anticorpo se liga ao mesmo epítipo ou compete com um anticorpo de referência anti-influenza A HA 2 do grupo usando métodos de rotina conhecidos na técnica. Por exemplo, para determinar se um anticorpo de teste se liga ao mesmo epítipo que um anticorpo de referência HA do grupo 2 anti-influenza da invenção, é permitido que o anticorpo de referência se ligue a um HA ou peptídeo do grupo 2 da influenza A sob condições de saturação. Em seguida, é avaliada a capacidade de um anticorpo de teste de se ligar à molécula de HA do grupo 2 da influenza A. Se o anticorpo de teste for capaz de se ligar ao HA do grupo 2 da influenza A após a ligação de saturação com o anticorpo de HA do grupo 2 anti-influenza A de referência, pode-se concluir que o anticorpo de teste se liga a um epítipo diferente do que o anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A de referência. Por outro lado, se o anticorpo em teste não for capaz de se ligar ao HA do grupo 2 da influenza A após a ligação à saturação com o anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A de referência, o anticorpo em teste poderá se ligar ao mesmo epítipo do epítipo ligado pelo anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A da invenção.

[00162] Para determinar se um anticorpo compete pela ligação com um anticorpo HA de referência do grupo 2 anti-influenza A, a metodologia de ligação descrita acima é realizada em duas orientações: Em uma primeira orientação, permite-se que o anticorpo de referência se ligue a uma HA do grupo 2 da influenza A em condições de saturação, seguido de avaliação da ligação do anticorpo de teste à molécula da HA do grupo 2 da influenza A. Em uma segunda orientação, permite-se que o anticorpo de teste se ligue a uma molécula de HA do grupo 2 da influenza A em condições de saturação,

seguido de avaliação da ligação do anticorpo de referência à molécula de HA do grupo 2 da influenza A. Se em ambas as orientações apenas o primeiro anticorpo (saturante) for capaz de se ligar à molécula de HA do grupo 2 de influenza A, então conclui-se que o anticorpo de teste e o anticorpo de referência competem pela ligação à HA do grupo 2 da influenza A. Como será apreciado por aquele versado na técnica, um anticorpo que compete pela ligação com um anticorpo de referência pode não se ligar necessariamente ao epítipo idêntico ao anticorpo de referência, mas pode bloquear estereotipicamente a ligação do anticorpo de referência ligando uma sobreposição ou epítipo adjacente.

[00163] Dois anticorpos se ligam ao mesmo epítipo ou sobreposição se cada um inibe competitivamente (bloqueia) a ligação do outro ao antígeno. Ou seja, um excesso de 1, 5, 10, 20 ou 100 vezes de um anticorpo inibe a ligação do outro em pelo menos 50%, mas preferencialmente 75%, 90% ou até 99%, conforme medido em um ensaio de ligação competitiva (ver, por exemplo, Junghans *et al.*, *Cancer Res.* 1990 50: 1495-1502). Alternativamente, dois anticorpos têm o mesmo epítipo se essencialmente todas as mutações de aminoácidos no antígeno que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro. Dois anticorpos têm epítipos sobrepostos se algumas mutações de aminoácidos que reduzem ou eliminam a ligação de um anticorpo reduzem ou eliminam a ligação do outro.

[00164] Experimentação de rotina adicional (por exemplo, mutações peptídicas e análises de ligação) podem então ser realizadas para confirmar se a falta observada de ligação do anticorpo em teste é de fato devido à ligação ao mesmo epítipo que o anticorpo de referência ou se o bloqueio estérico (ou outro fenômeno) é responsável por a falta de ligação observada. Experiências deste tipo podem ser realizadas usando ELISA, RIA, ressonância plasmônica de superfície, citometria de fluxo ou qualquer outro ensaio quantitativo ou

qualitativo de ligação a anticorpos disponível na técnica.

Imunoconjugados

[00165] A invenção abrange um anticorpo monoclonal HA humano anti-influenza A do grupo 2 conjugado com uma porção terapêutica ("imunoconjugado"), como um toxóide ou um medicamento antiviral para tratar a infecção pelo vírus influenza. Como usado aqui, o termo "imunoconjugado" refere-se a um anticorpo, quimicamente ou biologicamente ligado a um agente radioativo, uma citocina, um interferon, uma porção alvo ou repórter, uma enzima, um peptídeo ou proteína ou um agente terapêutico. O anticorpo pode estar ligado ao agente radioativo, citocina, interferon, unidade alvo ou repórter, enzima, peptídeo ou agente terapêutico em qualquer local ao longo da molécula, desde que seja capaz de se ligar ao seu alvo. Exemplos de imunoconjugados incluem conjugados de drogas anticorpo e proteínas de fusão anticorpo-toxina. Em uma modalidade, o agente pode ser um segundo anticorpo diferente para Influenza-HA. Em certas modalidades, o anticorpo pode ser conjugado com um agente específico para uma célula infectada por vírus. O tipo de fração terapêutica que pode ser conjugada com o anticorpo anti-influenza-HA e levará em consideração a condição a ser tratada e o efeito terapêutico desejado a ser alcançado. Exemplos de agentes adequados para a formação de imunoconjugados são conhecidos na técnica; ver, por exemplo, WO 05/103081.

Anticorpos Multiespecíficos

[00166] Os anticorpos da presente invenção podem ser monoespecíficos, biespecíficos ou multiespecíficos. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítomos de um polipeptídeo alvo ou podem conter domínios de ligação ao antígeno específicos para mais de um polipeptídeo alvo. Ver, por exemplo, Tutt *et al.*, 1991, *J. Immunol.* 147:60-69; Kufer *et al.*, 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238-244.

[00167] Qualquer uma das moléculas de ligação a antígeno multiespecíficas da invenção, ou variantes das mesmas, pode ser construída usando técnicas biológicas moleculares padrão (por exemplo, tecnologia de expressão de DNA e proteína recombinante), como será conhecido por aquele versado na técnica.

[00168] Em algumas modalidades, os anticorpos específicos para a HA do grupo 2 da influenza A são gerados em um formato biespecífico (um "biespecífico") no qual regiões variáveis que se ligam a domínios distintos da HA do grupo 2 da influenza A são ligadas para conferir domínio duplo especificidade dentro de uma única molécula de ligação. Biespecíficos adequadamente projetados podem melhorar a eficácia inibidora da proteína HA do grupo 2 da influenza A, aumentando a especificidade e a avidéz de ligação. Regiões variáveis com especificidade para domínios individuais (por exemplo, segmentos do domínio N-terminal), ou que podem se ligar a diferentes regiões dentro de um domínio, são emparelhados em um andaime estrutural que permite que cada região se ligue simultaneamente aos epítomos separados ou a diferentes regiões dentro de um domínio. Em um exemplo para regiões variáveis biespecíficas de cadeia pesada (V_H) de um aglutinante com especificidade para um domínio são recombinadas com regiões variáveis da cadeia leve (V_L) de uma série de ligantes com especificidade para um segundo domínio para identificar parceiros de V_L não cognato que podem ser emparelhados com um V_H original sem interromper a especificidade original para esse V_H . Dessa maneira, um único segmento V_L (por exemplo, V_{L1}) pode ser combinado com dois domínios V_H diferentes (por exemplo, V_{H1} e V_{H2}) para gerar um biespecífico composto por dois "braços" de ligação (V_{H1} - V_{L1} e V_{H2} - V_{L1}). O uso de um único segmento V_L reduz a complexidade do sistema e, portanto, simplifica e aumenta a eficiência nos processos de clonagem, expressão e purificação usados para gerar o biespecífico (ver, por exemplo, USSN13/022759 e US2010/0331527).

[00169] Alternativamente, os anticorpos que se ligam a mais de um domínio e um segundo alvo, como, por exemplo, um segundo anticorpo HA diferente do grupo 2 anti-influenza A, podem ser preparados em um formato biespecífico usando as técnicas descritas aqui, ou outras técnicas conhecidas daqueles versados na técnica. As regiões variáveis de anticorpos que se ligam a regiões distintas podem ser ligadas juntamente com regiões variáveis que se ligam a locais relevantes, por exemplo, no vírus influenza, para conferir especificidade de antígeno duplo dentro de uma única molécula de ligação. Biespecíficos desta natureza projetados adequadamente têm uma função dupla. As regiões variáveis com especificidade para o domínio extracelular são combinadas com uma região variável com especificidade para fora do domínio extracelular e são emparelhadas em um andaime estrutural que permite que cada região variável se ligue aos antígenos separados.

[00170] Um exemplo de formato de anticorpo biespecífico que pode ser usado no contexto da presente invenção envolve o uso de um primeiro domínio de imunoglobulina (Ig) C_{H3} e um segundo domínio Ig C_{H3}, em que o primeiro e o segundo domínios Ig C_{H3} diferem um do outro por pelo menos um aminoácido e em que pelo menos uma diferença de aminoácidos reduz a ligação do anticorpo biespecífico à proteína A em comparação com um anticorpo biespecífico sem a diferença de aminoácidos. Em uma modalidade, o primeiro domínio Ig C_{H3} liga a proteína A e o segundo domínio Ig C_{H3} contém uma mutação que reduz ou abole a ligação à proteína A, como uma modificação do H95R (por numeração do exon IMGT; H435R pela numeração da UE). O segundo C_{H3} pode ainda compreender uma modificação de Y96F (por IMGT; Y436F por UE). Outras modificações que podem ser encontradas dentro do segundo C_{H3} incluem: D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, e V82I (por IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG1; N44S, K52N, e V82I (IMGT; N384S, K392N, e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG2; e

Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, e V82I (por IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, e V422I por EU) no caso de anticorpos de IgG4. Variações no formato de anticorpo biespecífico descrito acima são contempladas dentro do escopo da presente invenção.

[00171] Outros formatos biespecíficos exemplares que podem ser usados no contexto da presente invenção incluem, sem limitação, por exemplo, formatos biespecíficos baseados em scFv ou diacorpo, fusões de IgG-scFv, domínio variável duplo (DVD)-Ig, Quadroma, *knobs-into-holes*, cadeia leve comum (por exemplo, cadeia leve comum com *knobs-into-holes*, etc.), corpo CrossMab, CrossFab, (SEED), zíper de leucina, Duobody, IgG1/IgG2, Fab de ação dupla (DAF)-IgG e Mab² formatos biespecíficos (ver, por exemplo, Klein et al. 2012, mAbs 4:6, 1-11 e referências aí citadas, para uma revisão dos formatos anteriores). Os anticorpos biespecíficos também podem ser construídos usando conjugação peptídeo/ácido nucleico, por exemplo, em que aminoácidos não naturais com reatividade química ortogonal são usados para gerar conjugados anticorpo-oligonucleotídeo específicos do local que se automontam em complexos multiméricos com composição, valência e geometria definidas. (Ver, por exemplo, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [*Epub*: 4 de dezembro de 2012]).

