



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

**(11) BR 112018008840-4 B1**



**(22) Data do Depósito:** 02/11/2016

**(45) Data de Concessão:** 10/11/2020

---

**(54) Título:** ANTICORPO DE DOMÍNIO ÚNICO ANTI-TRANSCRIPTASE REVERSA DE HIV-1, USO DO REFERIDO ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO ISOLADO E MÉTODO PARA MEDIR OS NÍVEIS DO ANTICORPO

**(51) Int.Cl.:** C07K 16/10; A61K 39/42; A61K 39/395; A61K 38/55; G01N 33/68; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 02/11/2015 US 62/249,868.

**(73) Titular(es):** SINGH BIOTECHNOLOGY, LLC.

**(72) Inventor(es):** SUNANDA SINGH.

**(86) Pedido PCT:** PCT US2016060134 de 02/11/2016

**(87) Publicação PCT:** WO 2017/079314 de 11/05/2017

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 30/04/2018

**(57) Resumo:** Esta invenção fornece composições e métodos para tratar uma condição ou doença sem a utilização de sequências de direcionamento exógenas ou composições químicas. A presente invenção refere-se a anticorpos de domínio único (sdAbs), proteínas e polipeptídeos compreendendo os sdAbs que são direcionados contra alvos que causam uma condição ou doença. A invenção também inclui ácidos nucleicos que codificam sdAbs, proteínas e polipeptídeos, e composições compreendendo os sdAbs. A invenção inclui o uso das composições, sdAbs, e ácidos nucleicos que codificam os sdAbs para fins profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos.

**ANTICORPO DE DOMÍNIO ÚNICO ANTI-TRANSCRIPTASE REVERSA DE HIV-1, USO DO REFERIDO ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO ISOLADO E MÉTODO PARA MEDIR OS NÍVEIS DO ANTICORPO**

**REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS**

[001] Este pedido de patente internacional PCT reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório dos Estados Unidos Nº 62/249.868, depositado em 2 de novembro de 2015, cujo conteúdo é aqui incorporado por referência na sua totalidade.

**LISTAGEM DE SEQUÊNCIA**

[002] O presente pedido está sendo depositado junto com uma Listagem de Sequência em formato de texto em vez de uma cópia em papel. A Listagem de Sequências é fornecida como um arquivo intitulado “sequence listing.txt”, criado em 27 de outubro de 2016 e tem 58 kilobytes de tamanho. As informações no formato eletrônico da Listagem de Sequências são aqui incorporadas por referência em sua totalidade.

**ANTECEDENTES**

[003] O uso de anticorpos de domínio-único (sdAbs) como proteínas de ligação ao antígeno únicas ou como um domínio de ligação ao antígeno em proteína ou polipeptídeo maior oferece um número de vantagens significativas sobre o uso de anticorpos convencionais ou fragmentos de anticorpo. As vantagens dos sdAbs incluem: apenas um único domínio é necessário para ligar um antígeno com alta afinidade e alta seletividade; sdAbs podem ser expressos a partir de um único gene e não requerem modificação pós-traducional; sdAbs são altamente estáveis a agentes ou condições desnaturantes, incluindo calor, pH e proteases; sdAbs são

baratos de preparar; e sdAbs podem acessar alvos e epítomos não acessíveis a anticorpos convencionais.

[004] Há um número de doenças ou condições, como infecções virais ou câncer, que são causadas por componentes intracelulares ou transmembrana aberrantes, como nucleotídeos e proteínas. A eliminação dos componentes aberrantes pode ser usada para prevenir ou tratar doenças ou condições. Há um número de compostos farmacológicos disponíveis para o tratamento de tais doenças, porém, os compostos podem ser ineficazes, não entregáveis, ou tóxicos para as células não afetadas.

[005] Outros tratamentos incluem o uso de proteínas ou agentes terapêuticos que contêm uma sequência exógena de direcionamento, de modo que o agente terapêutico possa ser reconhecido por receptores na membrana celular, permitindo que o agente terapêutico atravesse a membrana celular e entre na célula. Quando o agente terapêutico está no interior da célula, o agente terapêutico pode interagir com o componente alvo para tratar a doença. Entretanto, o uso de sequência exógena de direcionamento pode limitar o tipo de célula que é alvo do agente terapêutico, e aumenta o custo de fabricação do agente terapêutico.

[006] Pelas razões anteriores, existe uma necessidade de composições e métodos para tratar ou prevenir uma doença que não dependem de sequências exógenas de direcionamento ou composições químicas a fim de entrar na célula, e que são eficazes em ter como alvo somente as células afetadas no corpo.

[007] A presente invenção refere-se a anticorpos de domínio único (sdAbs), proteínas e polipeptídeos compreendendo os sdAbs. Os sdAbs são direcionados contra alvos que causam uma condição ou doença. A invenção também inclui ácidos nucleicos que codificam sdAbs, proteínas e polipeptídeos, e composições

compreendendo os sdAbs. A invenção inclui o uso das composições, sdAbs, proteínas ou polipeptídeos para fins profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos. A invenção também inclui o uso de anticorpos monoclonais direcionados aos sdAbs da invenção.

## SUMÁRIO

[008] A presente invenção é direcionada a sdAbs usados para tratar ou prevenir uma condição ou doença. Uma modalidade é direcionada a um anticorpo de domínio único (sdAb) anti-transcriptase reversa do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1). Em um aspecto, o sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:27. A invenção também inclui um método de tratamento de uma doença, prevenção de desenvolvimento de uma doença, ou prevenção de recorrência de uma doença em um sujeito usando um sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 pela administração de quantidade eficaz do sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 a um paciente em necessidade do mesmo. O sujeito pode ser um mamífero, tal como um humano. O sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 pode ser administrado em combinação com um ou mais compostos como, por exemplo, um inibidor de protease. A administração de uma quantidade eficaz de sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 a um sujeito em necessidade do mesmo pode ser por administração intravenosa, administração intramuscular, administração oral, administração retal, administração enteral, administração parenteral, administração intraocular, administração subcutânea, administração transdérmica, administrado como colírio, administrado como um spray nasal, administrado por inalação ou nebulização, administração tópica, e administrado como um fármaco implantável.

[009] Em outra modalidade, a invenção é direcionada a um polipeptídeo isolado tendo a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NO:27. Em outra modalidade, a invenção inclui um anticorpo direcionado ao polipeptídeo da SEQ ID NO:27.

[0010] Também é contemplado que a invenção inclui um método para medir os níveis de sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 em uma amostra de um sujeito, o método compreendendo as etapas de: a) gerar de um anticorpo monoclonal de camundongo direcionado contra um ou mais domínios de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:27; b) obter uma amostra do sujeito; c) realizar um imunoensaio quantitativo com o anticorpo monoclonal de camundongo e a amostra para determinar a quantidade de sdAb em um sujeito; e assim medir a quantidade de sdAb no sujeito. Em um aspecto, o imunoensaio quantitativo compreende um ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), ensaio de recaptura e marcação de analito específico (SALRA), cromatografia líquida, espectrometria de massa, separador de células ativadas por fluorescência, ou uma combinação dos mesmos.

[0011] Outra modalidade da invenção é direcionada a um sdAb de VP24 anti-Ebola. Em um aspecto, o sdAb de VP24 anti-Ebola compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:55. A invenção também inclui um método de tratamento de uma doença, prevenção de desenvolvimento de uma doença, ou prevenção de recorrência de uma doença em um sujeito usando um sdAb de VP24 anti-Ebola pela administração de quantidade eficaz do sdAb de VP24 anti-Ebola a um sujeito em necessidade do mesmo. O sujeito pode ser um mamífero, tal como um humano. O sdAb de VP24 anti-Ebola pode ser administrado em combinação com um ou mais compostos como, por exemplo, um inibidor de protease. A

administração de uma quantidade eficaz de sdAb de VP24 anti-Ebola a um sujeito em necessidade do mesmo pode ser por administração intravenosa, administração intramuscular, administração oral, administração retal, administração enteral, administração parenteral, administração intraocular, administração subcutânea, administração transdérmica, administrado como colírio, administrado como um spray nasal, administrado por inalação ou nebulização, administração tópica, e administrado como um fármaco implantável.

[0012] Em outra modalidade, a invenção é direcionada a um polipeptídeo isolado tendo a sequência de aminoácidos mostrada nas SEQ ID NO:55. Em outra modalidade, a invenção inclui um anticorpo direcionado ao polipeptídeo da SEQ ID NO:55.

[0013] Também é contemplado que a invenção inclui um método para medir os níveis de um sdAb de VP24 anti-Ebola em uma amostra de um sujeito, o método compreendendo as etapas de: a) gerar um anticorpo monoclonal de camundongo direcionado contra um ou mais domínios de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:55; b) obter uma amostra do sujeito; c) realizar um imunoensaio quantitativo com o anticorpo monoclonal de camundongo e a amostra para determinar a quantidade de sdAb em um sujeito; e assim medir a quantidade de sdAb no sujeito. Em um aspecto, o imunoensaio quantitativo compreende um ELISA, SALRA, cromatografia líquida, espectrometria de massa, separador de células ativadas por fluorescência, ou uma combinação dos mesmos.

[0014] Ainda outra modalidade da invenção é direcionada a um sdAb anti-araquidonato 12-lipoxigenase (ALOX12). Em um aspecto, o sdAb anti-ALOX12 compreende a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:49, SEQ ID

NO:50, SEQ ID NO:51, ou SEQ ID NO:52. A invenção também inclui um método de tratamento de uma doença, prevenção de desenvolvimento de uma doença, ou prevenção de recorrência de uma doença em um sujeito usando um sdAb anti-ALOX12 pela administração de quantidade eficaz do sdAb anti-ALOX12 a um sujeito em necessidade do mesmo. O sujeito pode ser um mamífero, tal como um humano. O sdAb anti-ALOX12 pode ser administrado em combinação com um ou mais compostos. A administração de uma quantidade eficaz de sdAb anti-ALOX12 a um sujeito em necessidade do mesmo pode ser por administração intravenosa, administração intramuscular, administração oral, administração retal, administração enteral, administração parenteral, administração intraocular, administração subcutânea, administração transdérmica, administrado como colírio, administrado como um spray nasal, administrado por inalação ou nebulização, administração tópica, e administrado como um fármaco implantável.

[0015] Em outra modalidade, a invenção é direcionada a um polipeptídeo isolado tendo a sequência de aminoácidos apresentada na SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, ou SEQ ID NO:52. Em outra modalidade, a invenção inclui um anticorpo direcionado ao polipeptídeo da SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:50, SEQ ID NO:51, ou SEQ ID NO:52.

[0016] Também é contemplado que a invenção inclui um método para medir os níveis de sdAb de transcriptase reversa anti-HIV-1 em uma amostra de um sujeito, o método compreendendo as etapas de: a) gerar de um anticorpo monoclonal de camundongo direcionado contra um ou mais domínios de polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos mostrada na SEQ ID NO:27; b) obter uma amostra do sujeito; c) realizar um imunoensaio quantitativo com o anticorpo monoclonal de camundongo e a amostra para determinar a

quantidade de sdAb em um sujeito; e assim medir a quantidade de sdAb no sujeito. Em um aspecto, o imunoensaio quantitativo compreende um ELISA, SALRA, cromatografia líquida, espectrometria de massa, separador de células ativadas por fluorescência, ou uma combinação dos mesmos.

## DESENHOS

[0017] Estas e outras características, aspectos, e vantagens da presente invenção serão melhor entendidas com relação à descrição a seguir, reivindicações anexas e desenhos anexos onde:

As figuras 1 e 2 representam os resultados de um ELISA usando sdAb de RT de HIV1-9 e anti-HIV-1 (SEQ ID NO: 27);

As figuras 3 e 4 representam os resultados de um ELISA usando uma série de diluições de sdAb de RT de HIV1-9 e anti-HIV-1 (SEQ ID NO: 27);

As figuras 5 a 8 representam os resultados de um ELISA usando sdAb de VP24-5 anti-Ebola VP24 (SEQ ID NO: 55); e

As figuras 9 e 10 representam os resultados de um ELISA usando uma série de diluições de sdAb de VP24-5 anti-Ebola VP24 (SEQ ID NO: 55).

## DESCRIÇÃO

[0018] Como aqui usado, os seguintes termos e suas variações têm os significados indicados abaixo, a menos que um significado diferente é claramente pretendido pelo contexto no qual o termo é utilizado.

[0019] Os termos “um”, “uma” e “o/a” e referências similares usados aqui devem ser construídos como cobrindo ambos o singular e o plural, a menos que o uso no contexto indique o contrário.

