



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

(21) PI 0911699-0 A2



* B R P I 0 9 1 1 6 9 9 A 2 *

(22) Data de Depósito: 27/07/2009

(43) Data da Publicação: 23/09/2014
(RPI 2281)

(51) Int.Cl.:

A61K 39/395

A61P 31/16

(54) Título: "ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTA, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLÉICO, VETOR, CÉLULA QUE EXPRESSA O ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO IMUNOGÊNICO ISOLADO OU PURIFICADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO, MÉTODO DE REDUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, OU REDUÇÃO DO RISCO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, E, EPÍTOPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE AO ANTICORPO"

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2008 US 61/083,838,
27/05/2009 US 61/181,582

(73) Titular(es): INSTITUTE FOR RESEARCH IN BIOMEDICINE

(72) Inventor(es): ANTONIO LANZAVECCHIA

(74) Procurador(es): DAVID DO NASCIMENTO
ADVOGADOS ASSOCIADOS

(86) Pedido Internacional: PCT IB09006616 de 27/07/2009

(87) Publicação Internacional: WO 2010/010466de
28/01/2010

ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO, VETOR, CÉLULA QUE EXPRESSA O ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO IMUNOGÊNICO ISOLADO OU PURIFICADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO, MÉTODO DE REDUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, OU REDUÇÃO DO RISCO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, E, EPÍTOPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE AO ANTICORPO

Esta aplicação reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório Nº^s U.S. 61/083.838 e 61/181.582, depositados em 25 de Julho de 2008 e em 27 de Maio de 2009, respectivamente, cujas disposições estão incorporadas no presente documento por referência como se escritos aqui na sua forma integral.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

15 A resposta do anticorpo neutralizante para vírus Influenza A é considerada para ser específica para um específico subtipo viral. Existem 16 subtipos de influenza A definidos através das suas hemaglutininas (HAs). As 16-HAs, H1 - H16 podem ser classificadas em dois grupos. O grupo 1
20 consiste nos subtipos H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 e H16, e o grupo 2 inclui os subtipos H3, H4, H7, H10, H14 e H15. Enquanto todos os subtipos estão presentes nos pássaros, a maioria dos subtipos H1, H2 e H3 causam doenças em humanos. Os subtipos H5, H7 e H9 causam infecções graves esporádicas
25 em humanos e podem gerar uma nova pandemia. Os vírus H1 e H3 evoluem continuamente gerando novos variantes, um fenômeno chamado variação antigênica. Como uma consequência disso, os anticorpos produzidos como respostas aos vírus anteriores são pobremente ou não são protetores contra os novos vírus
30 derivados. Uma consequência disso é que um novo veículo deve ser produzido a cada ano contra os vírus H1 e H3 que estão previstos para surgir, um processo que é muito dispendioso bem como nem sempre é eficiente. O mesmo se aplica para a

produção de uma vacina para influenza H5. De fato, ainda não está claro se as atuais vacinas para o H5 que são baseadas nos vírus isolados da influenza A do Vietnã ou da Indonésia protegerão contra uma futura pandemia do vírus H5.

5 Por essas razões seria altamente desejável possuir uma vacina que induz amplamente a neutralização e anticorpos capazes de neutralizar todos os subtipos de vírus de influenza A bem como seus recentes variantes (revisado por Gerhard et al., 2006). Além disso, os anticorpos
10 heterosubtípicos de ampla neutralização poderiam ser usados em situações preventivas ou terapêuticas.

Os anticorpos que reconhecem o vírus da influenza A foram caracterizados. Os anticorpos para M2 (uma pequena proteína não variante expressada em células infectadas, mas
15 não nos vírus infecciosos) apresentaram algum efeito protetor *in vivo*, possivelmente por meio da designação de alvos em células infectadas para a destruição por células NK ou células T citotóxicas. No entanto, o HA é o principal alvo anticorpos de neutralização. Ele compreende um grande
20 ectodomínio de ~500 aminoácidos que é clivado por enzimas derivadas do hospedeiro para gerar 2 polipeptídeos que permanecem ligados através de um ligação de dissulfeto. O maior fragmento N-terminal (HA1, 320-330 aminoácidos) forma um domínio globular distal à membrana que contém o local de
25 ligação do receptor e a maioria dos determinantes reconhecidos pelos anticorpos de neutralização do vírus. A menor porção C-terminal (HA2, ~180 aminoácidos) forma uma estrutura semelhante a um tronco que ancora o domínio globular para a membrana celular ou viral. O grau de
30 homologia da sequência entre os subtipos é menor nos polipeptídeos de HA1 (34%-59% de homologia entre os subtipos) do que nos polipeptídeos de HA2 (51%-80% de homologia). A região mais conservada é a sequência em torno do local de