Administração Terapêutica e Formulações

[00172] A invenção fornece composições terapêuticas compreendendo os anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza ou seus fragmentos de ligação ao antígeno da presente invenção. As composições terapêuticas de acordo com a invenção serão administradas com carreadores, excipientes e outros agentes adequados que são incorporados nas formulações para proporcionar transferência, liberação, tolerância e similares aprimorados. Uma infinidade de formulações apropriadas pode ser encontrada na formulação conhecida por todos os químicos farmacêuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA. Essas

formulações incluem, por exemplo, pós, pastas, pomadas, geleias, ceras, óleos, lipídios, vesículas contendo lipídeos (catiônicos ou aniônicos) (tais como LIPOFECTIN™), conjugados de DNA, pastas de absorção anidra, emulsões óleo-em-água e água-em-óleo, carbowax de emulsões (polietilenoglicóis de vários pesos moleculares), géis semissólidos e misturas semissólidas contendo carbowax. Ver também Powell *et al.* "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA (1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311.

[00173] A dose de anticorpo pode variar dependendo da idade e do tamanho de um indivíduo a ser administrado, doença alvo, condições, via de administração e similares. Quando um anticorpo da presente invenção é utilizado para tratar uma doença ou distúrbio em um paciente adulto, ou para prevenir tal doença, é vantajoso administrar o anticorpo da presente invenção normalmente em uma dose única de cerca de 0,1 a cerca de 60 mg/kg de peso corporal, mais preferencialmente cerca de 5 a cerca de 60, cerca de 10 a cerca de 50 ou cerca de 20 a cerca de 50 mg/kg de peso corporal. Dependendo da gravidade da condição, a frequência e a duração do tratamento podem ser ajustadas. Em certas modalidades, o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode ser administrado como uma dose inicial de pelo menos cerca de 0,1 mg a cerca de 5000 mg, cerca de 1 a cerca de 2000 mg, cerca de 5 a cerca de 1000 mg ou cerca de 10 a cerca de 500 mg, a cerca de 100 mg ou a cerca de 50 mg. Em certas modalidades, a dose inicial pode ser seguida pela administração de uma segunda ou de várias doses subsequentes do anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno em uma quantidade que pode ser aproximadamente a mesma ou menor que a da dose inicial, em que o as doses subsequentes são separadas por pelo menos 1 dia a 3 dias; pelo menos uma semana, pelo menos 2 semanas; pelo menos 3 semanas; pelo menos 4 semanas; pelo menos 5 semanas; pelo menos 6 semanas; pelo menos 7 semanas; pelo menos 8 semanas; pelo menos 9 semanas; pelo menos 10

semanas; pelo menos 12 semanas; ou pelo menos 14 semanas.

[00174] Vários sistemas de entrega são conhecidos e podem ser utilizados para administrar a composição farmacêutica da invenção, por exemplo, encapsulamento em lipossomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capazes de expressar os vírus mutantes, endocitose mediada por receptor (ver, por exemplo, Wu et al. (1987) *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Métodos de introdução incluem, mas não estão limitados a rotas intradérmica, transdérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutânea, intranasal, epidural e oral. A composição pode ser administrada por qualquer via conveniente, por exemplo, por infusão ou injeção em bolus, por absorção através de revestimentos epiteliais ou mucocutâneos (por exemplo, mucosa oral, mucosa retal e intestinal, etc.) e pode ser administrada em conjunto com outros agentes biologicamente ativos. A administração pode ser sistêmica ou local. A composição farmacêutica também pode ser entregue em uma vesícula, em particular um lipossoma (ver, por exemplo, Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533).

[00175] A utilização de nanopartículas para liberar os anticorpos da presente invenção também é contemplada aqui. Nanopartículas conjugadas com anticorpos podem ser usadas tanto para aplicações terapêuticas quanto para diagnóstico. Nanopartículas conjugadas com anticorpos e métodos de preparação e uso são descritos em detalhes por Arruebo, M., et al. 2009 (“Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications” in *J. Nanomat.* Volume 2009, Article ID 439389, 24 páginas, doi: 10.1155/2009/439389), incorporado aqui por referência. Nanopartículas podem ser desenvolvidas e conjugadas com anticorpos contidos em composições farmacêuticas para atingir células infectadas por vírus. Nanopartículas para administração de drogas também foram descritas em, por exemplo, US 8257740 ou US 8246995, cada uma incorporada aqui na sua totalidade.

[00176] Em determinadas situações, a composição farmacêutica pode ser entregue em um sistema de liberação controlada. Em uma modalidade, uma bomba pode ser usada. Em outra modalidade, materiais poliméricos podem ser usados. Em ainda outra modalidade, um sistema de liberação controlada pode ser colocado na proximidade do alvo da composição, exigindo, assim, apenas uma fração da dose sistêmica.

[00177] As preparações injetáveis podem incluir formas de dosagem para injeções intravenosas, subcutâneas, intracutâneas, intracranianas, intraperitoneais e intramusculares, infusões por gotejamento, etc. Essas preparações injetáveis podem ser preparadas por métodos publicamente conhecidos. Por exemplo, as preparações injetáveis podem ser preparadas, por exemplo, por meio de dissolução, suspensão ou emulsificação do anticorpo ou sal dele descrito acima em um meio aquoso estéril ou um meio oleoso convencionalmente usado para injeções. Como meio aquoso para injeções, há, por exemplo, soro fisiológico, uma solução isotônica contendo glicose e outros agentes auxiliares etc., que podem ser usados em combinação com um agente solubilizante adequado, tal como um álcool (por exemplo, etanol), um poliálcool (por exemplo, propilenoglicol, polietilenoglicol), um surfactante não iônico [por exemplo, polissorbato 80, HCO-50 (polioxietileno (50 mol) aduto de óleo de castor hidrogenado)] etc. Como o meio oleoso, há empregados, por exemplo, óleo de gergelim, óleo de soja, etc., que pode ser usado em combinação com um agente solubilizante, tal como benzoato de benzila, álcool benzílico etc. A injeção assim preparada é preferencialmente preenchida em uma ampola apropriada.

[00178] Uma composição farmacêutica da presente invenção pode ser entregue por via subcutânea ou intravenosa com uma agulha e seringa padrão. Além disso, no que diz respeito à administração subcutânea, um dispositivo de administração de caneta tem aplicações prontas na administração de uma composição farmacêutica da presente invenção. Tal dispositivo de

distribuição de caneta pode ser reutilizável ou descartável. Um dispositivo de distribuição de caneta reutilizável geralmente utiliza um cartucho substituível que contém uma composição farmacêutica. Uma vez que toda a composição farmacêutica dentro do cartucho tenha sido administrada e o cartucho estiver vazio, o cartucho vazio poderá ser facilmente descartado e substituído por um novo cartucho que contém a composição farmacêutica. O dispositivo de distribuição de caneta pode então ser reutilizado. Em um dispositivo de distribuição de caneta descartável, não há cartucho substituível. Em vez disso, o dispositivo de distribuição de caneta descartável vem pré-preenchido com a composição farmacêutica mantida em um reservatório dentro do dispositivo. Uma vez que o reservatório é esvaziado da composição farmacêutica, o dispositivo inteiro é descartado.

[00179] Numerosos dispositivos de administração de caneta e autoinjeter reutilizáveis têm aplicações na administração subcutânea de uma composição farmacêutica da presente invenção. Exemplos incluem, mas não estão limitados a, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), caneta DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suíça), caneta HUMALOG MIX 75/25™, caneta HUMALOG™, caneta HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN), NOVOPEN™ I, II e III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), caneta BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, e OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemanha), para citar apenas alguns. Exemplos de dispositivos de distribuição de caneta descartáveis com aplicações na entrega subcutânea de uma composição farmacêutica da presente divulgação incluem, mas certamente não estão limitados a caneta SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) e KWIKPEN™ (Eli Lilly), o autoinjeter SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), a PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemanha), a EPIPEN (Dey,

L.P.) e a Caneta HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), para citar apenas alguns.

[00180] Vantajosamente, as composições farmacêuticas para uso oral ou parenteral descritas acima são preparadas em formas de dosagem em uma dose unitária adequada para se ajustar a uma dose dos ingredientes ativos. Tais formas de dosagem em uma dose unitária incluem, por exemplo, comprimidos, pílulas, cápsulas, injeções (ampolas), supositórios etc. A quantidade do anticorpo contido é geralmente de cerca de 5 a cerca de 5000 mg por forma de dosagem numa dose unitária; especialmente na forma de injeção, é preferencial que o anticorpo esteja contido em cerca de 5 a cerca de 500 mg e em cerca de 10 a cerca de 250 mg para as outras formas de dosagem.

Usos Terapêuticos dos Anticorpos

[00181] Os anticorpos da presente invenção são úteis para o tratamento e/ou prevenção de uma doença ou distúrbio ou condição associada à infecção pelo vírus influenza e/ou para melhorar pelo menos um sintoma associado a essa doença, distúrbio ou condição.

[00182] Em certas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para tratar indivíduos que sofrem da infecção respiratória grave e aguda causada pelo vírus da influenza. Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção são úteis para diminuir os títulos virais ou reduzir a carga viral no hospedeiro. Em uma modalidade, um anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno da invenção pode ser administrado em uma dose terapêutica a um paciente com infecção pelo vírus influenza.

[00183] Um ou mais anticorpos da presente invenção podem ser administrados para aliviar ou prevenir ou diminuir a gravidade de um ou mais dos sintomas ou condições da doença ou distúrbio. Os anticorpos podem ser usados para melhorar ou reduzir a gravidade de pelo menos um sintoma da infecção pelo vírus influenza, incluindo, mas não limitado a febre, tosse, dor

de garganta, dor de cabeça, dores no corpo, fadiga, exaustão extrema, falta de ar, bronquite, pneumonia e morte.

[00184] Também é contemplado aqui usar um ou mais anticorpos da presente invenção profilaticamente para indivíduos em risco de desenvolver uma infecção pelo vírus influenza, como indivíduos imunocomprometidos, idosos (mais de 65 anos de idade), crianças menores de 2 anos de idade, profissionais de saúde, familiares próximos de um paciente com infecção pelo vírus influenza e pacientes com histórico médico (por exemplo, risco aumentado de infecção pulmonar, doença cardíaca ou diabetes).

[00185] Em uma outra modalidade da invenção, os presentes anticorpos são utilizados para a preparação de uma composição farmacêutica para o tratamento de pacientes que sofrem de uma infecção pelo vírus influenza. Em outra modalidade da invenção, os presentes anticorpos são utilizados como terapia adjuvante com qualquer outro agente ou qualquer outra terapia conhecida daqueles versados na técnica útil para tratar ou melhorar uma infecção pelo vírus influenza.

Terapias de Combinação

[00186] As terapias de combinação podem incluir um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza da invenção e qualquer agente terapêutico adicional que possa ser vantajosamente combinado com um anticorpo da invenção ou com um fragmento biologicamente ativo de um anticorpo da invenção. Os anticorpos da presente invenção podem ser combinados sinergicamente com um ou mais fármacos ou agentes (por exemplo, agentes antivirais) usados para tratar o vírus influenza.

[00187] Por exemplo, exemplos de agentes antivirais incluem, por exemplo, vacinas, inibidores de neuraminidase ou análogos de nucleosídeos. Outros agentes antivirais exemplares que podem ser utilizados em combinação com um anticorpo da invenção podem incluir, por exemplo, zidovudina, gangcyclovir, vidarabina, idoxuridina, trifluridina, foscarnet,

aciclovir, ribavirina, amantadina, remantidina, saquinavir, indinavir, ritonavir, alfa-interferons e outros interferons, um inibidor da neuraminidase (por exemplo, zanamivir (RELENZA®), oseltamivir (TAMIFLU®) laninamivir, peramivir) ou rimantadina.