[0020] O termo “determinante antigênico” refere-se ao epítopo no antígeno reconhecido pela molécula de ligação ao antígeno (tal como sdAb ou polipeptídeo



da invenção) e mais particularmente pelo sítio de ligação ao antígeno da molécula de ligação ao antígeno. Os termos “determinante antigênico” e “epítopo” podem também ser usados de forma intercambiável. Uma sequência de aminoácido que pode se ligar a, que tenha afinidade por e/ou que tem especificidade para, um determinante antigênico específico, epítopo, antígeno ou proteína é dita ser “contra” ou “direcionada contra” o determinante antigênico, epítopo, antígeno ou proteína.

[0021] Como usado aqui, o termo “compreende” e variações do termo, tais como “compreendendo” ou “compreendem”, não são destinados a excluir outros aditivos, componentes, números inteiros ou etapas.

[0022] É contemplado que o sdAbs, polipeptídeos e proteínas descritos aqui podem conter as chamadas substituições de aminoácidos “conservativas”, que podem geralmente ser descritas como substituições de aminoácidos em que um resíduo de aminoácido é substituído por outro resíduo de aminoácido de estrutura química similar e que tem pouca ou essencialmente nenhuma influência sobre a função, atividade ou outras propriedades biológicas do polipeptídeo. As substituições de aminoácidos conservativas são bem conhecidas na técnica. As substituições conservativas são substituições em que um aminoácido dentro dos seguintes grupos (a)-(e) é substituído por um outro aminoácido dentro do mesmo grupo: (a) resíduos pequenos alifáticos, apolares ou levemente polares: Ala, Ser, Thr, Pro e Gly; (b) resíduos polares, negativamente carregados e suas amidas (não carregadas): Asp, Asn, Glu e Gln; (c) resíduos polares, positivamente carregados: His, Arg e Lys; (d) resíduos grandes alifáticos, apolares: Met, Leu, Ile, Val e Cys; e (e) resíduos aromáticos: Phe, Tyr e Trp. Outras substituições conservativas incluem: Ala por Gly ou por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln ou por His; Asp por Glu; Cys por Ser; Gln

por Asn; Glu por Asp; Gly por Ala ou por Pro; His por Asn ou por Gln; Ile por Leu ou por Val; Leu por Ile ou por Val; Lys por Arg, por Gln ou por Glu; Met por Leu, por Tyr ou por Ile; Phe por Met, por Leu ou por Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp; e/ou Phe por Val, por Ile ou por Leu.

[0023] Um “domínio” como aqui usado geralmente se refere a uma região globular de uma cadeia de anticorpo, e em particular a uma região globular de um anticorpo de cadeia pesada, ou a um polipeptídeo que consiste essencialmente em tal região globular.

[0024] A sequência de aminoácidos e estrutura de um sdAb é tipicamente feita de quatro regiões estruturais ou “FRs,” que são referidas como “Região estrutural 1” ou “FR1”; como “Região estrutural 2” ou “FR2”; como “Região estrutural 3” ou “FR3”; e como “Região estrutural” ou “FR4”, respectivamente. As regiões estruturais são interrompidas por três regiões determinantes de complementaridade ou “CDRs,” que são referidas como “Região Determinante de Complementaridade 1” ou “CDR1”; como “Região Determinante de Complementaridade 2” ou “CDR2”; e como “Região Determinante de Complementaridade 3” ou “CDR3”, respectivamente.

[0025] Como aqui usado, o termo “sdAb humanizado” significa um sdAb teve um ou mais resíduos de aminoácido na sequência de aminoácido da sequência VHH de ocorrência natural substituído por um ou mais dos resíduos de aminoácido que ocorrem na posição correspondente em um domínio VH de um anticorpo de 4 cadeias convencional de um humano. Isto pode ser realizado por métodos que são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, as FRs dos sdAbs podem ser substituídas pela FRs variáveis humanas.

[0026] Como usado aqui, um ácido nucleico ou aminoácido “isolado” tem sido separado de pelo menos um outro componente com o qual ele está usualmente associado, tal como sua fonte ou meio, outro ácido nucleico, outra proteína/polipeptídeo, outro componente biológico ou macromolécula ou contaminante, impureza ou componente pequeno.

[0027] O termo “mamífero” é definido como um sujeito pertencente à classe Mammalia e inclui, sem limitação, humanos, animais domésticos e de fazenda, e animais de zoológico, esportivos, e de estimação, tais como vacas, cavalos, carneiros, cães e gatos.

[0028] Como usado aqui, o “carreador farmacêuticamente aceitável” é destinado a incluir qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos e retardantes de absorção e similares, compatíveis com a administração farmacêutica. Carreadores adequados são descritos na edição mais recente de Remington’s Pharmaceutical Sciences, um texto de referência padrão na área. Exemplos preferidos de tais carreadores ou diluentes incluem, mas não são limitados a, água, solução salina, soluções de Ringer, solução de dextrose, PBS (solução salina tamponada com fosfato), e albumina de soro humano 5%. Lipossomas, lipídios catiônicos e veículos não aquosos, tais como óleos fixos, podem também ser usados. O uso de tais meios e agentes para substâncias farmacêuticamente ativas é bem conhecido na técnica. Exceto quando qualquer meio ou agente convencional é incompatível com um agente terapêutico como definido acima, o seu uso na composição da presente invenção é contemplado.

[0029] Um “imunoensaio quantitativo” refere-se a qualquer meio para medir uma quantidade de antígeno presente em uma amostra usando um anticorpo.

Métodos para realizar ensaios quantitativos incluem, mas não são limitados a, ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), ensaio de recaptura e marcação de analito específico (SALRA), cromatografia líquida, espectrometria de massa, separador de células ativadas por fluorescência, e similares.

[0030] O termo “solução” refere-se a uma composição compreendendo um solvente e um soluto, e inclui verdadeiras soluções e suspensões. Exemplos de soluções incluem um sólido, líquido ou gás dissolvido em um líquido e particulados ou micelas suspensas em um líquido.

[0031] O termo “especificidade” refere-se ao número de diferentes tipos de antígenos ou determinantes antigênicos aos quais uma molécula de ligação ao antígeno particular ou molécula de proteína de ligação ao antígeno pode se ligar. A especificidade de uma proteína de ligação ao antígeno pode ser determinada com base na afinidade e/ou avides. A afinidade, representada pela constante de equilíbrio para a dissociação de um antígeno com uma proteína de ligação ao antígeno (KD), é uma medida para a força de ligação entre um determinante antigênico e um sítio de ligação ao antígeno na proteína de ligação ao antígeno: quanto menor o valor de KD, mais forte é a força de ligação entre um determinante antigênico e a molécula de ligação ao antígeno (alternativamente, a afinidade pode também ser expressa como a constante de afinidade (KA), que é  $1/KD$ ). Conforme ficará claro para aqueles especialistas na técnica, a afinidade pode ser determinada dependendo do antígeno específico de interesse. A avides é a medida da força de ligação entre uma molécula de ligação ao antígeno e o antígeno. A avides está relacionada tanto à afinidade entre um determinante antigênico e seu sítio de ligação ao antígeno na molécula de ligação ao antígeno e o número de sítios de ligação pertinentes presentes na molécula de ligação ao antígeno. A ligação

específica de uma proteína de ligação ao antígeno a um antígeno ou determinante antigênico pode ser determinada por qualquer maneira conhecida, tal como, por exemplo, análise de Scatchard e/ou ensaios de ligação competitiva, tais como radioimunoensaios (RIA), imunoensaios enzimáticos (EIA) e ensaios de competição tipo sanduíche.

[0032] Como aqui utilizado, o termo "recombinante" refere-se ao uso de métodos de engenharia genética (por exemplo, clonagem e amplificação) utilizados para produzir os sdAbs da invenção.

[0033] Um "anticorpo de domínio único", "sdAb" ou "VHH" pode ser geralmente definido como um polipeptídeo ou proteína compreendendo uma sequência de aminoácidos que é composta por quatro regiões estruturais interrompidas por três regiões determinantes de complementaridade. Isto é representado como FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Um sdAb da invenção também inclui um polipeptídeo ou proteína que compreende a sequência de aminoácidos de sdAb. Tipicamente, os sdAbs são produzidos em camelídeos tais como lhamas, mas também podem ser gerados sinteticamente usando técnicas que são bem conhecidas na técnica. Como usado aqui, os domínios variáveis de ocorrência natural presentes em anticorpos de cadeia pesada também serão referidos como “domínios VHH,” para distingui-los dos domínios variáveis de cadeia pesada que estão presentes nos anticorpos convencionais de 4 cadeias, referidos como “domínios VH,” e dos domínios variáveis de cadeia leve que estão presentes nos anticorpos convencionais de 4 cadeias, referidos como “domínios VL.” "VHH" e "sdAb" são usados aqui de forma intercambiável. A numeração dos resíduos de aminoácidos de um polipeptídeo ou sdAb está de acordo com a numeração geral para domínios VH dada por Kabat et al. (“Sequence of proteins of immunological

interest,” US Public Health Services, NIH Bethesda, MD, Publication No. 91). De acordo com esta numeração, FR1 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 1-30, CDR1 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 31-36, FR2 de um sdAb compreende os aminoácidos nas posições 36-49, CDR2 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 50-65, o FR3 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 66-94, o CDR3 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 95-102 e o FR4 de um sdAb compreende os resíduos de aminoácidos nas posições 103-113.

[0034] O termo "sintético" refere-se à produção por síntese química ou enzimática *in vitro*.

[0035] O termo "alvo", como usado aqui, refere-se a qualquer componente, antígeno ou porção que é reconhecido pelo sdAb. O termo "alvo intracelular" refere-se a qualquer componente, antígeno ou porção presente dentro de uma célula. Um “alvo transmembrana” é um componente, antígeno ou porção que está localizado dentro da membrana celular. Um “alvo extracelular” refere-se a um componente, antígeno ou porção que está localizado fora da célula.

[0036] Uma "composição terapêutica", como aqui utilizada, significa uma substância que se destina a ter um efeito terapêutico, tal como composições farmacêuticas, materiais genéticos, biológicos e outras substâncias. Os materiais genéticos incluem substâncias destinadas a terem um efeito terapêutico genético direto ou indireto, tais como vetores genéticos, elementos reguladores genéticos, elementos estruturais genéticos, DNA, RNA e similares. Os biológicos incluem substâncias que são matéria viva ou derivadas de matéria viva destinadas a ter um efeito terapêutico.

[0037] Como aqui utilizado, as frases “quantidade terapeuticamente eficaz” e “quantidade profilaticamente eficaz” referem-se a uma quantidade que provê um benefício terapêutico no tratamento, prevenção ou gestão de uma doença ou um sintoma manifesto da doença. A quantidade terapeuticamente eficaz pode tratar uma doença ou condição, um sintoma de doença ou uma predisposição para uma doença, com a finalidade de curar, cicatrizar, aliviar, amenizar, alterar, remediar, melhorar, aprimorar ou afetar a doença, os sintomas da doença, ou a predisposição para a doença. A quantidade específica que é terapeuticamente eficaz pode ser prontamente determinada por um médico comum, e pode variar dependendo de fatores conhecidos na técnica, tais como, por exemplo, o tipo de doença, o histórico e a idade do paciente, o estágio da doença e a administração de outros agentes terapêuticos.

[0038] A presente invenção refere-se a anticorpos de domínio único (sdAbs) que são direcionados contra componentes virais e intracelulares, bem como a proteínas e polipeptídeos compreendendo os sdAbs e nucleotídeos que codificam as proteínas e polipeptídeos. A invenção pode também referir-se a sdAbs que são direcionados contra alvos ou antígenos intercelulares, transcelulares e extracelulares. A invenção também inclui ácidos nucleicos que codificam sdAbs, proteínas e polipeptídeos, e composições compreendendo os sdAbs. A invenção inclui o uso das composições, sdAbs, proteínas ou polipeptídeos para fins profiláticos, terapêuticos ou diagnósticos.

[0039] Os sdAbs têm um número de características estruturais únicas e propriedades funcionais que tornam os sdAbs altamente vantajosos para uso como domínios ou proteínas funcionais de ligação ao antígeno. Os sdAbs ligam-se funcionalmente a um antígeno na ausência de um domínio variável de cadeia leve

e podem funcionar como uma unidade estrutural, domínio ou proteína funcional relativamente pequena, única de ligação ao antígeno. Isto distingue os sdAbs dos domínios dos anticorpos convencionais, que por si só não funcionam como uma proteína ou domínio de ligação ao antígeno, mas precisam ser combinados com fragmentos de anticorpos convencionais tais como fragmentos de ligação ao antígeno (Fab) ou fragmentos variáveis de cadeia única (ScFv) para se ligarem a um antígeno.

[0040] Os sdAbs podem ser obtidos utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica. Por exemplo, um método para obter sdAbs inclui (a) imunizar um camélídeo com um ou mais antígenos, (b) isolar os linfócitos periféricos do camélídeo imunizado, obter o RNA total e sintetizar os correspondentes DNAs complementares (cDNAs), (c) construir uma biblioteca de fragmentos de cDNA que codificam os domínios VHH, (d) transcrever os cDNAs que codificam os domínios VHH obtido na etapa (c) para RNA mensageiro (mRNA) utilizando PCR, converter o mRNA no formato de exibição de ribossoma e selecionar o domínio VHH por exibição de ribossoma e (e) expressar o domínio VHH em um vetor adequado e, opcionalmente, purificar o domínio VHH expresso.

[0041] Outro método de obtenção dos sdAbs da invenção consiste em preparar um ácido nucleico que codifica um sdAb utilizando técnicas para a síntese de ácidos nucleicos, seguido da expressão do ácido nucleico *in vivo* ou *in vitro*. Adicionalmente, o sdAb, polipeptídeos e proteínas da invenção podem ser preparados utilizando técnicas sintéticas ou semissintéticas para preparar proteínas, polipeptídeos ou outras sequências de aminoácidos.

[0042] Os sdAbs da invenção geralmente se ligarão a todos os análogos, variantes, mutantes, alelos, partes e fragmentos de ocorrência natural ou sintéticos



do alvo, ou pelo menos aos análogos, variantes, mutantes, alelos, partes e fragmentos do alvo que contenham um ou mais determinantes antigênicos ou epítomos que são essencialmente os mesmos que o determinante antigênico ou epítomo ao qual os sdAbs da invenção se ligam no alvo de tipo selvagem. Os sdAbs da invenção podem ligar-se a tais análogos, variantes, mutantes, alelos, partes e fragmentos com uma afinidade e/ou especificidade que é a mesma que, ou maior ou menor do que, a afinidade e especificidade com que os sdAbs da invenção se ligam ao alvo de tipo selvagem. Está também contemplado no escopo da invenção que os sdAbs da invenção se ligam a alguns análogos, variantes, mutantes, alelos, partes e fragmentos do alvo mas não a outros. Além disso, o sdAb da invenção pode ser humanizado e pode ser monovalente ou multivalente e/ou multiespecífico. Adicionalmente, os sdAbs da invenção podem se ligar à forma fosforilada da proteína alvo bem como à forma não fosforilada da proteína alvo. Os sdAbs podem ser ligados a outras moléculas, como a albumina ou outras macromoléculas.

[0043] Além disso, está dentro do escopo da invenção que os sdAbs são multivalentes, isto é, o sdAb pode ter duas ou mais proteínas ou polipeptídeos que são direcionadas contra dois ou mais epítomos diferentes do alvo. Tal sdAb multivalente, a proteína ou polipeptídeo pode ser direcionado, por exemplo, contra os mesmos epítomos, epítomos substancialmente equivalentes ou diferentes epítomos. Os diferentes epítomos podem estar localizados no mesmo alvo ou podem estar em dois ou mais alvos diferentes.

[0044] É também contemplado que a sequência de um ou mais sdAbs da invenção pode ser conectada ou unida a uma ou mais sequências ligantes. O ligante

pode ser, por exemplo, uma sequência de proteína contendo uma combinação de serinas, glicinas e alaninas.

[0045] Está também no escopo da invenção a utilização de partes, fragmentos, análogos, mutantes, variantes, alelos e/ou derivados dos sdAbs da invenção, desde que estes sejam adequados para as utilizações descritas.

[0046] Uma vez que os sdAbs da invenção são principalmente destinados ao uso terapêutico e/ou diagnóstico, eles são direcionados contra alvos mamíferos, preferivelmente humanos. Contudo, é possível que os sdAbs aqui descritos tenham reatividade cruzada com alvos de outras espécies, por exemplo, com alvos de uma ou mais outras espécies de primatas ou outros animais (por exemplo, camundongo, rato, coelho, porco ou cão) e, em particular, em modelos de animais para doenças e distúrbios associados à doença associada com os alvos.

[0047] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um ácido nucleico que codifica um sdAb da invenção. Tal ácido nucleico pode estar, por exemplo, na forma de um construto genético.

[0048] Em outro aspecto, a invenção refere-se a um hospedeiro ou uma célula hospedeira que expressa ou é capaz de expressar um sdAb da invenção e/ou que contém um ácido nucleico que codifica um sdAb da invenção. As sequências dos sdAbs podem ser usadas para inserir no genoma de qualquer organismo para criar um organismo geneticamente modificado (OGM). Os exemplos incluem, mas não estão limitados a, plantas, bactérias, vírus e animais.

[0049] A invenção refere-se adicionalmente a métodos para preparar ou gerar os sdAbs, ácidos nucleicos que codificam os sdAbs, células hospedeiras que expressam ou são capazes de expressar tais sdAbs, produtos e composições contendo os sdAbs da invenção.

[0050] A invenção refere-se adicionalmente a aplicações e utilizações dos sdAbs, dos ácidos nucleicos que codificam os sdAbs, células hospedeiras, produtos e composições aqui descritos. Tal produto ou composição pode, por exemplo, ser uma composição farmacêutica para tratamento ou prevenção de uma doença, ou um produto ou composição para uso em diagnóstico. Os sdAbs podem ser utilizados em uma variedade de ensaios, por exemplo, ensaios ELISA e ensaios de espectrometria de massa para medir os níveis séricos e teciduais dos sdAbs.

[0051] Em outro aspecto, um ácido nucleico que codifica um ou mais sdAbs da invenção pode ser inserido no genoma de um organismo para tratar ou prevenir doenças.

[0052] A presente invenção refere-se geralmente a sdAbs, bem como a proteínas ou polipeptídeos compreendendo ou consistindo essencialmente em um ou mais desses sdAbs, que podem ser utilizados para fins profiláticos, terapêuticos e/ou de diagnóstico.

[0053] Os métodos e composições detalhados na presente invenção podem ser utilizados para tratar doenças aqui descritas e podem ser utilizados com qualquer dosagem e/ou formulação aqui descrita ou de outro modo conhecida, bem como com qualquer via de administração aqui descrita ou de outro modo conhecida por um especialista na técnica.

[0054] Os sdAbs da invenção podem ser utilizados para o tratamento e prevenção de doenças causadas por vírus ou por proteínas celulares aberrantes. Os sdAbs da presente invenção também podem ser usados para tratamento e prevenção de doenças. Os sdAbs da invenção podem ser usados para terem como alvo doenças quando há uma superexpressão de uma molécula intracelular. Eles também podem ser usados para tratar infecções virais, tendo como alvo proteínas

virais intracelulares em células infectadas. O bloqueio da produção de proteínas virais, como, por exemplo, a transcriptase reversa de HIV-1, pode bloquear o ciclo de vida viral.

[0055] Os sdAbs da invenção também podem ter como alvo proteínas virais intracelulares, tais como o VP24 de Ebola e, assim, bloquear a capacidade do Ebola de desativar a resposta imune antiviral do hospedeiro.

[0056] Os sdAbs da invenção podem ser usados com um ou mais compostos. Por exemplo, o sdAb da invenção pode ser utilizado com inibidores de JAK/STAT tais como, por exemplo, Curcumina, Resveratrol, Cucurbitacina A, B, E, I, Q, Flavopiridol, Deoxitetrangomicina, derivados de Ciclopentenona, N-acilhomoserina lactona, derivados de Indirrubina, Meisoindigo, Tirfostinas, compostos contendo Platina (por exemplo, IS3-295), peptideomiméticos, oligonucleotídeos antissentido, S3I-201, derivados tripeptídicos da fosfotirosina, inibidores da protease do HIV (por exemplo, nelfinavir, indinavir, saquinavir e ritonavir), JSI-124, XpYL, Ac-pYLPQTV-NH<sub>2</sub>, ISS 610, CJ-1383, pirimetamina, Metformina, Atiprimode, S3I-M2001, STX-0119; Derivado N-[2-(1,3,4-oxadiazolil)]-4-quinolinacarboxamida, S3I-1757, LY5; 5,8-dioxo-6(piridin-3-ilamino)-5,8-di-hidro-naftaleno-1-sulfonamida withacinstin, Stattic, STA-21, LLL-3, LLL12, XZH-5, SF-1066, SF-1087, 17o, Criptotanshinona, FLL32, FLL62, C188-9, BP-1108 e BP-1075, Galiellalactona, JQ1, 5, 15 DPP, WP1066, Niclosamida, SD1008, Nifuroxazida, Criptotanshinona, quinona de BBI e Fosfato de Ruxolitnibe. O um ou mais compostos podem aumentar a resposta terapêutica e aumentar a eficácia dos sdAbs da invenção. Além disso, a eficácia dos sdAbs pode ser aumentada combinando-os com peptídeos, peptideomiméticos e outros fármacos, tais como, por exemplo, mas não limitados a, cimetidina, atorvastatina, celecoxibe, metformina e cimetidina.

[0057] É também contemplado que um ou mais sdAbs da invenção podem ser combinados, ou os sdAbs da invenção podem ser combinados com outros sdAbs.

[0058] É contemplado que certos sdAbs da invenção podem atravessar a membrana celular e entrar na célula sem o auxílio de sequências de proteínas de direcionamento adicionais no sdAb e sem o auxílio de compostos exógenos que direcionam o sdAb para se ligar aos receptores da superfície celular e atravessar a membrana celular.

[0059] Depois de atravessar a membrana celular, estes sdAbs podem ter como alvo moléculas ou antígenos transmembrana ou intracelulares. Estes alvos podem ser, por exemplo, proteínas, carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos, proteínas mutadas, proteínas virais e príons. Os alvos de sdAb podem funcionar como enzimas, proteínas estruturais da célula, porções intracelulares de moléculas de membrana celular, moléculas dentro das membranas de organelas, qualquer tipo de molécula de RNA, quaisquer regiões de DNA ou cromossomo, ácidos nucleicos metilados ou não metilados, moléculas parcialmente montadas dentro do mecanismo de síntese da célula, moléculas do segundo mensageiro e moléculas dentro dos mecanismos de sinalização celular. Os alvos podem incluir todas as moléculas no citoplasma, núcleo, organelas e membrana celular. Moléculas destinadas à secreção ou colocação na membrana celular podem se tornar alvos dentro do citoplasma antes de sair da célula.

[0060] Os alvos de sdAb podem estar em humanos, animais, plantas, fungos, parasitas, protistas, bactérias, vírus, príons, células procarióticas e células eucarióticas. Alguns exemplos de moléculas de sinalização intercelular e intracelular e grupos de proteína que podem ser alvos pelos sdAbs da invenção são: produtos oncogênicos, hormônios, citocinas, fatores de crescimento,

neurotransmissores, quinases (incluindo tirosina quinase, serina quinase e treonina quinase), fosfatases, ubiquitina, nucleotídeos cíclicos, ciclases (adenilil e guanilil), proteínas G, fosfodiesterases, superfamília GTPase, imunoglobulinas (anticorpos, fragmentos Fab, ligantes, sdAbs), superfamília de imunoglobulinas, lipídios de inositol fosfato, receptores de esteroides, calmodulina, grupo CD (por exemplo CD4, CD8, CD28, etc.), fatores de transcrição, TGF-beta, TNF-alfa e beta, superfamília do ligante TNF, moléculas sinalizadoras do receptor notch, moléculas sinalizadoras do receptor hedgehog, moléculas sinalizadoras do receptor Wnt, moléculas sinalizadoras receptor tipo toll, caspases, actina, miosina, miostatina, 12-lipoxigenase, 15-lipoxigenase, superfamília de lipoxigenase, transcriptase reversa, vírus e suas proteínas, proteínas amiloides, colágeno, receptores acoplados à proteína G, proteínas normais mutadas, príons, Ras, Raf, Myc, Src, BCR/ABL, MEK, Erk, Mos, Tpl2, MLK3, TAK, DLK, MKK, p38, MAPK, MEKK, ASK, SAPK, JNK, BMK, MAP, JAK, PI3K, ciclo-oxigenase, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5a, STAT5b, STAT6, Myc, p53, BRAF, NRAS, KRAS, HRAS e quimiocinas.

[0061] O HIV é um retrovírus que causa a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) em humanos. A AIDS resulta em falha progressiva do sistema imunológico do indivíduo infectado, o que resulta no desenvolvimento de infecções oportunistas potencialmente fatais e cânceres. O tempo médio de sobrevivência após a infecção pelo HIV é estimado em 9 a 11 anos sem tratamento.

[0062] O HIV é transmitido como um vírus de RNA envelopado de fita única e sentido positivo. Após entrada na célula alvo, o genoma de RNA viral é transcrito inversamente em DNA de fita dupla por uma transcriptase reversa (RT) codificada por vírus que é transportada juntamente com o genoma viral na partícula viral. RT é uma DNA polimerase dependente de RNA e também tem atividade de RNaseH. O

DNA viral resultante é então importado para o núcleo da célula hospedeira e integrado ao DNA celular por uma integrase codificada viralmente e cofatores do hospedeiro. Uma vez integrado, o vírus pode ficar latente por meses ou anos. Alternativamente, o vírus pode ser transcrito, produzindo novos genomas de RNA e proteínas virais que são empacotadas e liberadas a partir da célula como novas partículas de vírus.