[00188] Outros fármacos antivirais exemplares incluem, mas não estão limitados a, um inibidor de HA, um inibidor de ácido siálico e um inibidor de canal iônico M2. Em uma modalidade, o inibidor de canal de íon M2 é amantadina ou rimantadina.

[00189] Em algumas modalidades, os anticorpos da invenção podem ser combinados com um segundo agente terapêutico para reduzir a carga viral em um paciente com uma infecção pelo vírus influenza ou para melhorar um ou mais sintomas da infecção.

[00190] Os anticorpos da presente invenção podem ser utilizados em combinação com um medicamento anti-inflamatório (por exemplo, corticosteróides e anti-inflamatórios não esteróides), descongestionante, anti-histamínico, anti-infeccioso, anticorpo diferente ao vírus Influenza, anti-viral, vacina para vírus influenza, como FLUMIST® ou FLUVIRIN®, um suplemento dietético como antioxidantes ou qualquer outra terapia paliativa para tratar uma infecção pelo vírus influenza.

[00191] Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é outro anticorpo para influenza. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é outro anticorpo contra a hemaglutinina da influenza. Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é outro anticorpo para uma proteína influenza diferente, como a neuraminidase ou o ectodomínio tetramérico da proteína 2 da matriz (proteína M2e). Em certas modalidades, o segundo agente terapêutico é um anticorpo para uma proteína diferente, como a protease transmembranar do hospedeiro, a serina 2 (TMPRSS2). O segundo anticorpo pode ser específico para uma ou mais proteínas diferentes do vírus influenza de diferentes subtipos ou cepas do vírus. É aqui contemplado o uso

de uma combinação ("coquetel") de anticorpos com ampla atividade de neutralização ou inibição contra o vírus influenza. Em algumas modalidades, os anticorpos não concorrentes podem ser combinados e administrados a um indivíduo em necessidade, para reduzir a capacidade do vírus da influenza de escapar devido a rápida mutação como resultado da pressão de seleção. Em algumas modalidades, os anticorpos que compreendem a combinação se ligam a epítomos distintos não sobrepostos na proteína HA. Os anticorpos que compreendem a combinação podem bloquear a ligação do vírus e/ou a entrada e/ou fusão com as células hospedeiras. Os anticorpos podem interagir com uma hemaglutinina selecionada a partir de qualquer um ou mais dos subtipos de influenza A do grupo 2, incluindo os subtipos H3, H4, H7, H10, H14 e H15 e, quando utilizados isoladamente ou em combinação com qualquer um ou mais dos agentes mencionados acima, pode neutralizar qualquer um ou mais subtipos de influenza do grupo 2, incluindo, mas não se limitando ao seguinte: H3N2, H7N9.

[00192] Também é contemplado aqui usar uma combinação de anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza da presente invenção, em que a combinação compreende um ou mais anticorpos que não competem de forma cruzada; Em algumas modalidades, a combinação inclui um primeiro anticorpo com ampla atividade de neutralização com um segundo anticorpo com atividade contra um espectro estreito de isolados e que não concorre com o primeiro anticorpo.

[00193] Conforme usado aqui, o termo "em combinação com" significa que componentes adicionais terapeuticamente ativos podem ser administrados antes, simultaneamente ou após a administração do anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A da presente invenção. O termo "em combinação com" também inclui administração sequencial ou concomitante de um anticorpo anti-influenza-HA e um segundo agente terapêutico.

[00194] O(s) componente(s) terapeuticamente ativo(s) adicional(ais)

podem ser administrados a um indivíduo antes da administração de um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A da presente invenção. Por exemplo, um primeiro componente pode ser considerado administrado "antes" de um segundo componente se o primeiro componente for administrado 1 semana antes, 72 horas antes, 60 horas antes, 48 horas antes, 36 horas antes, 24 horas antes, 12 horas antes, 6 horas antes, 5 horas antes, 4 horas antes, 3 horas antes, 2 horas antes, 1 hora antes, 30 minutos antes, 15 minutos antes, 10 minutos antes, 5 minutos antes ou menos de 1 minuto antes da administração do segundo componente. Em outras modalidades, os componentes terapêuticamente ativos adicionais podem ser administrados a um indivíduo após a administração de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza da presente invenção. Por exemplo, um primeiro componente pode ser considerado administrado "após" um segundo componente se o primeiro componente for administrado 1 minuto após, 5 minutos após, 10 minutos após, 15 minutos após, 30 minutos após, 1 hora após, 2 horas após, 3 horas após, 4 horas após, 5 horas após, 6 horas após, 12 horas após, 24 horas após, 36 horas após, 48 horas após, 60 horas após, 72 horas após a administração do segundo componente. Em ainda outras modalidades, o(s) componente(s) terapêuticamente ativo(s) adicional(is) podem ser administrado(s) a um indivíduo simultaneamente à administração de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A da presente invenção. A administração "simultânea", para os fins da presente invenção, inclui, por exemplo, administração de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza e um componente terapêuticamente ativo adicional a um indivíduo em uma forma de dosagem única ou em formas de dosagem separadas administradas ao indivíduo em cerca de 30 minutos ou menos um do outro. Se administrado em formas de dosagem separadas, cada forma de dosagem pode ser administrada pela mesma via (por exemplo, tanto o anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza quanto o componente terapêuticamente ativo adicional podem ser

administrados por via intravenosa, etc.); alternativamente, cada forma de dosagem pode ser administrada por uma via diferente (por exemplo, o anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A pode ser administrado por via intravenosa e o componente terapeuticamente ativo adicional pode ser administrado por via oral). Em qualquer caso, a administração dos componentes em uma dosagem única a partir de, em formas de dosagem separadas pela mesma via, ou em formas de dosagem separadas por diferentes vias é considerada "administração simultânea", para os fins da presente divulgação. Para os fins da presente divulgação, considera-se a administração de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza "antes de", "concomitante com" ou "depois de" (como esses termos são definidos aqui acima), a administração de um componente terapeuticamente ativo adicional é considerada administração de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza "em combinação com" um componente terapeuticamente ativo adicional.

[00195] A presente invenção inclui composições farmacêuticas nas quais um anticorpo anti-HA do grupo 2 antigripal da presente invenção é co-formulado com um ou mais componentes adicionais terapeuticamente ativos, como descrito em outras partes deste documento.

Regimes de Administração

[00196] De acordo com certas modalidades, uma dose única de um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A da invenção (ou uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A e qualquer um dos agentes terapeuticamente ativos adicionais mencionados aqui) pode ser administrado a um indivíduo em necessidade. De acordo com certas modalidades da presente invenção, doses múltiplas de um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A (ou uma composição farmacêutica compreendendo uma combinação de um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A e qualquer um dos agentes terapeuticamente ativos adicionais mencionados aqui) podem ser administradas a um indivíduo

durante um período de tempo definido. Os métodos de acordo com este aspecto da invenção compreendem administrar sequencialmente a um indivíduo doses múltiplas de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza da invenção. Como aqui utilizado, "administração sequencial" significa que cada dose de anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza é administrada ao indivíduo em um momento diferente, por exemplo, em dias diferentes, separados por um intervalo predeterminado (por exemplo, horas, dias, semanas ou meses). A presente invenção inclui métodos que compreendem administrar sequencialmente ao paciente uma dose inicial única de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza, seguida por uma ou mais doses secundárias do anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A e, opcionalmente, seguida por um ou mais doses terciárias do anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza.

[00197] Os termos "dose inicial", "doses secundárias" e "doses terciárias" referem-se à sequência temporal de administração do anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A da invenção. Assim, a "dose inicial" é a dose que é administrada no início do regime de tratamento (também referida como "dose de referência"); as "doses secundárias" são as doses administradas após a dose inicial; e as "doses terciárias" são as doses que são administradas após as doses secundárias. As doses inicial, secundária e terciária podem conter a mesma quantidade de anticorpo anti-influenza-HA, mas geralmente podem diferir uma da outra em termos de frequência de administração. Em certas modalidades, no entanto, a quantidade de anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A contida nas doses inicial, secundária e/ou terciária varia uma da outra (por exemplo, ajustado para cima ou para baixo, conforme apropriado) durante o curso do tratamento. Em certas modalidades, dois ou mais (por exemplo, 2, 3, 4 ou 5) doses são administradas no início do regime de tratamento como "doses de carga" seguidas de doses subsequentes que são administradas com menos frequência (por exemplo, "doses de

manutenção").

[00198] Em certas modalidades exemplares da presente invenção, cada dose secundária e/ou terciária é administrada 1 a 48 horas (por exemplo, 1, 1½, 2, 2½, 3, 3½, 4, 4½, 5, 5½, 6, 6½, 7, 7½, 8, 8½, 9, 9½, 10, 10½, 11, 11½, 12, 12½, 13, 13½, 14, 14½, 15, 15½, 16, 16½, 17, 17½, 18, 18½, 19, 19½, 20, 20½, 21, 21½, 22, 22½, 23, 23½, 24, 24½, 25, 25½, 26, 26½ ou mais) após a dose imediatamente anterior. A frase "a dose imediatamente anterior", como aqui utilizada, significa, em uma sequência de várias administrações, a dose de anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A, que é administrada a um paciente antes da administração da dose seguinte na sequência sem doses intermediárias.

[00199] Os métodos de acordo com este aspecto da invenção podem compreender a administração a um paciente de qualquer número de doses secundárias e/ou terciárias de um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A. Por exemplo, em certas modalidades, apenas uma dose secundária única é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) doses secundárias são administradas ao paciente. Da mesma forma, em certas modalidades, apenas uma dose terciária única é administrada ao paciente. Em outras modalidades, duas ou mais (por exemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou mais) doses terciárias são administradas ao paciente.

[00200] Em certas modalidades da invenção, a frequência na qual as doses secundárias e/ou terciárias são administradas a um paciente pode variar ao longo do curso do regime de tratamento. A frequência da administração também pode ser ajustada durante o curso do tratamento por um médico, dependendo das necessidades de cada paciente após o exame clínico.

Usos de Diagnóstico dos Anticorpos

[00201] Os anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza da presente invenção podem ser usados para detectar e/ou medir a HA do grupo 2 da

influenza A em uma amostra, por exemplo, para fins de diagnóstico. Algumas modalidades contemplam o uso de um ou mais anticorpos da presente invenção em ensaios para detectar uma doença ou distúrbio, como infecção viral. Ensaios de diagnóstico exemplares para HA do grupo 2 da gripe A podem compreender, por exemplo, entrar em contato com uma amostra obtida de um paciente com um anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A da invenção, em que o anticorpo HA do grupo 2 anti-influenza A é marcado com uma etiqueta detectável ou molécula repórter ou usado como ligante de captura para isolar seletivamente a HA do grupo 2 da gripe A de amostras de pacientes. Alternativamente, um anticorpo anti-HA do grupo 2 anti-influenza A não marcado pode ser usado em aplicações de diagnóstico em combinação com um anticorpo secundário que é ele próprio marcado de forma detectável. O marcador detectável ou a molécula repórter pode ser um radioisótopo, como ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ou ^{125}I ; uma porção fluorescente ou quimioluminescente, tal como isotiocianato de fluoresceína ou rodamina; ou uma enzima como fosfatase alcalina, p-galactosidase, peroxidase de rábano silvestre ou luciferase. Ensaios exemplares específicos que podem ser usados para detectar ou medir a HA do grupo 2 da influenza em uma amostra incluem ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), radioimunoensaio (RIA) e classificação celular ativada por fluorescência (FACS).