[0063] Dois tipos de HIV foram caracterizados: HIV-1 e HIV-2. O HIV-1 é mais virulento, mais infeccioso e é a causa da maioria das infecções por HIV em todo o mundo. O HIV-2 está em grande parte restrito à África Ocidental.

[0064] Foram desenvolvidos sdAbs de RT anti-HIV para terem como alvo a transcriptase reversa do HIV-1. O sdAb anti-RT de HIV-1 pode tratar com sucesso sujeitos infectados com HIV isoladamente ou em combinação com outros agentes retrovirais. Utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica, utilizou-se a proteína de transcriptase reversa do HIV-1 recombinante (Creative Biomart, Shirley, NY) (SEQ ID NO:1) para gerar sdAbs que são direcionados contra ou podem ligar-se a um epítipo de RT do HIV-1.

[0065] A sequência de proteína utilizada para a imunização de um camelo da proteína de transcriptase reversa do HIV-1 recombinante (SEQ ID NO:1) foi

PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLT

EEKIKALVEICAELEEEGKISRIGPENPYNTPVFAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQ

LGIPHPAGLKKKKSVTVLVDVGDAYFSIPLDEDFRKYTAFTIPSTNNETPGTRYQYNVLPQGWK

GSPAIFQSSMTKILEPFRKQNPDIVIYQYVDDLYVGSdleIGQHRtkVEELRQHLWRWGFYTP

DKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQK

[0066] Como resultado da imunização, vários sdAbs foram obtidos e rastreados. As sequências de DNA dos sdAbs RT anti-HIV-1 estão listadas abaixo:

[0067] HIV1-1 (SEQ ID NO:2): 5'-

gatgtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcaggctggagggtc  
tctgagactctcctgtgcagcctctgtttacagctacaacacaaactgcatgggttggtccgccaggctccaggga  
ggagcgcgaggggggtcgcagttatttatgctgctggtggattaacatactatgccgactccgtgaagggccgattcac  
catctcccaggagaatggcaagaatacgggtgtacctgacgatgaaccgcctgaaacctgaggacactgcatgtact  
actgtgcggcaaagcgatggtgtagtagctggaatcgcggtgaggagtataactactggggccaggggacccaggt  
caccgtctcctca-3'

[0068] HIV1-2 (SEQ ID NO:3): 5'

cagggtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcaggctggaga  
ctctctgagactctcctgtgcagcctctggaaacactgccagtaggttctccatgggctggtccgccaggctccaggg  
aaggagcgcgaggggggtcgcggctatttctgctggtggtaggcttacatactatgccgactccgtgaagggccgattc  
accatctcccagacaacgccaagaacacgctgtatctggacatgaacaacctgaaacctgaggacactgcatgt  
actactgtgccgcaattagtaccggatgactggtattcaggctcttgcggctctaccagacttcgccagaagact  
acggtaactggggccaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0069] HIV1-7 (SEQ ID NO:4): 5'-

gagggtgcagctggtggagctctgggggagactcgggtgcaggctgga  
gggtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtcc  
gccagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgtactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccg  
tgaagggccgattcaccatctccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctga  
ggacactgcatgtactactgtgcgtgtgcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctc  
tgactataactactggggtgaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0070] HIV1-8 (SEQ ID NO:5): 5'-

cagggtgcagctggtggagctctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgtactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg



aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggccaggggacccaggtcaccgtctcctca-3'

[0071] HIV1-6 (SEQ ID NO:6): 5'-

caggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 caatatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggccaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0072] HIV1\_28 (SEQ ID NO:7): 5'-

aggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggccaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0073] HIV1-21 (SEQ ID NO: 8): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactgggggtgaggggacccaggtcaccgtctcctca-3'

[0074] HIV1-37 (SEQ ID NO: 9): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgagggggctgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacgggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
acactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcgcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
actataactactggggtgaggggagccaggtcaccgtctcctca-3'

[0075] HIV1-3 (SEQ ID NO: 10): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgagggggctgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacgggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
acactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcgcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
actataactactggggtgaggggagccaggtcactgtctcctca-3'

[0076] HIV1-5 (SEQ ID NO: 11): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaggcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgagggggctgctaccattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgctaagaacacgggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
acactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcgcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
actataactactggggtgaggggagccaggtcaccgtctcctca -3'

[0077] HIV1-10 (SEQ ID NO: 12): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgagggggctgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg

aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcagcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggtgaggggacccaggtcaccgtctcctca-3'

[0078] HIV1\_29 (SEQ ID NO: 13): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcagtgaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgagggggtcgctactattaatattcgaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggtgaggggacccaggtcaccgtctcctca -3'

[0079] HIV1\_32 (SEQ ID NO: 14): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgagggggtcgctactattaatattcgaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggtgaggggacccaggtcaccgtctcctca-3'

[0080] HIV1-9 (SEQ ID NO: 15): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggaggctcgggtcaggctggagg  
 gtctctgagactctcctgtgcagcctctgtttacagctacaacacaaactgcatgggttggtccgccaggctccaggg  
 aaggagcgcgaggggggtcgagttatttatgctgctggtggattaacatactatgccgactccgtgaagggccgattc  
 accatctcccaggagaatggcaagaacacggtgtacctgacgatgaaccgcctgaaacctgaggacactgccatgt  
 actactgtgcggcaaagcgatggtgtagtagctggaatcgcggtgaggagtataactactggggccaggggaccca  
 ggtcactgtctcctca-3'

[0081] HIV1-16 (SEQ ID NO: 16): 5'-

caggtgcagctggtggagctctgggggaggctcgggtgcaggctggagg  
gtctctgagactctcctgtgcagcctctggaaacacctacagtagtagctactgcatgggctggttccgccaggctcca  
gggaaggaccgcgaggggggtcgcgctatcttactcgaagtgggtaccacatactatgccgactccgtgaagggccg  
attcaccatttcccgtgacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaataaacagcctgaaacctgaagacgctgcca  
tgtactactgtgcggcagcccaggggggtgcctgcatttcgtttacttcgttcggaagaatttcgtgtaccggggcca  
ggggaccctgggtcactgtctcctca-3'

[0082] HIV1-13 (SEQ ID NO: 17): 5'-

gaggtgcagctggtggagctctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggttccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaataaacgccctgaaacctgagg  
acactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacgggtcctctg  
actataactactgggggtgaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0083] HIV1\_35 (SEQ ID NO: 18): 5'-

gaggtgcagctggtggagctctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggttccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaataaacgccctgaaacctgagg  
acactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacgggtcctctg  
actataactactgggggtgaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0084] HIV1-11 (SEQ ID NO: 19): 5'-

caggtgcagctggtggagctctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggttccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgaggggggtcgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg

aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggtgaggggacccaggtcactgtctcctca-3'

[0085] HIV1\_22 (SEQ ID NO: 20): 5'-

caggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgagggggtcgctactattaatattcgaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggtgaggggacccaggtcaccgtctcctca-3'

[0086] HIV1-4 (SEQ ID NO: 21): 5'-

catgtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgagggggtcgctactattaatattcgaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actataactactggggtgaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0087] HIV1\_38 (SEQ ID NO: 22): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
 gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggtccgc  
 cagtatccaggaaaggagcgcgagggggtcgctactattaatattcgaatagtgtcacatactatgccaactccgtg  
 aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
 aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcggcgcaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
 actatgactactggggtgaggggaccctgggtcaccgtctcctca-3'

[0088] HIV1\_23 (SEQ ID NO: 23): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctatgggctggttccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgagggggctgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacgggtgtatctgcaaatggacgccctgaaacctgagg  
aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcgcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
actataactactggggtgaggggagccaggtcaccgtctcctca-3'

[0089] HIV1\_25 (SEQ ID NO: 24): 5'-

gaggtgcagctggtggagtctgggggagactcgggtgcaggctggagg  
gtctcttcaactctcctgtaaagcctctggatacacctacaatagtagagtcgatatcagatctgtgggctggttccgc  
cagtatccaggaaaggagcgcgagggggctgctactattaatattcgtaatagtgtcacatactatgccgactccgtg  
aagggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacgggtgtatctgcaaatgaacgccctgaaacctgagg  
aactgccatgtactactgtgcgttgtcagacagattcgcgcgaggtacctgccaggtacggaatacggccctctg  
actataactactggggtgaggggagccaggtcaccgtctcctca-3'

[0090] As sequências de aminoácidos dos sdAbs anti-RT de HIV-1 estão mostradas abaixo:

[0091] HIV1-1 (SEQ ID NO: 25): DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASVYSYNTNC  
MGWFRQAPGKEREGVAVIYAAGGLTYADSVKGRFTISQENGKNTVYLTMNRLKPEDTAM  
YYCAAKRWCSSWNRGEEYNYWGQGTQVTSS

[0092] HIV1-2 (SEQ ID NO:26): QVQLVESGGGSVQAGDSLRLSCAASGNTASRFSM  
GWFRQAPGKEREGVAAISAGGRLTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLDMNNLKPEDTAMYY  
CAAISDRMTGIQALAALPRLRPEDYGNWGQGTQVTSS

[0093] HIV1-9 (SEQ ID NO:27): EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASVYSYNTNCM  
GWFRQAPGKEREGVAVIYAAGGLTYADSVKGRFTISQENGKNTVYLTMNRLKPEDTAMYY  
CAAKRWCSSWNRGEEYNYWGQGTQVTSS

[0094] HIV1-16 (SEQ ID NO: 28): QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGNTYSSSY  
CMGWFRQAPGKDREGVARIFTRSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLKPEDAA  
MYYCAAQGGACISFTSFAKNFVYRGQGTLTVSS

[0095] HIV1-27 (SEQ ID NO: 29):  
EVQLGESGGGSVQAGGSLRLSCAASVYSYTTNCM  
GWFRQAPGKEREGVAVIYSAGGLTYADSVKGRFTISQDNGKNTVYLTMNRLKPEDTAMYY  
CAAKRWCSWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

[0096] HIV1-30 (SEQ ID NO: 30): QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASVYSYNTN  
CMGWFRQAPGKEREGAAVIYAAGGLTYADSVKGRFTISQENGKNTVYLTMNRLKPEDTA  
MYYCAAKRWCSWNRGEEYNYWGQGTQVTVSS

[0097] HIV1-21 (SEQ ID NO: 31): EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSR  
VDIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNKNTVYLQMNALKPE  
DTAMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWGEGTQVTVSS

[0098] HIV1-4 (SEQ ID NO: 32): HVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSR  
VDIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNKNTVYLQMNALKPE  
DTAMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWGEGLTVTVSS

[0099] HIV1-6 (SEQ ID NO:33): QVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD  
IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNKNTVYLQMNALKPEDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWQGQTLTVTVSS

[00100] HIV1-7 (SEQ ID NO: 34):  
EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD  
IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNKNTVYLQMNALKPEDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWGEGLTVTVSS

[00101] HIV1-8 (SEQ ID NO: 35):  
QVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYGQGTQVTVSS

[00102] HIV1-11 (SEQ ID NO: 36):

QVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYGEGTQVTVSS

[00103] HIV1-13 (SEQ ID NO: 37):

EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRSSDYNWYGEGTLVTVSS

[00104] HIV1-23 (SEQ ID NO: 38):

EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMDALKPEDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYGEGTQVTVSS

[00105] HIV1-24 (SEQ ID NO: 39):

HVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPGDT  
AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYGQGTTLVTVSS

[00106] HIV1-25 (SEQ ID NO: 40):

EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD

IRSVGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDTA  
MYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWYGEGTQVTVSS

[00107] HIV1-31 (SEQ ID NO: 41):

DVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTYNSRVD



IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDT  
 AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYNWGEGETQVTVSS

[00108] HIV1-38 (SEQ ID NO: 42):

EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYANSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDT  
 AMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPSDYDYWGEGLTVTVSS

[00109] HIV1-39 (SEQ ID NO: 43):

EVQLVESGGDSVQAGGSLQLSCKASGYTNSRVD

IRSMGWFRQYPGKEREGVATINIRNSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDT  
 AMYYCALSDRFAAQVPTRYGIRPSDYNWGGGTQVTVSS

[00110] Um ou mais anticorpos monoclonais de camundongo podem ser gerados contra um ou mais domínios dos sdAbs anti-RT de HIV-1 da invenção. O anticorpo monoclonal de camundongo pode ser gerado por métodos que são conhecidos por um técnico no assunto, por exemplo, o anticorpo monoclonal de camundongo pode ser produzido por um hibridoma de camundongo. O anticorpo monoclonal de camundongo pode ser utilizado em ensaios de diagnóstico, por exemplo, o anticorpo pode ser utilizado num imunoensaio tal como um ensaio ELISA ou espectrometria de massa para medir a quantidade de sdAb anti-RT de HIV-1 presente em uma amostra de um paciente.

[00111] SdAbs também foram gerados contra um araquidonato 12-lipoxigenase recombinante (ALOX12). ALOX12 também é conhecido como 12-lipoxigenase do tipo plaqueta, araquidonato oxigênio 12-oxidoreductase, Delta12-lipoxigenase, 12Delta-lipoxigenase, C-12 lipoxigenase, leucotrieno A4 sintase e LTA4 sintase. ALOX12 é uma enzima do tipo lipoxigenase que participa do metabolismo do ácido araquidônico. ALOX12 estava envolvido no desenvolvimento

e complicações de diabetes induzida por dieta e/ou geneticamente induzida, disfunção de tecido/células adiposas e obesidade. Acredita-se que ALOX12 também regulou a contração, a dilatação, a pressão, a remodelação e a angiogênese dos vasos sanguíneos. A inibição do ALOX12 previne o desenvolvimento da formação de vasos sanguíneos e, portanto, o ALOX12 é um alvo para reduzir a neovascularização que promove a aterosclerose, a esteato-hepatite e outras doenças artríticas e cancerosas. Quantidades elevadas de ALOX12 podem contribuir para o desenvolvimento da doença de Alzheimer.

[00112] A presente invenção fornece sdAbs, proteínas e polipeptídeos que são direcionados contra a proteína de ALOX12.

[00113] É contemplado que os sdAbs e polipeptídeos anti-ALOX12 da invenção podem ser utilizados para a prevenção e/ou tratamento de doenças e distúrbios associados e/ou mediados por ALOX12, tais como diabetes, disfunção das células adiposas, obesidade, aterosclerose, esteato-hepatite, artrite e câncer.

[00114] Utilizou-se a proteína de ALOX12 humano recombinante para gerar sdAbs que são direcionados contra ou podem ligar-se a um epítipo de ALOX12. Para gerar os sdAbs anti-ALOX12, o ALOX12 humano recombinante foi expresso em *Escherichia coli* e utilizado como o antígeno alvo.

[00115] A sequência da proteína de ALOX12 recombinante (SEQ ID NO: 44) utilizada para imunização de camelos foi:

MGRYRIRVATGAWLFGSYNRVQLWLVGTRGEAELELQLRPARGEEEFDHDVAEDLGLLQ  
FVRLRKHHWLVDDAWFCDRITVQGPACAEVAFPCYRWVQGEDILSLPEGTARLPGDNAL  
DMFQKHREKELKDRQQIYCWATWKEGLPLTIAADRKDDLPPNMRFHEEKRLDFEWTLKAG  
ALEMALKRVYTLSSWNCLEDFDQIFWGQKSALAEKVRQCWQDDELFYQFLNGANPMLL  
RRSTSLPSRLVLPSPGMEELQAQLEKELQNGSLFEADFILLDGIPANVIRGEKQYLAAPLVMLK

MEPNGKLQPMVIQIQPPNPSSPTPTLFLPSDPPLAWLLAKSWVRNSDFQLHEIQYHLLNTHL  
 VAEVIAVATMRCLPGLHPIFKFLIPHIRYTMETRARTQLISDGGIFDKAVSTGGGGHVQLLR  
 RAAQLTYCSLCPDDLADRGLLGLPGALYAHDALRLWEIARYVEGIVHLFYQRDDIVKGD  
 ELQAWCREITEVGLCQAQDRGFPVSFQSQSQLCHFLTMCVFTCTAQHAAINQGQLDWYA  
 WVPNAPCTMRMPPPTTKEDVTMATVMGSLPDVRQACLQMAISWHLRQPDMPVPLGH  
 HKEYFSGPKPKAVLNQFRTDLEKLEKEITARNEQLDWPYEYLPSCIENSVTI

[00116] Como resultado da imunização, vários sdAbs foram obtidos e rastreados. As sequências de DNA dos sdAbs estão listadas abaixo:

[00117] ALOX\_21 (SEQ ID NO: 45): 5'-  
 gaggtgcagctggtggagctctgggggaggctcggtgcagg  
 ctggagggtctctgaggatctcctgtacagcctctggattcacttttgatgacactgacatgggctggtaccgccagac  
 tctaggaaatgggtgagcttggtttctcagattagtaatatggttagtacattctatagagattccgtgaagggccg  
 attcaccatctcctgggaccgcgtcaacaacacggtgtatctgcaaatgagcgccctgagacctgaggacacggcca  
 tgtattactgcaatatcaacgggtgtaggagaccctctacaatcttcacttgaacgcatggggccaggggacacag  
 gtcaccgtctcctca-3'

[00118] ALOX\_41 (SEQ ID NO: 46): 5'-  
 caggtgcagctggtggagctctgggggaggctcggtgcagg  
 ctggagggtctctgacactgtcctgtgtagcctctggatacggctacagtgccacgtgcatgggctggttccgccagg  
 ctccaggaaggagcgcgaggggggtcgctctatttcaccttatggtgttagaaccttctatgccgactccgcgaaag  
 gccgattcaccgtctcccagacaacccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgaaacctgaggacac  
 gtccgtgtactactgtgcgccggttcgggcgttggtgtttgttcactttcgtatccatacacctactggggccagggga  
 ccaggtcaccgtctcctca-3'

[00119] ALOX\_43 (SEQ ID NO: 47): 5'-  
 caggtgcagctggtggagctctgggggaggctcggtgcgg  
 gctggagagctctctgagactctcctgtgtagcctctagatccatctatgtttgttactgcatgggctggttccgccaggc

tgcaggggaaggagcgcgaggggggtcggaagtatgttcgttggtggcggtaggacatattatgacgactccgtcaag  
ggccgattcaccatctcccaagacaaggccaagaacacgctgtatctgcaaatggacaacctggcacctgaagaca  
ctgccatgtattactgtgctggctgggcgctgcggtggcaactggctgagaagcaatgctttcgacaaatggggccag  
gggacactgggtcaccgtctcctca-3'

[00120] ALOX\_46 (SEQ ID NO: 48): 5'-  
gatgtgcagctggaggagctctgggggaggctcgggtgcagg  
ctggagggtctctgagactctcctgtgcagccactggaaacacctacattagccgctgcatgggctggttccgccagc  
ctccaggggaaggagcgcgaggtggctgcacgtatttataccgactctggtaatacatactatcccgacgccgtggag  
ggccgattcaccatctcccaagacaacgccaagaacacgatatatctgcaaatgaacagcctgaaacctgacgaca  
ccgccgtgtactactgtgtgtctctcagaggccgtctgtacaaaagaacctggggactttcgttactggggccagggga  
cccaggtcactgtctcctca-3'

[00121] As sequências de proteínas dos sdAbs anti-ALOX gerados são as seguintes:

[00122] ALOX\_21 (SEQ ID NO: 49): EVQLVESGGGSVQAGGSLRISCTAS  
GFTFDDTDMGWYRQTLGNGCELVSQISNDGSTFYRDSVKGRFTISWDRVNNTVYLQMSAL  
RPEDTAMYYCNINGCRRPSYNLHLNAWGQGTQVTVSS

[00123] ALOX\_41 (SEQ ID NO: 50): QVQLVESGGGSVQAGGSLTLSCVAS  
GYGYSATCMGWFRQAPGKEREGVASISPYGVRTFYADSAKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNSL  
KPEDTSVYYCAAGSGVGVCSLSYPYTYWGQGTQVTVSS

[00124] ALOX\_43 (SEQ ID NO: 51): QVQLVESGGGSVRAGESLRLSCVAS  
RSIYVWYCMGWFRQAAGKEREGVGSMFVGGGRITYDDSVKGRFTISQDKAKNTLYLQMD  
NLAPEDTAMYYCAAGRCGGNWLRNFAFDKWGQGTTLTVSS

[00125] ALOX\_46 (SEQ ID NO: 52): DVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAAT  
GNTYISRCMGWFRQPPGKEREVVARIYTDSGNTYYPDAVEGRFTISQDNAKNTIYLQMNSLK  
PDDTAVYYCVLSEAVCTKEPGDFRYWGQGTQVTVSS

[00126] Um ou mais anticorpos monoclonais de camundongo podem ser gerados contra um ou mais domínios dos sdAbs anti-ALOX12 da invenção. O anticorpo monoclonal de camundongo pode ser gerado por métodos que são conhecidos por um técnico no assunto, por exemplo, o anticorpo monoclonal de camundongo pode ser produzido por um hibridoma de camundongo. O anticorpo monoclonal de camundongo pode ser utilizado em ensaios de diagnóstico, por exemplo, o anticorpo pode ser utilizado num imunoensaio tal como um ensaio ELISA ou espectrometria de massa para medir a quantidade de sdAb anti-ALOX12 presente em uma amostra de um paciente.

[00127] Ebola, também conhecido como doença do vírus Ebola (EVD) e febre hemorrágica de Ebola (EHF), é uma febre hemorrágica viral de humanos e outros primatas causada pelo vírus Ebola. A doença tem um alto risco de morte, matando entre 25 e 90 por cento dos infectados, geralmente de seis a dezesseis dias após o aparecimento dos sintomas.

[00128] Ebola interfere com o funcionamento adequado do sistema imunológico inato do indivíduo infectado. As proteínas do Ebola enfraquecem a resposta do sistema imunológico às infecções virais, interferindo na capacidade das células de produzir e responder às proteínas interferon, como interferon-alfa, interferon-beta e interferon-gama. As proteínas estruturais do Ebola, VP24 e VP35, desempenham um papel fundamental nessa interferência. A proteína V24 bloqueia a produção das proteínas antivirais da célula hospedeira. Ao inibir as respostas imunes do hospedeiro, o Ebola se espalha rapidamente por todo o corpo.

[00129] Como aqui descrito, os sdAbs anti-VP24 foram desenvolvidos para terem como alvo a proteína VP24 de Ebola. O sdAb anti-VP24 pode tratar com sucesso indivíduos infectados com Ebola isoladamente ou em combinação com

outros agentes retrovirais. Utilizando métodos que são bem conhecidos na técnica, utilizou-se a proteína VP24 recombinante (SEQ ID NO: 53) para gerar sdAbs que são direcionados contra ou podem ligar-se a um epítipo de VP24.

[00130] A proteína VP24 recombinante da sequência de proteína (SEQ ID NO: 53) utilizada para imunização de um camelo foi:

AKATGRYNLISPKKDLEKGVVLSDLNVLVSQTIQGWKVYWAGIEFDVTHKGMALLHRLKTN  
DFAPAWSMTRNLFPHLFQNPSTIESPLWALRVILAAGIQDQLIDQSLIEPLAGALGLISDWL  
LTTNTNHFNMRTQRVKEQLSLKMLSLIRSNILKFINKLDALHVVNYNGLSSIEI ILEFNSSLAI

[00131] Como resultado da imunização, foi obtido um sdAb anti-VP24, VP24\_5 e rastreado quanto à ligação à VP24. A sequência de DNA de VP24\_5 (SEQ ID NO: 54) é:

5'- ATGGGTGAT GTGCAGCTGGTGGAGTCT GGGGGAGAC TCGGTGCGG GCTGGAGGG  
TCTCTTCAAATGGGTGAT GTGCAGCTG GTGGAGTCT GGGGGAGAC  
TCGGTGCGGGCTGGAGGGTCTCTTCAA CTCTCCTGT AAAGCCTCT GGATACACC  
TACAATAGTAGAGTCGATATCAGATCT ATGGGCTGG TTCCGCCAG TATCCAGGA  
AAGGAGCGCGAGGGGGTCGCTACTATT AATATTCGT AATAGTGTC ACATACTAT  
GCCGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACC ATCTCCCAA GACAACGCC AAGAACACG  
GTGTATCTGCAAATGAACGCCCTGAAA CCTGAGGAC ACTGCCATG TACTACTGT  
GCGTTGTCAGACAGATTCGCGGCGCAG GTACCTGCC AGGTACGGA ATACGGCCC  
TCTGACTAT AACTACTGG GGTGAGGGG ACCCTGGTC ACCGTCTCC TCAAGCTCT  
GGTCTCGAG-3'

[00132] A sequência de aminoácidos do sdAb de VP24\_5 (SEQ ID NO: 55) é apresentada abaixo, com as CDRs sublinhadas:

MGDVQLVESGGDSVRAGGSLQLSCKASGYTYSRVDIIRSMGWFRQYPGKEREGVATINIR  
NSVTYYADSVKGRFTISQDNAKNTVYLQMNALKPEDTAMYYCALSDRFAAQVPARYGIRPS  
DYNYWGEGTLTVSSSSGLE

[00133] Um ou mais anticorpos monoclonais de camundongo podem ser gerados contra um ou mais domínios do sdAb anti-VP24 da invenção. O anticorpo monoclonal de camundongo pode ser gerado por métodos que são conhecidos por um técnico no assunto, por exemplo, o anticorpo monoclonal de camundongo pode ser produzido por um hibridoma de camundongo. O anticorpo monoclonal de camundongo pode ser utilizado em ensaios de diagnóstico, por exemplo, o anticorpo pode ser utilizado num imunoensaio tal como um ensaio ELISA ou espectrometria de massa para medir a quantidade de sdAb anti-VP24 presente numa amostra de um paciente.