[00202] As amostras que podem ser usadas nos ensaios de diagnóstico de HA do grupo 2 da gripe A de acordo com a presente invenção incluem qualquer amostra de tecido ou fluido obtida de um paciente, que contém quantidades detectáveis de HA do grupo 2 da gripe A ou seus fragmentos, em condições normais ou patológicas. Geralmente, os níveis de HA do grupo 2 da gripe A em uma amostra específica obtida de um paciente saudável (por exemplo, um paciente não afetado por uma doença associada à influenza será medido para estabelecer inicialmente um nível basal ou padrão de HA do grupo 2 da influenza A. Esse nível basal de HA do grupo 2 da influenza A

pode então ser comparado com os níveis de HA do grupo 2 da influenza A, medidos em amostras obtidas de indivíduos suspeitos de ter uma condição associada à HA da influenza A do grupo 2 ou sintomas associados a essa condição.

[00203] Os anticorpos específicos para HA do grupo 2 da gripe A podem não conter marcadores ou porções adicionais, ou podem conter um marcador ou porção N-terminal ou C-terminal. Em uma modalidade, o marcador ou porção é biotina. Em um ensaio de ligação, a localização de um marcador (se houver) pode determinar a orientação do peptídeo em relação à superfície na qual o peptídeo está ligado. Por exemplo, se uma superfície for revestida com avidina, um peptídeo contendo uma biotina N-terminal será orientado de modo que a porção C-terminal do peptídeo fique distal à superfície.

EXEMPLOS

[00204] Os exemplos a seguir são apresentados a fim de fornecer às pessoas versadas na técnica uma divulgação e descrição completas de como produzir e usar os métodos e composições da invenção, e não se destinam a limitar o escopo do que os inventores consideram como sua invenção. Esforços têm sido feitos para garantir a precisão em relação a números usados (por exemplo, quantidades, temperatura, etc.), mas alguns erros e desvios experimentais devem ser considerados. Salvo indicação em contrário, as partes são partes em peso, o peso molecular é o peso molecular médio, a temperatura é em graus centígrados, a temperatura ambiente é de cerca de 25°C, e a pressão está na ou perto da atmosfera.

Exemplo 1: Geração de Anticorpos Humanos para a Hemaglutinina do Grupo 2 da Influenza A (HA)

[00205] Anticorpos humanos para HA do grupo 2 da influenza A foram gerados em um camundongo VELOCIMMUNE® compreendendo DNA que codifica regiões variáveis de cadeia pesada e kappa leve de

imunoglobulina humana. Os camundongos foram imunizados com A/Hong Kong/08/1968 (H3N2), seguido por A/Hong Kong/05/1972-PR8-X36 (H3N2) e depois novamente com A/Hong Kong/08/1968 (H3N2). Todos os camundongos foram reforçados com uma mistura 1:1 de DNAs que codificam o HA de A/Wisconsin/67/X-161/2005 (H3N2) e A/galinha/Holanda/01/2003 (H7N7). A resposta imune do anticorpo foi monitorada por um imunoenensaio específico para HA do grupo 2 da influenza A. Quando uma resposta imune desejada foi alcançada, os esplenócitos foram colhidos e fundidos com células de mieloma de camundongo para preservar sua viabilidade e formar linhas celulares de hibridoma. As linhagens celulares de hibridoma foram rastreadas e selecionadas para identificar linhas celulares que produzem anticorpos específicos para HA do grupo 2 da influenza A. Usando essa técnica, e os vários imunógenos descritos acima, vários anticorpos quiméricos (ou seja, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes de camundongos) foram obtidos.

[00206] Os anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza também foram isolados diretamente de células B de camundongo positivas para antígeno, sem fusão com células de mieloma, como descrito na Patente dos EUA 7582298, aqui incorporada especificamente por referência em sua totalidade. Usando esse método, vários anticorpos anti-influenza HA totalmente humanos (isto é, anticorpos possuindo domínios variáveis humanos e domínios constantes humanos) foram obtidos.

[00207] Dois anticorpos exemplares aqui descritos são designados H1H14611N2 e H1H14612N2.

[00208] As propriedades biológicas dos anticorpos exemplares gerados de acordo com os métodos deste Exemplo são descritas em detalhes nos Exemplos apresentados abaixo.

Exemplo 2: Sequências de Aminoácidos e Nucleotídeos da Região Variável de Cadeia Pesada e Leve

[00209] A Tabela 1 apresenta os identificadores da sequência de aminoácidos das regiões variáveis das cadeias pesada e leve e CDRs dos anticorpos anti-HA do grupo 2 anti-influenza A selecionados da invenção. Os identificadores de sequência de ácidos nucleicos correspondentes são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1: Identificadores de Sequência de Aminoácidos

Denominação do Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H14611N2	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H14612N2	18	20	22	24	26	28	30	32

Tabela 2: Identificadores de Sequência de Ácidos Nucleicos

Denominação do Anticorpo	SEQ ID NOs:							
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H14611N2	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H14612N2	17	19	21	23	25	27	29	31

[00210] Os anticorpos são normalmente referidos aqui de acordo com a seguinte nomenclatura: Prefixo Fc (por exemplo, "H1H", "H2M" etc.), seguido por um identificador numérico (por exemplo, "14611", "14612", etc., como mostrado na Tabela 1 ou 2), seguido por um sufixo "P", "P2", "N", N2 ou "B". Assim, de acordo com esta nomenclatura, um anticorpo pode ser referido neste documento como, por exemplo, "H1H14611N2", "H1H14612N2", etc. Os prefixos H1H ou H2M nas designações de anticorpos aqui utilizados indicam o isotipo particular da região Fc do anticorpo. Por exemplo, um anticorpo "H1M" possui um IgG1 Fc de camundongo e um anticorpo "H2M" possui um IgG2 Fc de camundongo (isotipo a ou b) (todas as regiões variáveis são totalmente humanas, conforme indicado pelo primeiro 'H' na designação de anticorpos). Como será apreciado por aquele versado na técnica, um anticorpo com um isotipo Fc específico pode ser convertido em um anticorpo com um isotipo Fc diferente (por exemplo, um anticorpo com um IgG1 Fc de camundongo pode ser convertido em um anticorpo com um IgG4 humano, etc.), mas, em qualquer caso, os domínios variáveis (incluindo as CDRs) - indicados pelos identificadores numéricos mostrados nas Tabelas 1 e 2 permanecerá o mesmo, e espera-se que as propriedades de ligação ao

H1H14611 N2 (especificidade do grupo 2)	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	8,22E-09	86	IC [§]	IC
Tampão	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB	NB

IC[§]: NB inconclusivo: Sem ligação

Resultados

[00213] H1H14611N2 liga o grupo 2, H3 HA com alta afinidade (Tabela 3). A constante de dissociação de equilíbrio (valor K_D) estava na faixa baixa de nM para A/Hiroshima/52/2005 (H3N2; $K_D = 8,22E^{-09}$). H1H14611N2 não se ligou às cepas do grupo 1.

Exemplo 4: H1H14611N2 e H1H14612N2 neutralizam potentemente uma ampla gama de vírus da influenza A do grupo 2

[00214] Os exemplos de anticorpos monoclonais (mAb) H1H14611N2 e H1H14612N2 foram selecionados para ensaios *in vitro* de microneutralização usando dois formatos diferentes para avaliar a amplitude e potência dos anticorpos.

Ensaio de microneutralização da viabilidade celular

[00215] Os anticorpos monoclonais foram testados em um ensaio de microneutralização para avaliar a amplitude e a potência. Em resumo, as células do rim canino Madin-Darby (MDCK) foram plaqueadas a $6,0 \times 10^3$ células/poço em uma placa de 96 poços. O diluente de vírus foi adicionado apenas aos poços de controle de fundo. As células foram incubadas por 4 a 5 horas a 37°C com 5% de CO₂. Os anticorpos monoclonais foram diluídos na concentração final 4 vezes no diluente do vírus. Os anticorpos foram diluídos 1:3 em duplicado. O vírus foi descongelado no gelo e diluído até a concentração predeterminada apropriada. O vírus diluído foi adicionado aos mAbs diluídos. A mistura mAb-vírus foi imediatamente transferida para as células MDCK e incubada a 37°C com 5% de CO₂ por 72h. Poços de controle de vírus e controle de células não infectadas também foram incluídos. No dia 4, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm por 3 minutos. As células foram lisadas usando 100 µL de substrato CelTiter-Glo e a liberação de ATP medida

por luminescência (Victor X3, PerkinElmer). A porcentagem de viabilidade foi determinada em relação ao controle não infectado. Os valores de viabilidade foram analisados usando regressão 4PL não linear para determinar valores de CI_{50} (GraphPad Prism).

Ensaio de microneutralização de HA

[00216] Resumidamente, as células de rim canino Madin-Darby (MDCK) foram semeadas e incubadas durante a noite para atingir 80-100% de confluência no dia seguinte. Os anticorpos monoclonais foram diluídos no meio de infecção viral (VIM) para 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e diluídos 1:2 em triplicado ou quadruplicado. O H5N1 A/Vietnã/1203/2004 ou H1N1 A/Califórnia/07/2009 foi diluído em VIM e adicionado aos anticorpos diluídos e incubado por 1 h. As amostras foram então transferidas para os MDCKs e incubadas por 48 h. Após a incubação, 50 μL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Glóbulos vermelhos de peru ou de cavalo diluídos foram adicionados ao sobrenadante e incubados à temperatura ambiente por 30 ou 60 min. O título de hemaglutinação foi registrado como o recíproco da última diluição que inibia completamente a hemaglutinação.

Resultados

[00217] Os resultados mostraram que o H1H14611N2 e o H1H14612N2 neutralizaram numerosos e diversos isolados do vírus influenza A do grupo 2 nos ensaios de microneutralização. O CI_{50} (nM) para H1H14611N2 e H1H14612N2 no que diz respeito à neutralização de três cepas diferentes de influenza (A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2), A/Filipinas/01/1982 (H3N2) e A/Xangai/01/2013-PR8 (H7N9)) são mostrados na Tabela 4 e as curvas de dose-resposta para as cepas, incluindo A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2), A/Filipinas/02/1982 (H3N2) e A/Xangai/01/2013 (H7N9) também são mostrados nas Figuras 1 A, B e C, respectivamente (H1H14611N2 mostrado como triângulos; H1H14612N2 mostrado como triângulos invertidos; hIgG1 irrelevante mostrado como

diamantes). Os resultados de estudos de neutralização adicionais contra a cepa influenza A/Victoria/316/2011 (H3N2) usando uma leitura de hemaglutinação são mostrados na Tabela 5. A tabela 5 mostra a menor concentração de mAb (nM) em que não foi detectada hemaglutinação de hemácias. Também foi incluído nesses estudos um controle hIgG1 negativo.

Tabela 4: Resumo da atividade de neutralização de Mabs de 2 HA anti-grupo contra várias cepas da influenza (IC₅₀ Nm)

mAb	A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2)	A/Filipinas/01/1982 (H3N2)	A/Xangai/01/2013-PR8 (H7N9)
H1H14611N2	7,830	68,37	404,7
H1H14612N2	5,700	37,60	>6666
Controle hIgG1 irrelevante/negativo	>833	>3333	>6666

Os dados são de um dos pelo menos três estudos que mostram resultados semelhantes.