#### EXEMPLOS

##### EXEMPLO 1: GERAÇÃO DE SDABS

[00134] SdAbs foram produzidos a partir de um camelo que foi imunizado com várias proteínas incluindo ALOX12 (SEQ ID NO: 44), VP24 (SEQ ID NO: 53) e transcriptase reversa de HIV-1 (SEQ ID NO: 1).

[00135] Utilizando técnicas padrão, construiu-se uma biblioteca de exibição de fagos utilizando o vetor pCDisplay-3M (Creative Biogene, Shirley, NY) e o fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs, Ipswich, MA). Clones únicos de sdAbs foram confirmados por ELISA, e as sequências de DNA e proteína determinadas usando métodos padrão.

EXEMPLO 2: SDAB DE HIV1-9 (SEQ ID NO: 27) SE LIGA À TRANSCRIPTASE REVERSA DE HIV-1 E VP-24 DE EBOLA

[00136] Experimentos de ligação às proteínas foram realizados em uma Biacore 3000 (General Electric Company, Fairfield, CT) a 25°C. O tampão de ensaio continha tampão HEPES 10 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, P20 a 0,05%. O tampão de regeneração continha HCl de glicina 10 mM, pH 1,75 e o tampão de imobilização continha acetato de sódio 10 mM, pH 5,0. A vazão usada para capturar o ligante foi de 5 uL/min. A vazão usada para a análise cinética foi de 30 uL/min.

[00137] Os ligantes utilizados para o experimento de ligação às proteínas foram HIV1-9 (SEQ ID NO: 27) e STAT3-VHH14 (SEQ ID NO: 56). Os ligantes foram imobilizados diretamente por acoplamento de amina (EDC/NHS) em uma unidade de resposta (RU) de 1200 e 550 na célula de fluxo 2 e 4, respectivamente, de um chip sensor CM5. A célula de fluxo 1 foi mantida como o branco e usada para subtração de ruído. Os locais não ocupados no chip CM5 foram bloqueados com etanolamina 1M. Para análise de ligação, o analito, rHIV-1 (SEQ ID NO:1) fluiu sobre o chip sensor. A ligação do analito ao ligante foi monitorada em tempo real. A constante de afinidade ( $K_D = k_d/k_a$ ) foi calculada a partir da taxa observada ( $k_a$ ) da taxa de dissociação ( $k_d$ ), como mostrado na Tabela 1.

[00138] O controle negativo para os experimentos de ligação à proteína foi um sdAb anti-STAT3, VHH14 (SEQ ID NO: 56):  
 QVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASTYTGCMGWFRQ  
 APGKEREGVAALSSRGFAGHYTDSVKGRFSISRDIYVKNVYLQMNTVKPEDAAMYYCAARE  
 GWECGETWLDRTAGGHTYWGQGTLVTVSS

[00139] Análise qui-quadrado ( $\chi^2$ ) foi realizada entre o sensorgrama atual e o sensorgrama gerado a partir do software BIAAnalysis para determinar a precisão da análise. Um valor de  $\chi^2$  dentro de 1 a 2 é considerado exato e abaixo de 1 é altamente preciso.



TABELA 1

| Ligante     | Analito | ka (1/Ms)            | kd (1/s)              | Rmax | KD (M)                | Conc. (nM) | Qui-quadrado |
|-------------|---------|----------------------|-----------------------|------|-----------------------|------------|--------------|
| HIV1-9 VHH  | rHIV-1  | 8,91x10 <sup>4</sup> | 3,79x10 <sup>-4</sup> | 71,3 | 4,25x10 <sup>-9</sup> | 100        | 0,0321       |
| STAT3 VHH14 | rHIV-1  | N/A                  | N/A                   | N/A  | N/A                   | 100        | N/A          |

[00140] Análise cinética completa foi realizada em concentrações do analito como indicadas na Tabela 2, com uma diluição em série de 2 vezes da maior concentração do analito. O sdAb anti-RT de HIV1-9 se ligou aos analitos de HIV-1 e VP24 do Ebola.

TABELA 2

| Ligante              | Analito | ka (1/Ms)            | kd(1/s)               | Rmax | KD (M)                | Conc. (nM) | Qui-quadrado |
|----------------------|---------|----------------------|-----------------------|------|-----------------------|------------|--------------|
| HIV1-9 VHH (1200 RU) | rHIV-1  | 1,90x10 <sup>5</sup> | 7,31x10 <sup>-4</sup> | 126  | 3,85x10 <sup>-9</sup> | 0-200      | 0,226        |
| STAT3 VHH14 (550 RU) | rHIV-1  | NA                   | NA                    | NA   | NA                    | 0-200      | NA           |
| HIV1-9 VHH (1200 RU) | VP-24   | 4,38x10 <sup>2</sup> | 1,66x10 <sup>-4</sup> | 1190 | 3,79x10 <sup>-7</sup> | 0-200      | 0,199        |

EXEMPLO 3:SDAB DE HIV1-9 (SEQ ID NO: 27) SE LIGA À TRANSCRIPTASE REVERSA DE HIV-1 EM ELISA

[00141] Foram avaliadas duas amostras diferentes do sdAb de RT HIV1-9 e anti-HIV-1 (SEQ ID NO: 27) a 1 µg/mL contra um *checkerboard* de antígeno de revestimento, anticorpo 2° e concentrações de HRP em um ELISA. O antígeno de revestimento foi RT de HIV-1 recombinante (Creative BioMart) (SEQ ID NO: 1) a 0,5, 0,025 e 0,125 µg/mL por poço. O anticorpo secundário foi um antilhama de coelho biotilado diluído a 1:5.000 e 1:10.000, HRP a 1:25.000 e 1:50.000. As relações sinal-ruído >20 foram observadas com várias das concentrações. Os resultados do ELISA são mostrados nas Figuras 1 e 2.

[00142] Três combinações foram escolhidas para avaliar uma série de diluição do sdAb anti-RT de HIV-1 e HIV1-9 (SEQ ID NO: 27) (1 µg/mL a 0,0001 µg/mL).

| Antígeno de revestimento | Anticorpo 2° | HRP      |
|--------------------------|--------------|----------|
| 0,5 µg/mL                | 1:10.000     | 1:25.000 |
| 0,5 µg/mL                | 1:5.000      | 1:50.000 |
| 0,5 µg/mL                | 1:10.000     | 1:50.000 |

[00143] Os resultados são mostrados nas Figuras 3 e 4. As duas preparações de sdAb anti-RT de HIV-1 e HIV1-9 (SEQ ID NO: 27) utilizadas têm resultados muito semelhantes. Os resultados com revestimento de 0,5 µg/mL, diluição 1:5.000 do anticorpo 2° e diluição 1:50.000 de HRP mostraram ligação do sdAb anti-RT de HIV-1 e HIV1-9 (SEQ ID NO: 27) à RT do HIV1 (SEQ ID NO: 1) com a maior relação sinal-ruído e um valor de branco ligeiramente inferior.

#### EXEMPLO 4: SDAB DE VP24-5 (SEQ ID NO: 55) SE LIGA À VP24

[00144] Os experimentos de ligação a proteínas foram realizados como descrito no Exemplo 2. Os ligantes utilizados para a ligação às proteínas foram

VP24-5 (SEQ ID NO: 55) e STAT3-VHH14 (SEQ ID NO: 56). Os ligantes foram imobilizados diretamente por acoplamento de amina (EDC/NHS) em uma unidade de resposta (RU) de 427 e 550 na célula de fluxo 2 e 4, respectivamente, de um chip sensor CM5. A célula de fluxo 1 foi mantida como o branco e usada para subtração de ruído. Os locais não ocupados no chip CM5 foram bloqueados com etanolamina 1M. Para análise de ligação, os analitos, VP24 (SEQ ID NO:53) fluiu sobre o chip sensor e foram monitoradas em tempo real. A constante de afinidade ( $KD = k_d/k_a$ ) foi calculada a partir da taxa observada ( $k_a$ ) da taxa de dissociação ( $k_d$ ), como mostrado na Tabela 3.

TABELA 3

| Ligante     | Analito | $k_a$ (1/Ms)       | $k_d$ (1/s)           | Rmax | KD (M)                | Conc. (nM) | Qui2   |
|-------------|---------|--------------------|-----------------------|------|-----------------------|------------|--------|
| VP24-5-VHH  | VP-24   | $1,39 \times 10^5$ | $8,77 \times 10^{-4}$ | 6,84 | $6,31 \times 10^{-9}$ | 100        | 0,0481 |
| STAT3 VHH14 | VP-24   | NA                 | NA                    | NA   | NA                    | 100        | NA     |

[00145] A análise cinética completa foi realizada em diferentes concentrações de analito com diluição em série de 2 vezes da maior concentração de analito, como mostrado na Tabela 4.

TABELA 4

| Ligante    | Analito | $k_a$ (1/Ms)       | Kd (1/s)              | Rmax | KD (M)                | Conc. (nM) | Qui2  |
|------------|---------|--------------------|-----------------------|------|-----------------------|------------|-------|
| VP24-5-VHH | VP-24   | $1,61 \times 10^3$ | $4,73 \times 10^{-5}$ | 222  | $2,94 \times 10^{-8}$ | 0-200      | 0,187 |

|                            |       |    |    |    |    |       |    |
|----------------------------|-------|----|----|----|----|-------|----|
| STAT3<br>VHH14<br>(550 RU) | VP-24 | NA | NA | NA | NA | 0-200 | NA |
|----------------------------|-------|----|----|----|----|-------|----|

EXEMPLO 5: SDAB DE VP24-5 (SEQ ID NO: 55) SE LIGA AO ALVO VP24 DE EBOLA EM ELISA

[00146] Foram avaliadas duas amostras diferentes do sdAb de VP24-5 anti-Ebola VP24-5 (SEQ ID NO: 55) a 1 µg/mL contra um “checkerboard” de antígeno de revestimento, anticorpo 2° e concentrações de HRP em um ELISA. O antígeno de revestimento foi VP24 de Ebola (Creative BioMart) (SEQ ID NO: 53) a 0,5, 0,025 e 0,125 µg/mL por poço. O anticorpo secundário foi um antilhama de coelho biotinilado diluído a 1:5.000 e 1:10.000. HRP foi usado a uma diluição de 1:10.000 e 1:25.000. Os resultados do ELISA são mostrados nas Figuras 5 e 6. As relações sinal-ruído foram baixas e a análise foi repetida com maiores concentrações.

[00147] O ELISA foi repetido com 1 e 0,5 µg/mL de sdAb de VP24-5 anti-Ebola VP24-5 (SEQ ID NO: 55). Utilizou-se VP24 recombinante (SEQ ID NO: 53) a 0,5 ou 1 µg/mL por poço. O anticorpo secundário foi um antilhama de coelho biotinilado diluído a 1:1.000, 1:4.000, 1:10.000 e 1:10.000. HRP foi usado a uma diluição de 1:25.000 e 1:50.000. Os resultados do ELISA são mostrados nas Figuras 7 e 8.

[00148] Três combinações foram escolhidas para avaliar uma série de diluição do sdAb VP24-5 anti-VP24 de Ebola (SEQ ID NO: 55) (1 µg/mL a 0,0001 µg/mL).

| Antígeno de revestimento | Anticorpo 2° | HRP      |
|--------------------------|--------------|----------|
| 0,5 µg/mL                | 1:1.000      | 1:1.000  |
| 0,5 µg/mL                | 1:10.000     | 1:25.000 |
| 1 µg/mL                  | 1:4.000      | 1:25.000 |

[00149] Os resultados são mostrados nas Figuras 9 e 10. As duas preparações de sdAb VP24-5 anti-VP24 de Ebola (SEQ ID NO: 55) utilizadas têm resultados muito semelhantes e mostram a ligação de sdAb VP24-5 anti-VP24 de Ebola (SEQ ID NO: 55) à VP24 recombinante (SEQ ID NO: 53).

[00150] Embora a presente invenção tenha sido descrita em detalhe considerável com referência a certas modalidades preferidas, são possíveis outras modalidades. As etapas divulgadas para os presentes métodos, por exemplo, não se destinam a ser limitativas nem têm a intenção de indicar que cada etapa é necessariamente essencial para o método, mas, em vez disso, são apenas etapas exemplificativas. Por conseguinte, o escopo das reivindicações anexas não deve ser limitado à descrição das modalidades preferidas contidas nesta invenção. Todas as referências aqui citadas são incorporadas por referência na sua totalidade.

### REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo de domínio único (SdAb) anti-transcriptase reversa do Vírus da Imunodeficiência Humana Tipo 1 (HIV-1), **caracterizado** pelo fato de que o sdAb anti-transcriptase reversa de HIV-1 compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:27.

2. Uso do sdAb anti-transcriptase reversa de HIV-1 definido na reivindicação 1, **caracterizado** pelo fato de ser para a fabricação de uma composição para o tratamento, prevenção de desenvolvimento, ou prevenção de recorrência de uma infecção pelo HIV em um indivíduo.

3. Uso de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o indivíduo é um mamífero.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, **caracterizado** pelo fato de que o mamífero é um humano.

5. Uso de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que o sdAb anti-transcriptase reversa de HIV-1 é usado em combinação com um ou mais compostos.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado** pelo fato de que o um ou mais compostos é um inibidor de protease.

7. Uso de acordo com a reivindicação 2, **caracterizado** pelo fato de que a composição é formulada para administração intravenosa, administração intramuscular, administração oral, administração retal, administração enteral, administração parenteral, administração intraocular, administração subcutânea, administração transdérmica, administração por colírio, administração por um spray nasal, administração por inalação ou nebulização, administração tópica e administração por um medicamento implantável.

8. Polipeptídeo isolado, **caracterizado** pelo fato de que compreende a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:27.

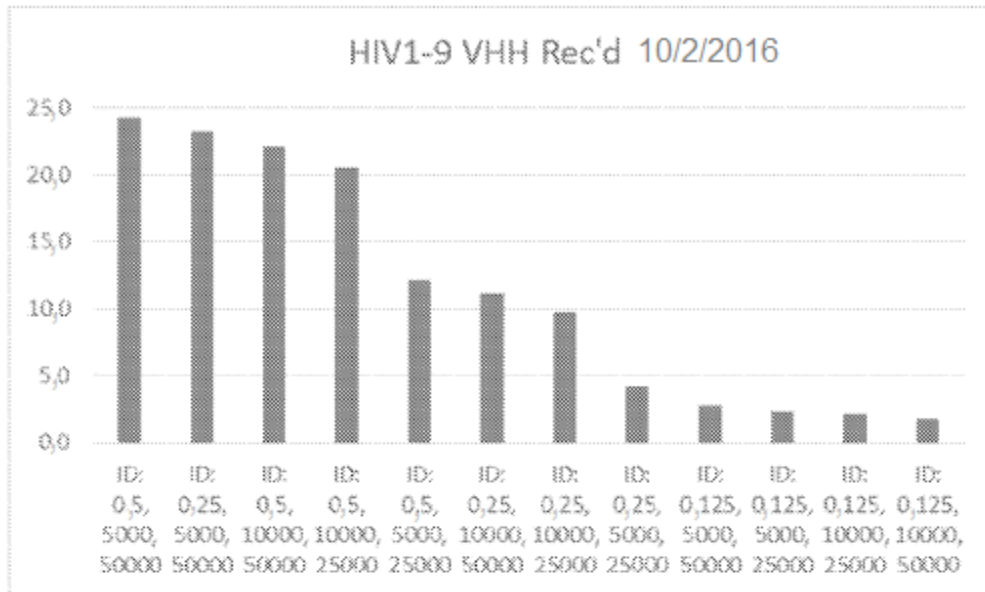
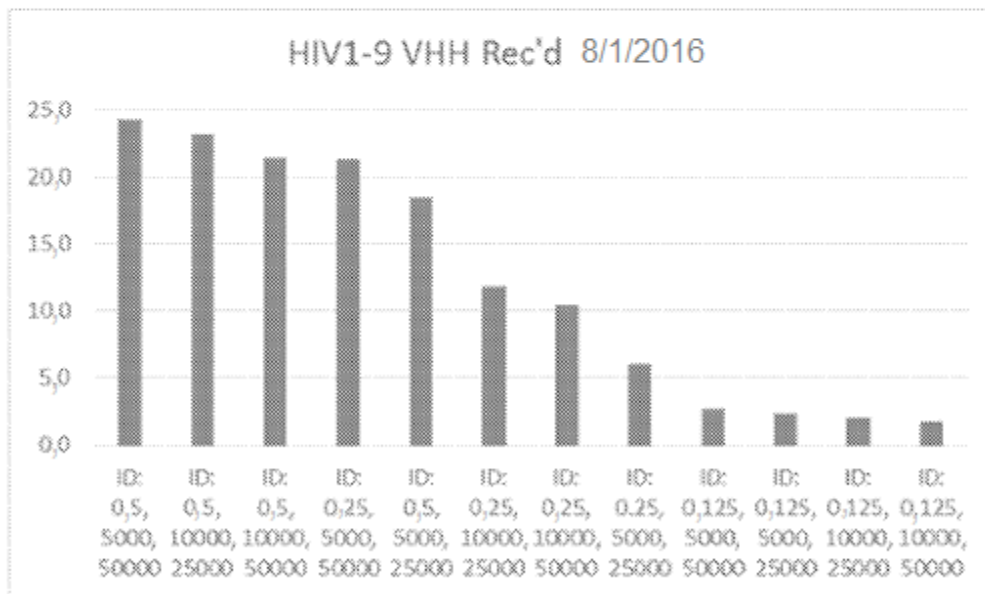
9. Método para medir os níveis de um sdAb anti-transcriptase reversa de HIV-1 em uma amostra de um indivíduo, **caracterizado** pelo fato de compreender as etapas de:

a. gerar um anticorpo monoclonal de camundongo direcionado contra um ou mais domínios de um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácidos estabelecida na SEQ ID NO:27;

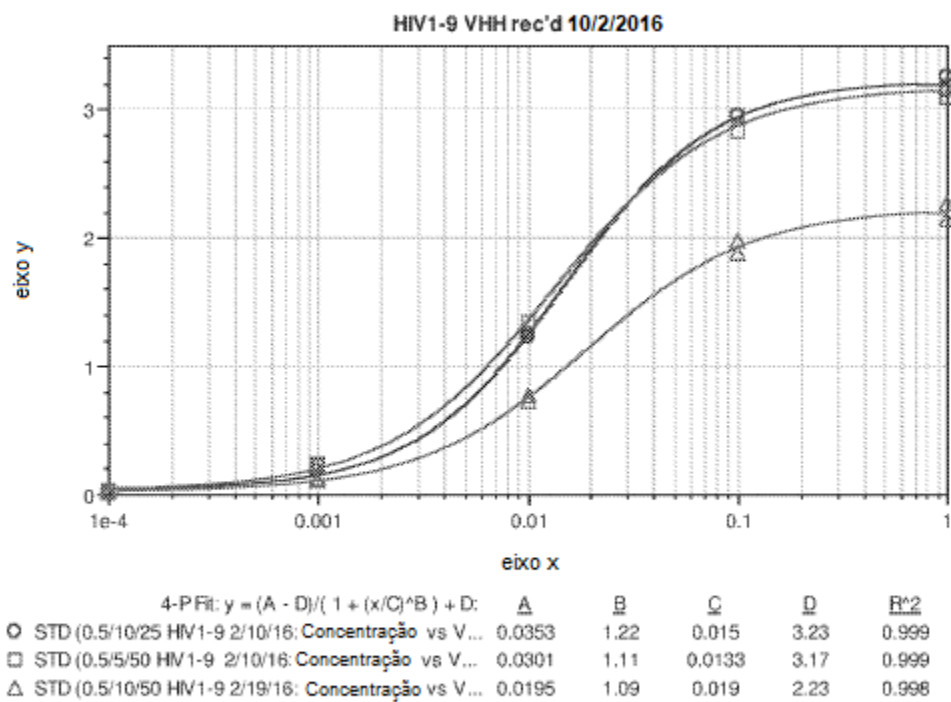
b. realizar um imunoensaio quantitativo com o anticorpo monoclonal de camundongo e a amostra para determinar a quantidade de sdAb em um indivíduo;  
e

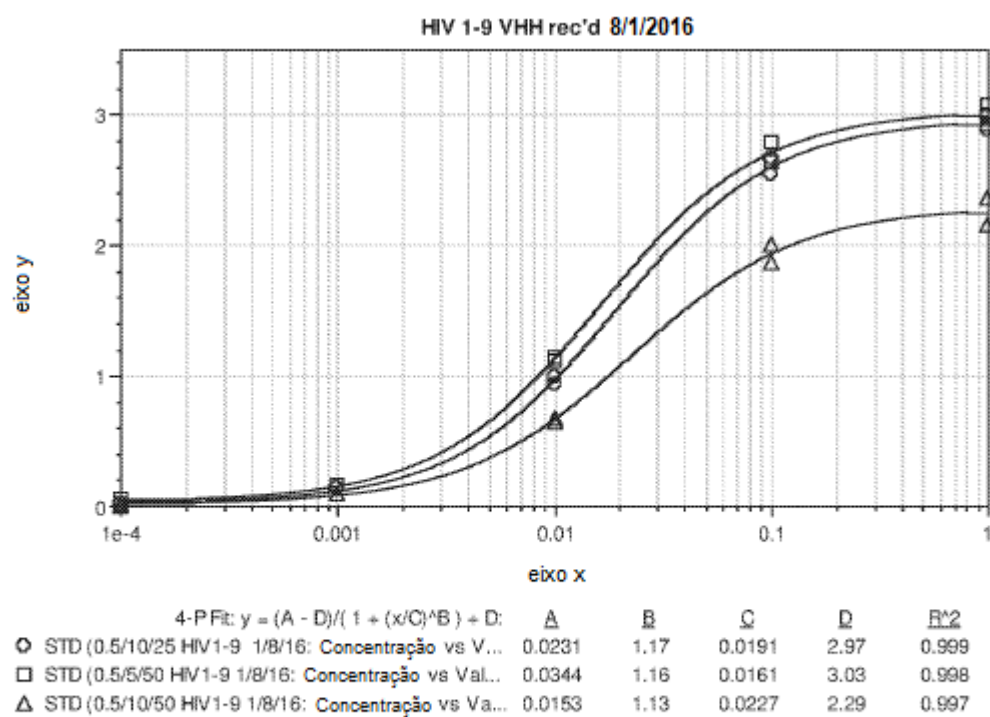
c. quantificar a quantidade de sdAb no indivíduo.