Tabela 5: Resumo da Atividade de Neutralização de Mabs de 2 HA Anti-grupo contra Cepa A de Influenza/Victoria/316/2011 (H3N2)

mAb	Concentração (nM)
H1H14611N2	41,7
H1H14612N2	166,7

Exemplo 5. H1H14611N2 e H1H14612N2 mediam a morte de células infectadas por vírus do grupo 2 HA via citotoxicidade dependente de complemento (CDC)

[00218] Os exemplos de anticorpos monoclonais (mAb) H1H14611N2 e H1H14612N2 foram selecionados para ensaios *in vitro* de citotoxicidade dependente de complemento (CDC). Resumidamente, células de rim canino Madin-Darby (MDCK) foram infectadas com A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2) a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 3, 30 horas antes do ensaio. As células alvo foram combinadas com os mAbs indicados nas concentrações indicadas. O complemento sérico humano normal (NHSC) foi preparado com três vezes a concentração final (15%) no meio de ensaio CDC. A percentagem de citotoxicidade foi medida utilizando CytoTox-Glo (Promega). Foram utilizados controles de fundo de soro lisados e detergentes para determinar os valores máximos e de lise de fundo. Na Figura 2 são mostrados H1H14611N2 (triângulos), H1H14612N2 (triângulos invertidos), juntamente com um hIgG1 (diamantes) irrelevante como controle. A

percentagem de lise específica foi calculada como $((\text{lise por mAb} + \text{NHSC}) - (\text{lise por NHSC apenas})) / ((\text{lise máxima detergente}) - (\text{lise apenas por NHSC})) \times 100$.

Resultados

[00219] H1H14611N2 e H1H14612N2 exibiram um aumento dependente da dose na capacidade de lisar especificamente células infectadas por vírus quando testadas em um ensaio CDC com MDCKs infectados com A/Aichi/02/1968-PR8-X31 (H3N2) na presença de soro humano preservado em complemento. Os resultados de um ensaio CDC representativo de três são mostrados na Figura 2. Um controle irrelevante/negativo de hIgG1 também foi usado nesta experiência. H1H14611N2 e H1H14612N2 foram eficazes na mediação da citólise com uma lise máxima de 78,3% e 86,3% e EC_{50} s de 140nM e 126nM, respectivamente.

Exemplo 6: H1H14611N2 e H1H14612N2 matam potencialmente as células que expressam HA do grupo 2 por meio de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (ADCC)

[00220] Os exemplos de anticorpos monoclonais H1H14611N2 e H1H14612N2 foram selecionados para testar sua capacidade de lisar especificamente células decoradas com HA em dois ensaios de citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos.

A. Ensaio de ativação de Fc γ RIIIA

[00221] Um ensaio de ativação de Fc γ RIIIA usando o bioensaio de repórter ADCC-Glo (Promega) com células 3T3 com expressão alta A/Wisconsin/67/200 (H3N2) foi inicialmente usado para testar a capacidade de H1H14611N2 e H1H14612N2 anticorpos para lisar especificamente células decoradas com HA. As células alvo foram combinadas com os mAbs indicados nas concentrações indicadas. As células alvo e efectoras foram então combinadas na proporção E:T de 5:1. Na Figura 3 são mostrados os resultados deste ensaio usando H1H14611N2 (triângulos), H1H14612N2

(triângulos invertidos), juntamente com um hIgG1 (diamantes) irrelevante como controle.

B. Ensaio ADCC usando células mononucleares do sangue periférico de doadores humanos (PBMCs)

[00222] Os dois anticorpos exemplares HA anti-grupo 2, H1H14611N2 e H1H14612N2, foram então testados em um ensaio ADCC usando PBMCs de doadores humanos. As PBMCs foram isoladas a partir de creme leucocitário de doadores humanos e estimuladas com IL-2 (5 ng/mL) por 10 a 12 h antes do uso. As células alvo 3T3 com expressão alta de A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) foram combinadas com os mAbs indicados nas concentrações indicadas. As células alvo e efectoras foram então combinadas na proporção E:T de 30:1. A porcentagem de citotoxicidade foi medida utilizando CytoTox-Glo (Promega). Na Figura 4 são mostrados os resultados deste ensaio usando H1H14611N2 (círculos), H1H14612N2 (triângulos invertidos), juntamente com um hIgG1 irrelevante (diamantes) como controle.

Resultados

[00223] H1H14611N2 e H1H14612N2 exibiram um aumento dependente da dose na capacidade de lisar especificamente células decoradas com HA em ambos os ensaios ADCC.

[00224] H1H14611N2 e H1H14612N2 mostraram um aumento dependente da dose na ativação da FcγRIIIA no bioensaio de repórter ADCC-Glo (Promega) com células 3T3 com expressão A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (Figura 3). O CE₅₀ para H1H14611N2 foi de 0,8714 nM e para H1H14612N2 foi de 0,6882 nM.

[00225] A atividade de ADCC foi confirmada usando citotoxicidade mediada por PBMC direta de células infectadas e superexpressoras. Utilizando PBMCs de doadores humanos, o ADCC mediado por H1H14611N2 e H1H14612N2 nas células 3T3 que expressam previamente A/Wisconsin/67/2005 (H3N2) (Figura 4). O CE₅₀ para H1H14611N2 foi de

0,1463 nM e para H1H14612N2 foi de 0,1762 nM.

[00226] Uma relação efetor/alvo (E:T) de 30:1 foi usada para todas as experiências utilizando PBMCs doadores, embora uma E:T de 5:1 tenha sido usada para o bioensaio repórter.

Exemplo 7: Anticorpos Monoclonais da Hemaglutinina Influenza A Seleccionados do Grupo 2 Tratam Efetivamente a Infecção por Vírus Letal da Influenza *in vivo*

[00227] Existe uma necessidade substancial não atendida de terapias padrão de atendimento aprimoradas para tratamento ou prevenção de infecções pelo vírus influenza em humanos. Atualmente, apenas duas classes de medicamentos estão disponíveis: os adamantanes e os inibidores da neuraminidase (NAIs). Os adamantanes (amantadina e rimantadina) foram associados ao rápido surgimento de cepas resistentes a medicamentos e não são mais recomendados para o tratamento da influenza. NAIs como oseltamivir (TAMIFLU®) são os medicamentos de primeira linha para tratamento e profilaxia da gripe; no entanto, sua janela de eficácia é limitada: Foi demonstrado que os NAIs reduzem a duração dos sintomas da febre e da doença em cerca de um dia no cenário terapêutico se o antiviral for administrado dentro de 48 horas após o início dos sintomas, com poucas evidências clínicas de eficácia se administrado após 48 horas.

[00228] Para avaliar a eficácia *in vivo* de H1H14611N2 e H1H14612N2 no tratamento da influenza grave, foram realizadas experiências com os seguintes objetivos:

[00229] Estudo 1: Avaliar a eficácia de uma dose única de H1H14611N2 e H1H14612N2.

[00230] Estudo 2: Determinar a eficácia de H1H14611N2 administrado em combinação com oseltamivir.

[00231] A cepa utilizada nesses estudos foi um isolado do grupo 2 do vírus influenza A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2) adaptado a camundongos.

Todas as experiências foram realizadas em camundongos fêmeas de 6 semanas de idade, do tipo selvagem (BALB/c). Os camundongos foram desafiados com 5 x MLD₅₀ (10.000 PFUs) de A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2). Nos modelos de tratamento, os camundongos foram desafiados por via intranasal (IN) no dia 0 e doses fixas IV de mAb foram administradas em um dia específico após a infecção (pi). O oseltamivir foi ressuspensão de acordo com as instruções do fabricante e os camundongos foram dosados a cada 12 h (ou seja, duas vezes por dia, BID) por gavagem oral por 5 dias com a primeira dose administrada no dia 4. Os camundongos foram pesados e observados diariamente até o dia 14 pi e foram sacrificados quando perderam 20% do seu peso inicial. Os resultados são relatados como porcentagem de sobrevivência.

[00232] No primeiro experimento, comparamos a eficácia de uma dose única de H1H14611N2 (15 mg/kg; triângulos) ou H1H14612N2 (15 mg/kg; triângulos invertidos) iniciando 24, 48 ou 72 horas após a infecção com 5 X MLD₅₀ de A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2) para avaliar o efeito no modelo murino nesses pontos no tempo. Todos os camundongos que receberam 15 mg/kg de um controle de isotipo 24 horas após a infecção morreram no dia 7 (mostrado na Fig. 5A apenas como uma linha cinza sólida); por outro lado, todos os camundongos que receberam uma dose única (15 mg/kg) de H1H14611N2 ou H1H14612N2 sobreviveram quando administrados em 24 (Fig. 5A), 48 (Fig. 5B) ou mesmo 72 (Fig. 5C) horas após a infecção.

[00233] No segundo experimento, os camundongos receberam uma dose subeficaz única de 7 mg/kg (quadrados, linha pontilhada) ou 15 mg/kg de H1H14611N2 (círculos, linha tracejada), IgG de controle (triângulos), 2 mg/kg de oseltamivir BID por 5 dias (diamantes, linha sólida) ou uma combinação de uma dose única de 7 (quadrados, linha sólida) ou 15 mg/kg H1H14611N2 (círculos, linha sólida) e oseltamivir por 5 dias 96 horas após a infecção com 5 x MLD₅₀ de A/Aichi/02/1968-X31 (H3N2) (ver Figura 6). Doses únicas de H1H14611N2 a 15 mg/kg e 7 mg/kg resultaram em 100% e

80% de sobrevivência, respectivamente, e 80% dos camundongos tratados com 2 mg/kg de oseltamivir sobreviveram. Combinar H1H14611N2 com oseltamivir aumentou a sobrevivência para 100% em ambos H1H14611N2 grupos de doses (15 mg/kg ou 7 mg/kg) demonstrando que a combinação permite doses mais baixas de H1H14611N2 para obter um efeito robusto de tratamento (Figura 6).

[00234] Em resumo, H1H14611N2 e H1H14612N2 exibiram eficácia robusta no tratamento de camundongos infectados com uma cepa histórica da influenza e, além disso, H1H14611N2 mostrou eficácia aditiva quando administrado em combinação com oseltamivir.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo recombinante isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga especificamente à hemaglutinina da influenza A do grupo 2 (HA), caracterizado pelo fato de que o anticorpo compreende duas ou mais das seguintes características:

(a) é um anticorpo monoclonal totalmente humano;

(b) se liga à HA do grupo 2 da influenza A com uma constante de dissociação (K_D) inferior a 10^{-8} M, medida por ressonância plasmônica de superfície;

(c) demonstra meia-vida dissociativa ($t_{1/2}$) maior que 75 minutos;

(d) demonstra neutralização dos vírus da influenza A do grupo 2 selecionados das cepas H3N2 e H7N9 com um IC50 inferior a 200 nM e 500 nM, respectivamente;

(e) demonstra lise mediada por complemento de células infectadas pelo vírus influenza com um EC50 inferior a cerca de 150 nM;

(f) demonstra citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos de células-alvo infectadas por vírus, utilizando um bioensaio repórter com um EC50 inferior a cerca de 0,9 nM;

(g) demonstra citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpo de células-alvo infectadas por vírus na presença de células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) com uma EC50 inferior a cerca de 0,180 nM;

(h) demonstra um aumento na sobrevida em um animal infectado por influenza quando administrado 24, 48, 72 ou 96 horas após o desafio do vírus;

(i) demonstra um aumento na sobrevida em um animal infectado por influenza quando administrado em combinação com oseltamivir 96 horas após a infecção; ou

(j) em que o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno inclui

três regiões determinantes de complementaridade de cadeia pesada (CDRs) (HCDR1, HCDR2 e HCDR3) contidas em uma região variável de cadeia pesada (HCVR) incluindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 2 ou 18; e

três CDRs de cadeia leve (LCDR1, LCDR2 e LCDR3) contidas em uma região variável de cadeia leve (LCVR) incluindo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO: 10 ou 26.

2. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, quando administrado a um mamífero infectado com vírus da influenza como uma dose intravenosa única de cerca de 7 a 15 mg/kg, começando no dia 3 após a infecção, protege o mamífero da referida infecção para um grau maior do que o de um mamífero infectado por vírus da influenza que recebeu a administração oral de oseltamivir administrado duas vezes ao dia por 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg a partir do dia 3 após a infecção e continua até o dia 7 após a infecção.

3. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, quando administrado como uma dose única de cerca de 15 mg/kg em 96 horas após a infecção, a mamíferos infectados com vírus da influenza, os referidos mamíferos têm uma taxa de sobrevivência de cerca de 100%.

4. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que quando administrado como uma dose única de cerca de 15 mg/kg a mamíferos infectados com vírus da influenza, os referidos mamíferos têm uma taxa de sobrevivência de cerca de 100%.

5. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, quando administrado a um mamífero infectado com vírus da influenza, demonstra um efeito protetor aditivo no mamífero

quando administrado com oseltamivir 96 horas após a infecção.

6. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que, quando administrado a um mamífero infectado com vírus da influenza como uma dose intravenosa única variando de cerca de 7 mg/kg a cerca de 15 mg/kg, demonstra um efeito protetor aditivo no mamífero quando administrado em combinação com oseltamivir por via oral duas vezes ao dia por 5 dias a uma dose de cerca de 2 mg/kg.

7. Anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma HCVR com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 e 18.

8. Anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende uma LCVR com uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 10 ou 26.

9. Anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) um domínio HCDR1 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 4 e 20;

(b) um domínio HCDR2 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 6 e 22;

(c) um domínio HCDR3 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 8 e 24;

(d) um domínio LCDR1 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 12 e 28;

(e) um domínio LCDR2 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 14 e 30;

(f) um domínio LCDR3 com uma sequência de aminoácidos selecionada do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 16 e 32.

10. Anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 4,
- (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 6;
- (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 8;
- (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 12;
- (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 14; e
- (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 16.

11. Anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que compreende:

- (a) uma HCDR1 de SEQ ID NO: 20,
- (b) uma HCDR2 de SEQ ID NO: 22;
- (c) uma HCDR3 de SEQ ID NO: 24;
- (d) uma LCDR1 de SEQ ID NO: 28;
- (e) uma LCDR2 de SEQ ID NO: 30; e
- (f) uma LCDR3 de SEQ ID NO: 32.

12. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende um par de sequências de aminoácidos HCVR/LCVR selecionado do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2/10 e 18/26.

13. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que compete pela ligação à HA da influenza com um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende:

as CDRs de uma HCVR incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 e 18; e

as CDRs de uma LCVR incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 10 e 26.

14. Anticorpo isolado ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo que se liga ao mesmo epítopo que um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno, caracterizado pelo fato de que compreende:

as CDRs de uma HCVR incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 2 e 18; e

as CDRs de uma LCVR incluindo uma sequência de aminoácidos selecionada a partir do grupo que consiste nas SEQ ID NOs: 10 e 26.

15. Anticorpo isolado de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo impede a ligação e/ou a entrada do vírus influenza em uma célula hospedeira.

16. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um anticorpo isolado ou seu fragmento de ligação ao antígeno que se liga à HA da influenza de acordo com a reivindicação 1, e um carreador ou diluente farmacêuticamente aceitável.

17. Molécula polinucleotídica isolada, caracterizada pelo fato de que compreende uma sequência polinucleotídica que codifica uma HCVR ou LCVR de um anticorpo de acordo com a reivindicação 1.

18. Vetor, caracterizado pelo fato de que compreende o polinucleotídeo de acordo com a reivindicação 17.

19. Célula, caracterizada pelo fato de que expressa o vetor de acordo com a reivindicação 18.

20. Método para prevenir, tratar ou melhorar pelo menos um sintoma de infecção por influenza em um indivíduo em necessidade, o método, caracterizado pelo fato de que compreende a administração de um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno de acordo com a reivindicação 1, ou uma composição farmacêutica incluindo o referido anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno ao indivíduo em necessidade.

21. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que pelo menos um sintoma é selecionado do grupo que consiste em febre, tosse, dores no corpo, rinorréia, falta de ar, pneumonia e bronquite.

22. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada profilaticamente ao indivíduo em necessidade.

23. Método de acordo com a reivindicação 22, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada profilaticamente a um indivíduo selecionado do grupo que consiste em um indivíduo imunocomprometido, um adulto idoso (mais de 65 anos de idade), um profissional de saúde e uma pessoa com histórico médico de problemas ou uma condição médica subjacente.

24. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada em combinação com um segundo agente terapêutico.

25. Método de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é selecionado do grupo que consiste em um fármaco antiviral, um fármaco anti-inflamatório, um anticorpo diferente que se liga especificamente à HA da influenza do grupo 1 ou do grupo 2, uma vacina para influenza, um suplemento dietético e qualquer outra terapia paliativa para tratar uma infecção por influenza.

26. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é administrado através de uma via de administração diferente como o anticorpo ou seu fragmento de ligação ao antígeno.

27. Método de acordo com a reivindicação 26, caracterizado pelo fato de que o segundo agente terapêutico é administrado por via oral.

28. Método de acordo com a reivindicação 25, caracterizado pelo fato de que o medicamento antiviral é oseltamivir.

29. Método de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o oseltamivir é administrado antes, simultaneamente ou após a administração do anticorpo.

30. Método de acordo com a reivindicação 20, caracterizado pelo fato de que a composição farmacêutica é administrada por via subcutânea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intranasal ou oral.