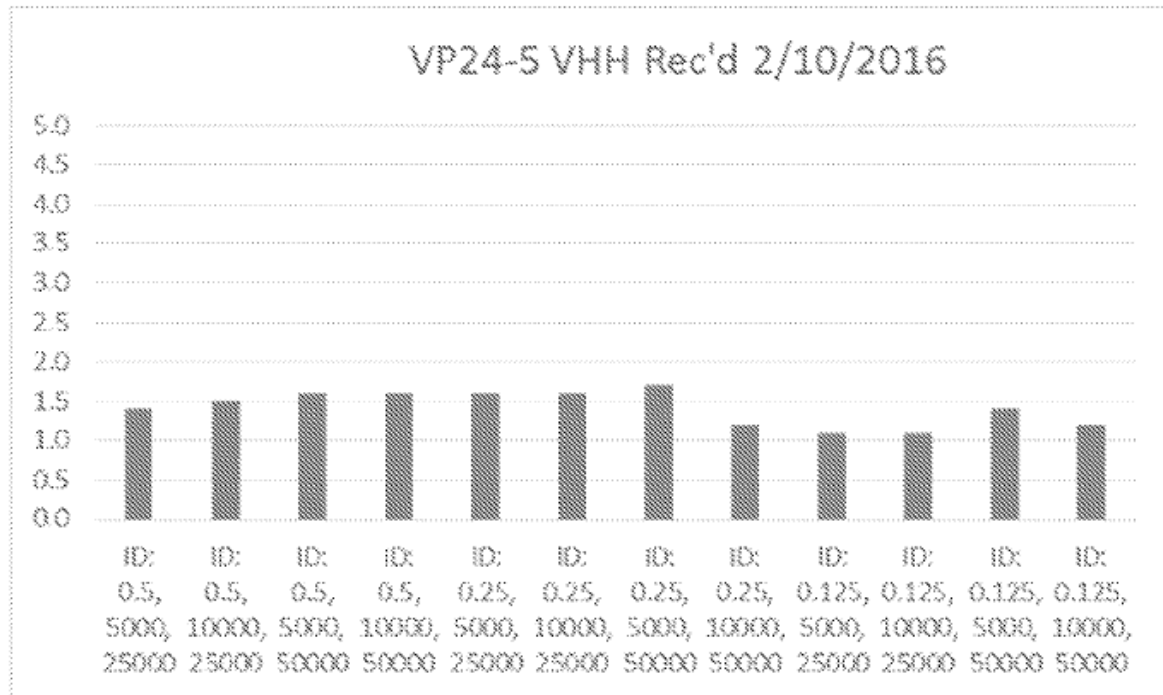
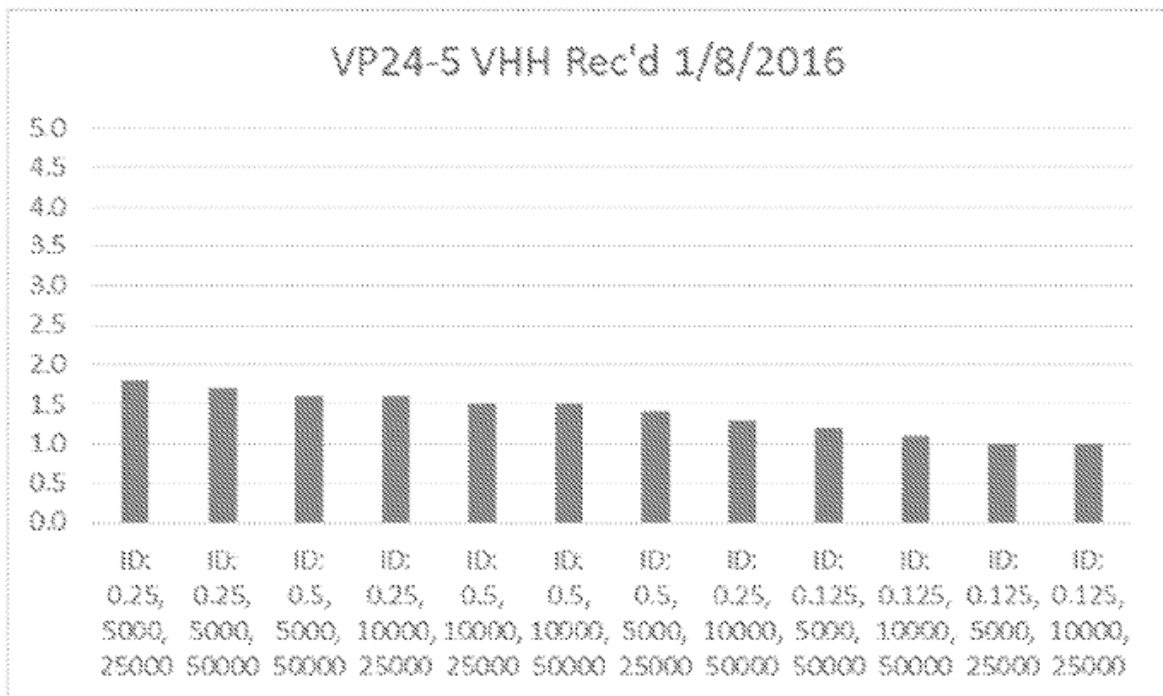
10. Método de acordo com a reivindicação 9, **caracterizado** pelo fato de que o imunoensaio quantitativo compreende um ensaio de imunoabsorção ligado à enzima (ELISA), ensaio de recaptura e marcação de analito específico (SALRA), cromatografia líquida, espectrometria de massas, separador de células ativado por fluorescência ou uma combinação dos mesmos.

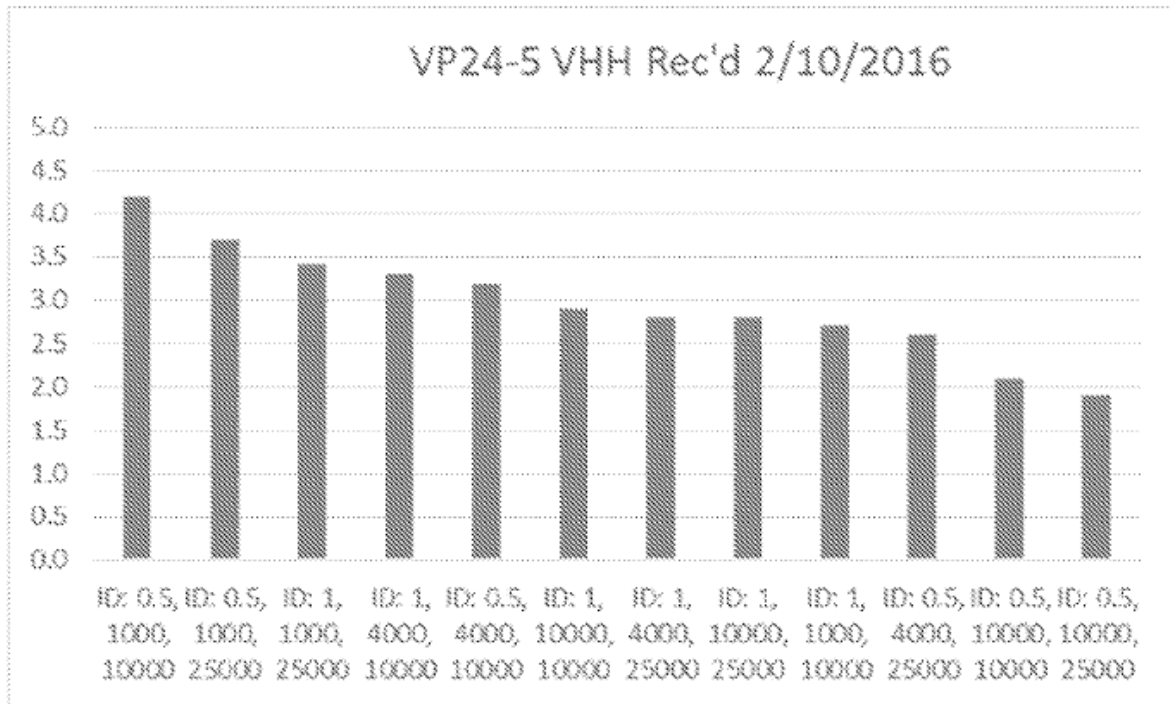
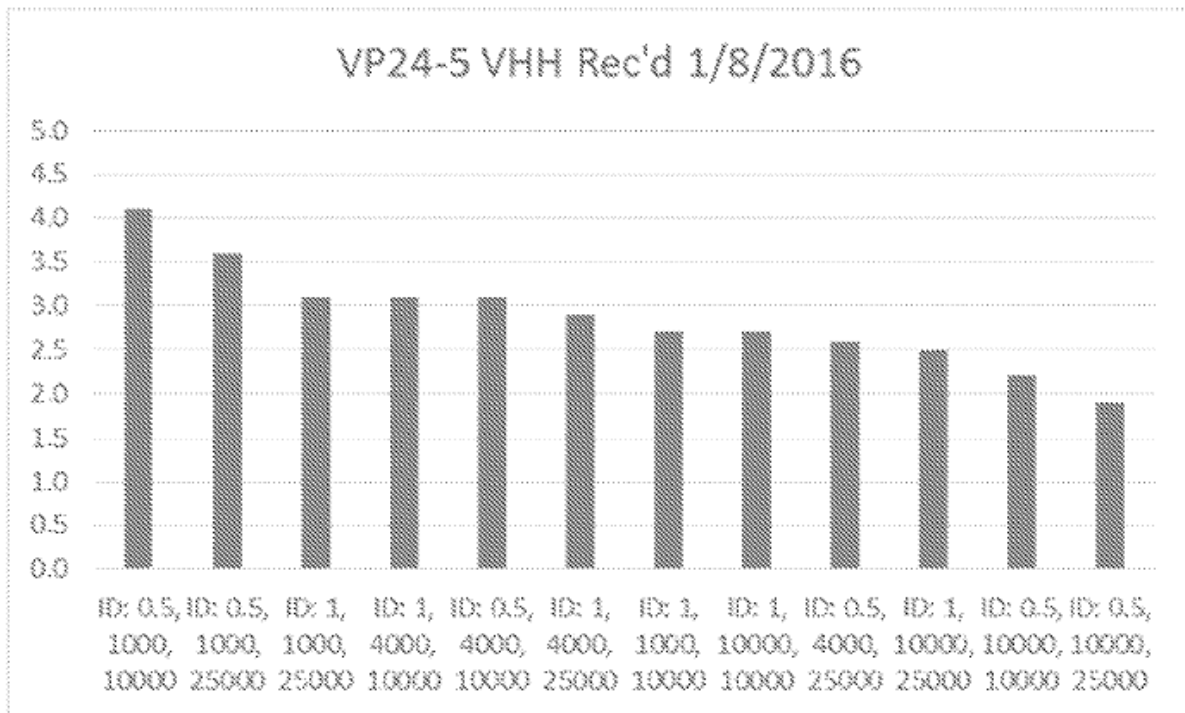
**FIG. 1****FIG. 2**

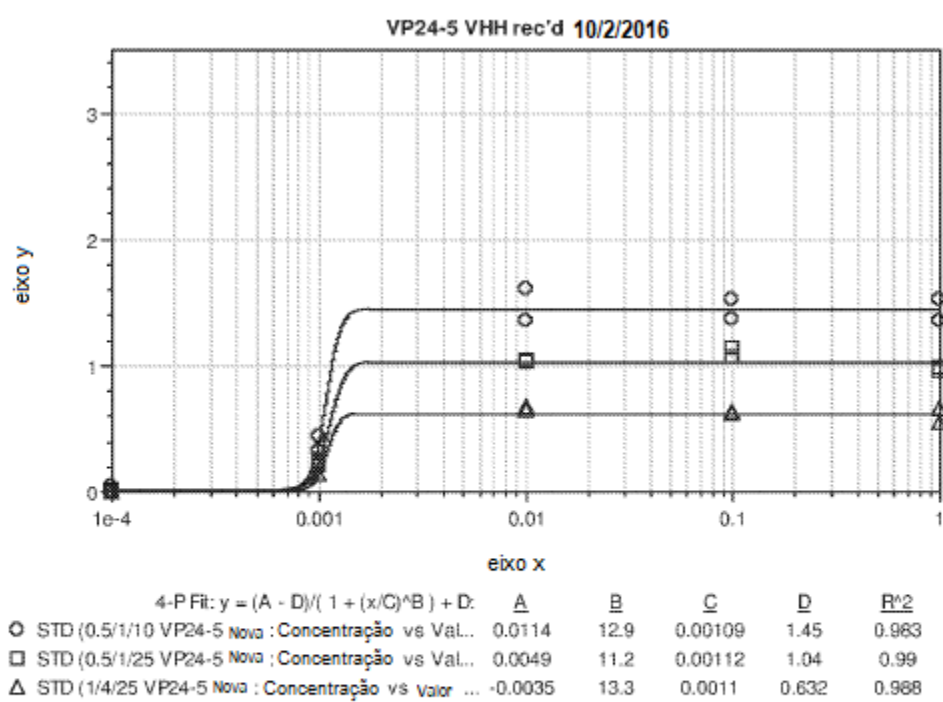


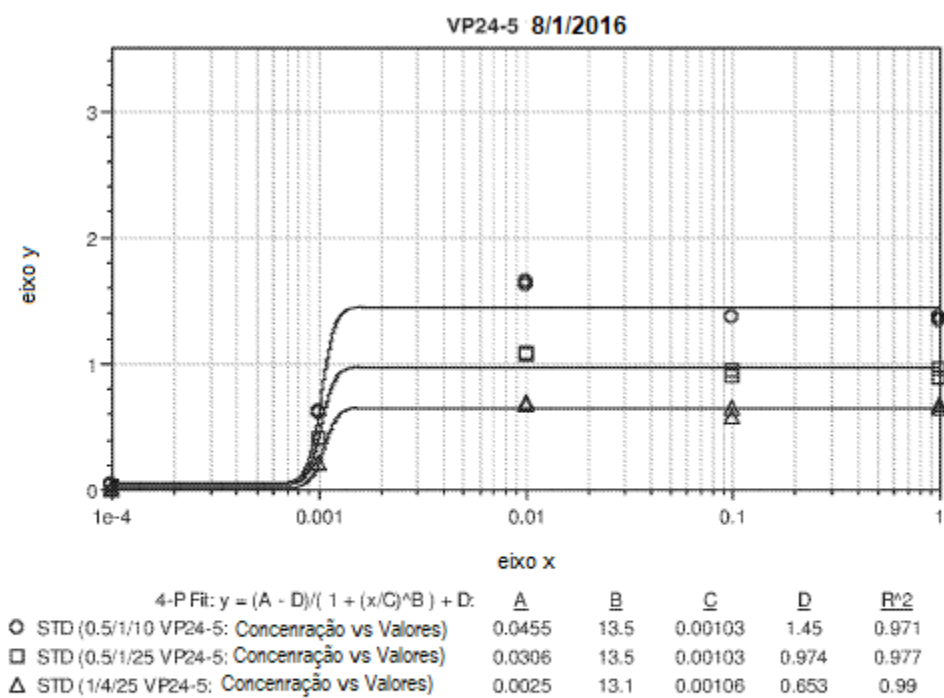
**FIG. 3**

**FIG. 4**

**FIG. 5****FIG. 6**

**FIG. 7****FIG. 8**

**FIG. 9**

**FIG. 10**