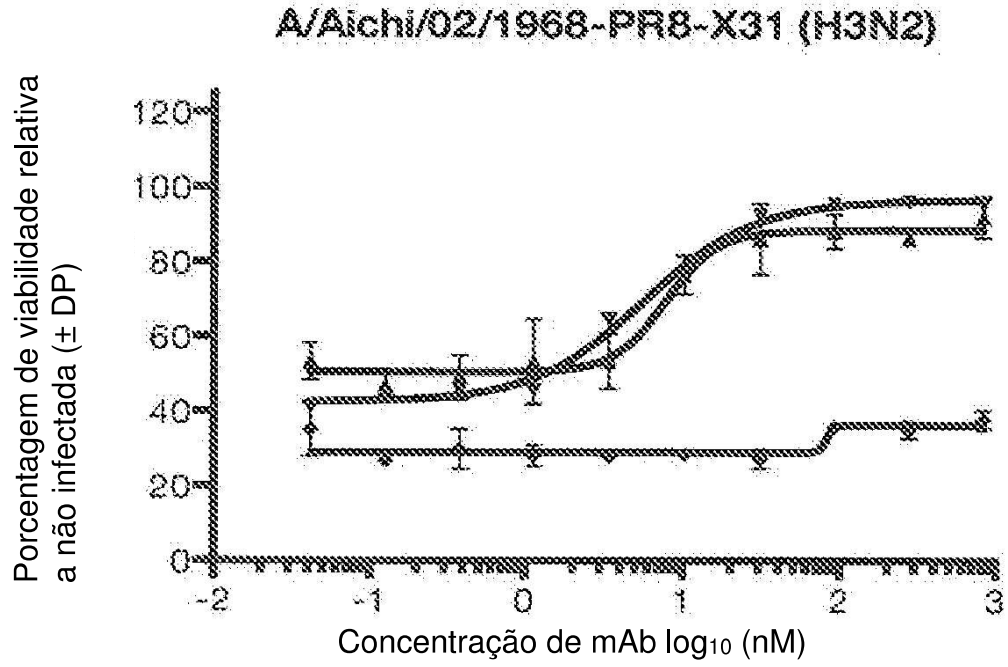


Figura 1A

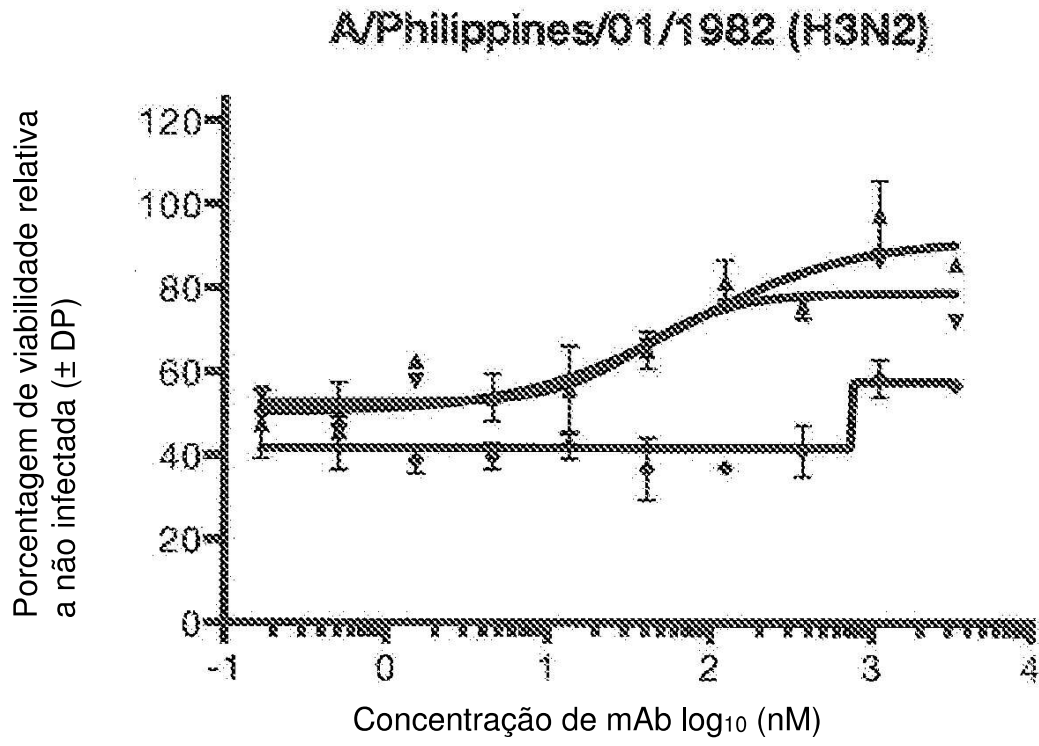


Figura 1B

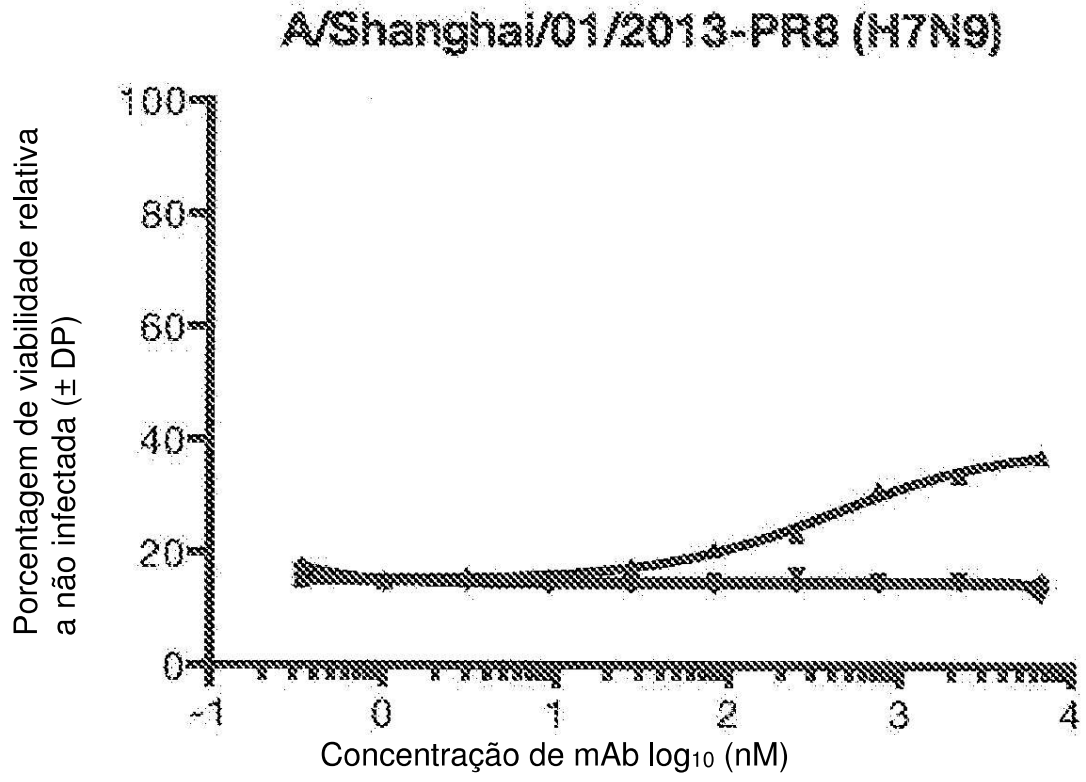


Figura 1C

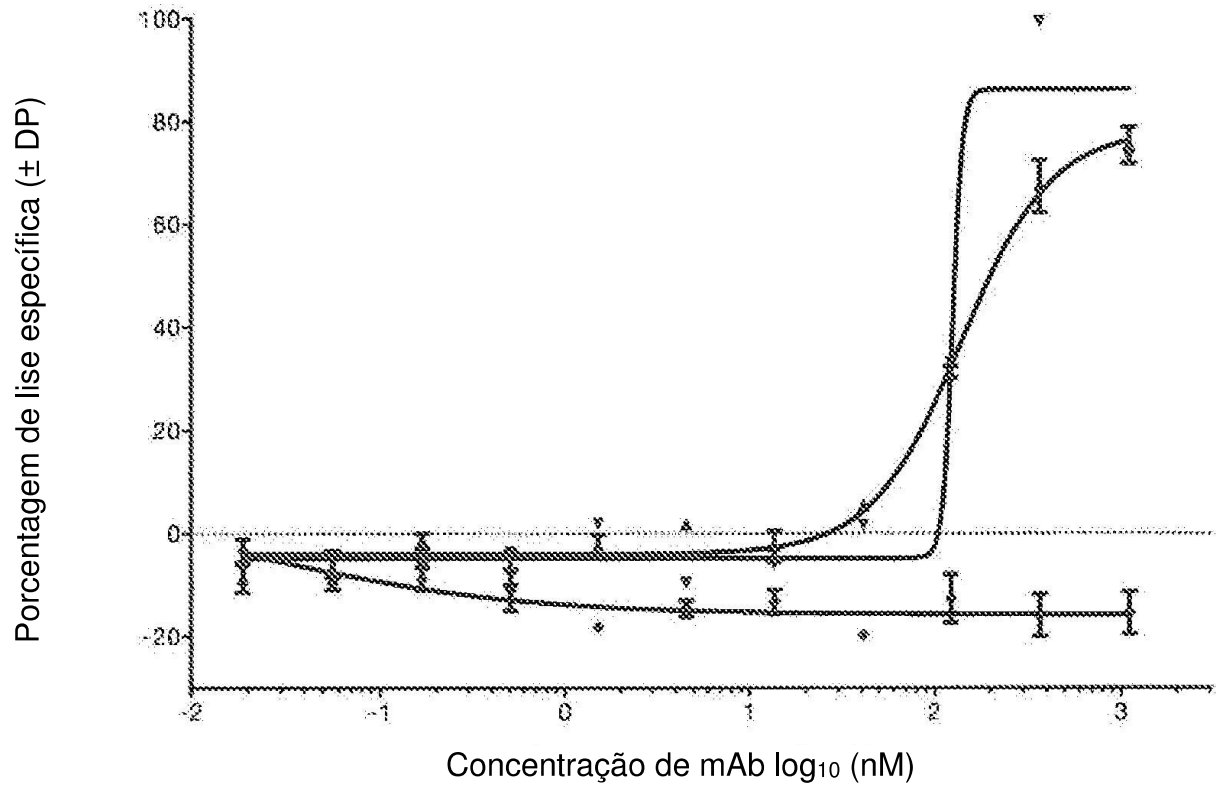


Figura 2

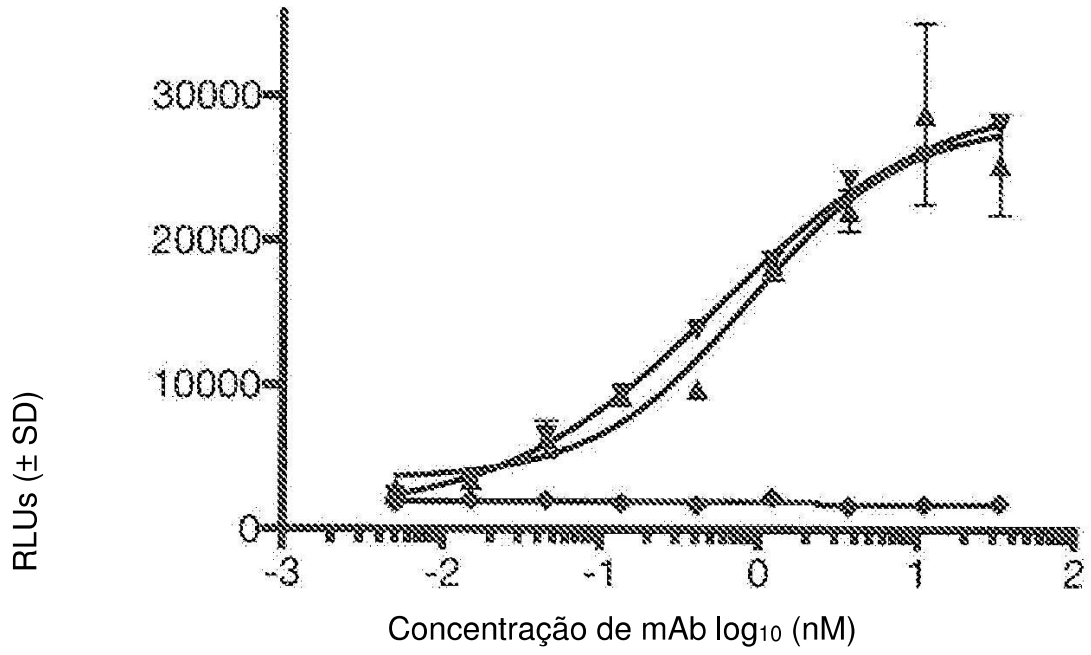


Figura 3

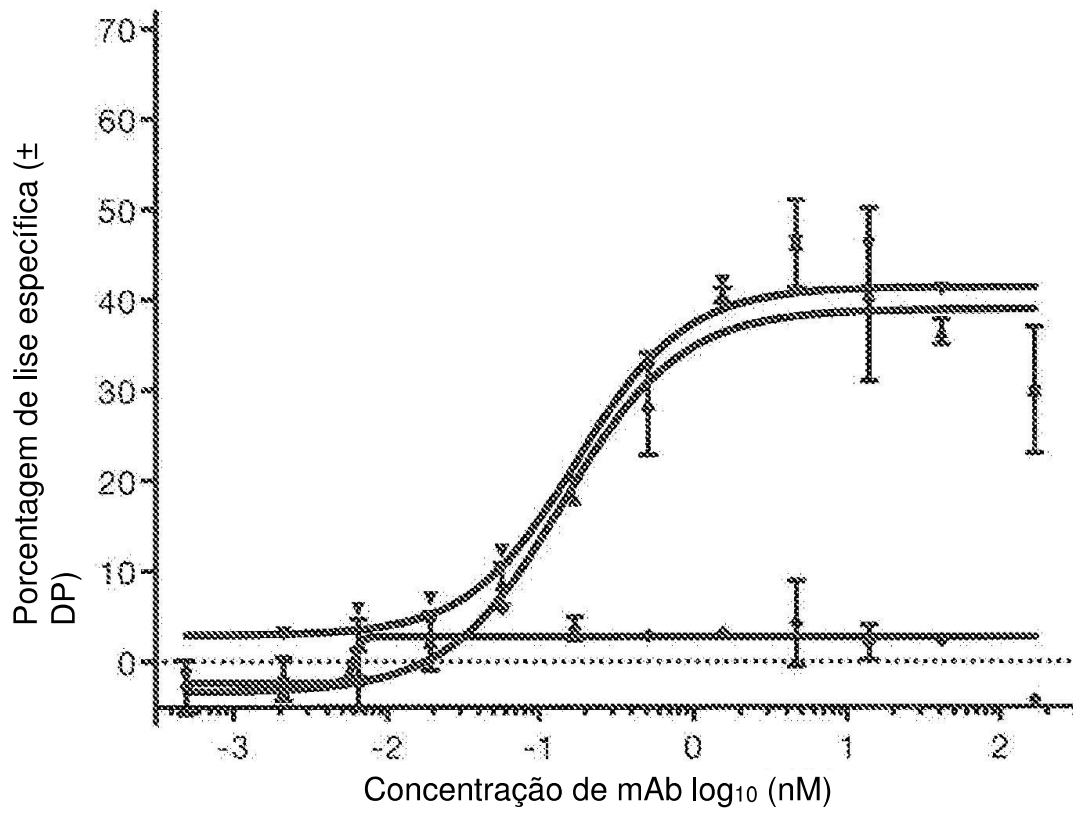


Figura 4

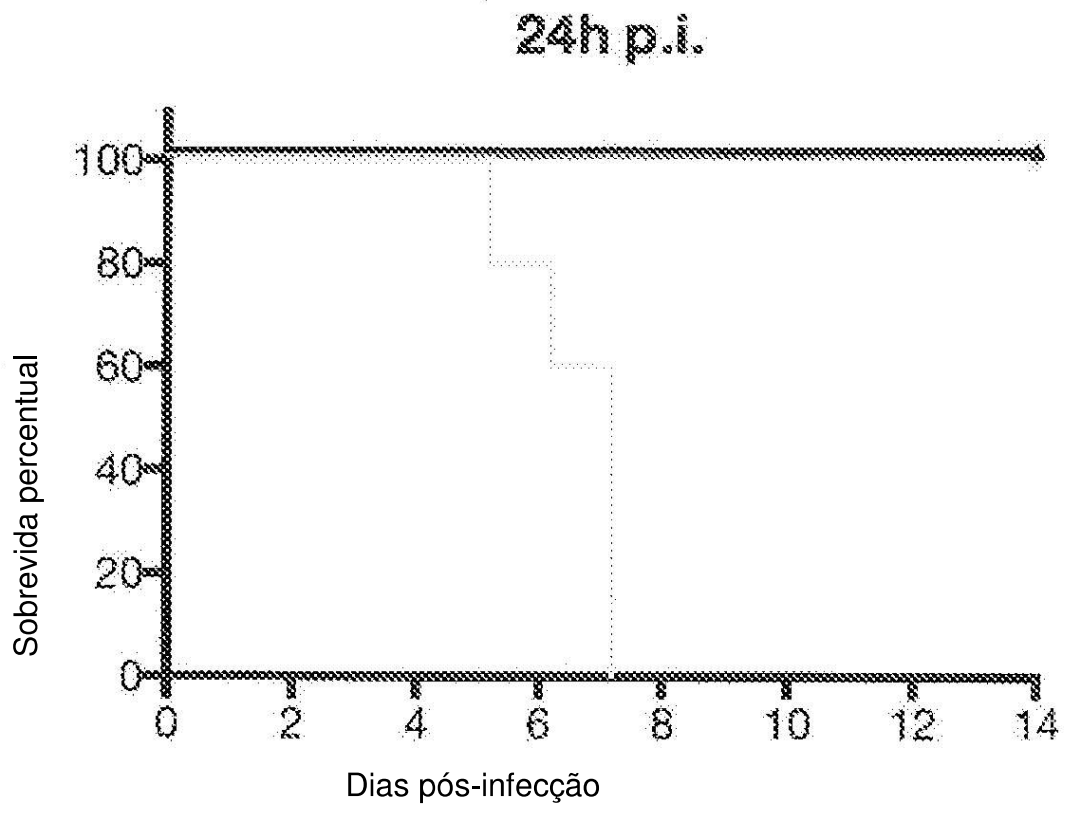


Figura 5A

48 h p.i.

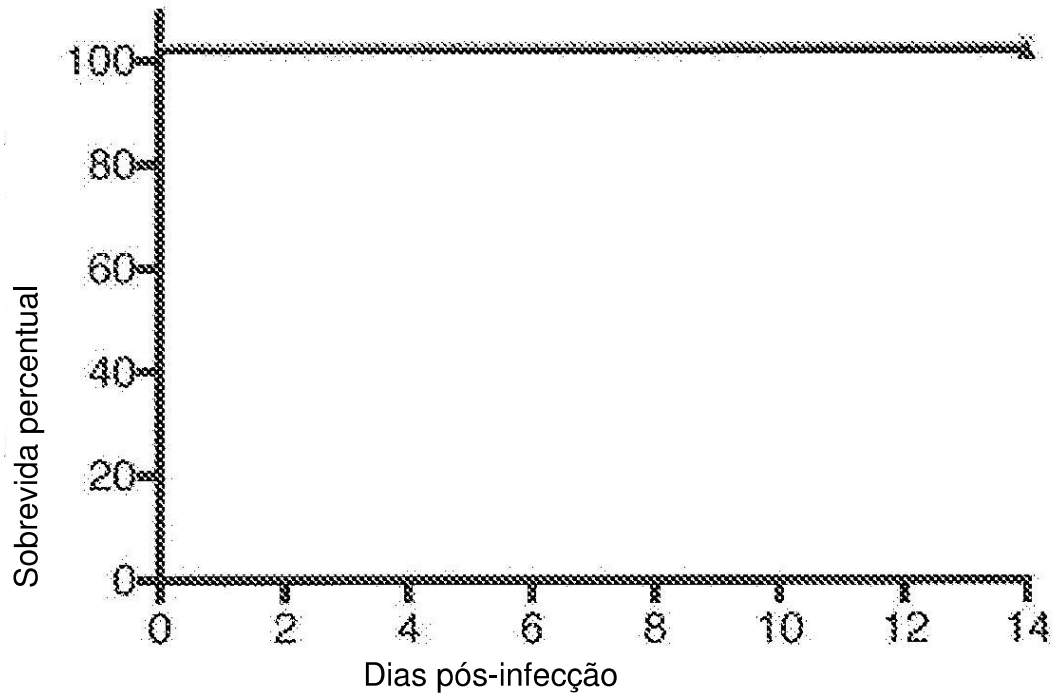


Figura 5B

72 h p.i.

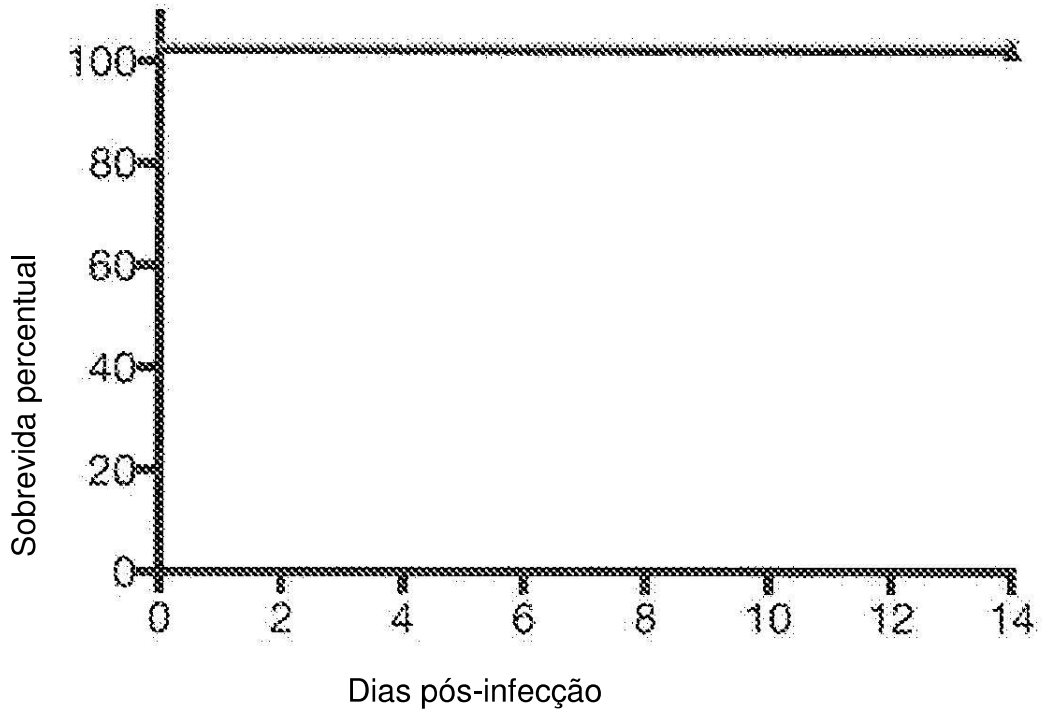


Figura 5C

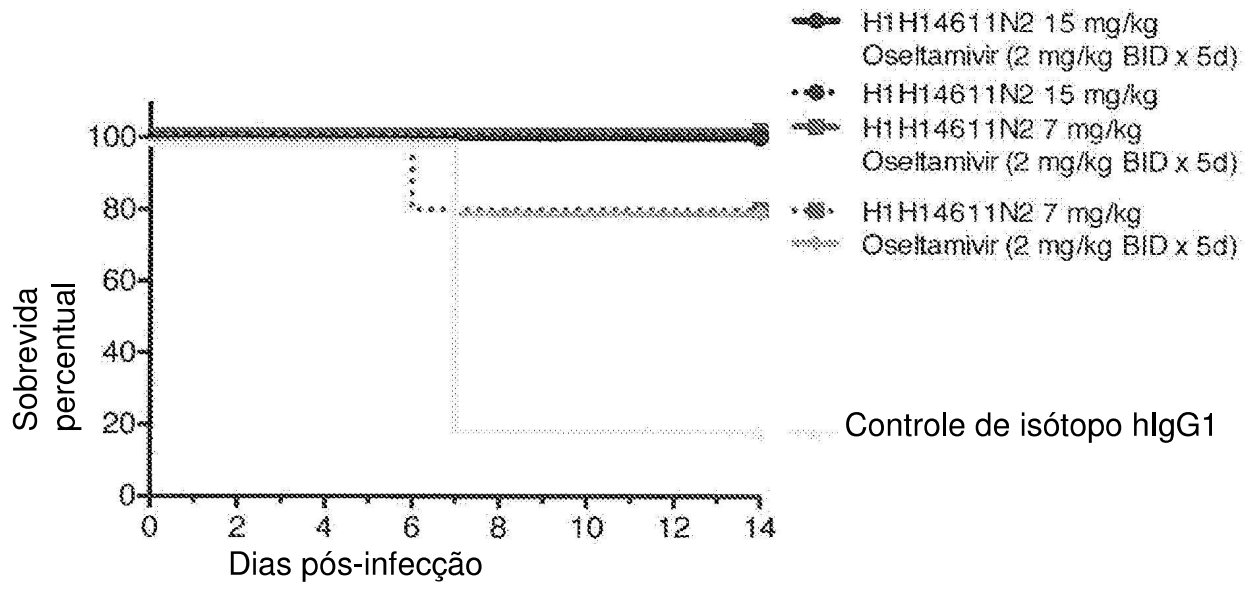


Figura 6

RESUMO

ANTICORPO RECOMBINANTE ISOLADO OU SEU FRAGMENTO DE LIGAÇÃO AO ANTÍGENO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, MOLÉCULA POLINUCLEOTÍDICA ISOLADA, VETOR, CÉLULA, E, MÉTODO PARA PREVENIR, TRATAR OU MELHORAR PELO MENOS UM SINTOMA DE INFECÇÃO POR INFLUENZA

A presente invenção fornece anticorpos monoclonais, ou fragmentos de ligação a antígeno dos mesmos, que se ligam à proteína de hemaglutinina de influenza (HA), composições farmacêuticas que compreendem os anticorpos e métodos de uso. Os anticorpos da invenção são úteis para inibir ou neutralizar a atividade do vírus da influenza, fornecendo assim um meio de tratar ou prevenir a infecção por influenza em seres humanos. Em algumas modalidades, a invenção fornece o uso de um ou mais anticorpos que se ligam à HA da influenza para impedir a ligação viral e/ou a entrada nas células hospedeiras. Os anticorpos da invenção podem ser utilizados profilaticamente ou terapêuticamente e podem ser utilizados sozinhos ou em combinação com um ou mais outros agentes ou vacinas antivirais.

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

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 27244414.txt
- Data de Geração do Código: 21/07/2020
- Hora de Geração do Código: 16:56:29
- Código de Controle:
 - Campo 1: 095034D648BA4853
 - Campo 2: 7C369C8EDB56064F