clivagem, particularmente os 11 aminoácidos N-terminal de HA2, denominado peptídeo de fusão, que é conservado entre todos os subtipos do vírus influenza A. Parte dessa região é exposta como uma alça de superfície na molécula precursora de HA (HA0), mas se torna inacessível quando HA0 é clivado em HA1/HA2. Em resumo, existem regiões conservadas dentre os diferentes subtipos de HA especialmente na região de ligação de HA1-HA2 e na região de HA2. Entretanto essas regiões podem ser de difícil acesso para os anticorpos neutralizantes.

Existe apenas um sucesso limitado na identificação de anticorpos que neutralizam mais de um subtipo do vírus da influenza A e o seu fôlego de neutralização é restrito e a sua potência é baixa. Okuno et al, imunizou camundongos com o vírus de influenza vírus A/Okuda/57 (H2N2) e isolou um anticorpo monoclonal (C179) que se liga em epítopo conformacional conservado em HA2 e neutraliza o grupo 1 de vírus da influenza A subtipos H2, H1 e H5 *in vitro* e *in vivo* em modelos animais (Okuno et al., 1993; Smirnov et al., 1999; Smirnov et al., 2000).

Recentemente Gioia et al., descreveu a presença dos anticorpos de neutralização do vírus H5N1 no soro de alguns indivíduos que receberam uma vacina convencional de influenza sazonal. (Gioia et al., 2008). Os autores sugerem que a atividade neutralizante pode ser causada devido aos anticorpos para a neuraminidase (N1). No entanto, os anticorpos monoclonais não foram isolados e os epítomos alvo não foram caracterizados. Não está claro se os anticorpos neutralizam os outros subtipos de vírus influenza A.

Apesar de décadas de pesquisa, não há comercialização de anticorpos capazes de neutralizar amplamente ou inibir a infecção do vírus influenza A ou atenuar a doença causada pelo vírus influenza A. Portanto, há a necessidade de identificar novos anticorpos que protegem

novamente contra os múltiplos subtipos do vírus influenza A.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção é baseada, em parte, no isolamento a partir de indivíduos vacinados com a vacina contra a gripe sazonal de anticorpos monoclonais humanos de ocorrência natural que se ligam em HA e neutralizam a infecção de mais de um subtipo do vírus influenza A, bem como os epítomos novos em que os anticorpos da invenção se ligam. Assim, em um aspecto da invenção, a invenção compreende um anticorpo e fragmentos de ligação do antígeno dos mesmos, que neutralizam a infecção de mais de um subtipo do vírus influenza A, selecionado a partir dos subtipos do grupo 1 e grupo 2.

Em uma realização da invenção, a invenção compreende um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, que neutraliza a infecção de um subtipo do grupo 1 e um subtipo do grupo 2 do vírus influenza A. Em outra realização da invenção, a invenção compreende um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, que compreende pelo menos uma sequência de região determinante de complementaridade (CDR) que é ao menos 95% idêntica à sequência para qualquer uma dos SEQ ID N°s: 1-6 ou 17-22, em que o anticorpo neutraliza o vírus de influenza A.

Ainda em outra realização da invenção, a invenção compreende uma CDR1 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 1 ou SEQ ID N°: 17; uma cadeia pesada CDR2 com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 2 ou SEQ ID N°: 18; e uma cadeia pesada CDR3 com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 3 ou SEQ ID N°: 19, em que o anticorpo neutraliza o vírus da influenza A. Ainda em outra realização da invenção, a invenção compreende um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, que compreende uma CDR1 de cadeia leve com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 4 ou SEQ ID N°: 20; uma CDR2 de

cadeia leve com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 5 ou SEQ ID N°: 21; e uma CDR3 de cadeia leve com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 6 ou SEQ ID N°: 22, em que o anticorpo neutraliza o vírus da influenza A.

5 Ainda em outra realização desta invenção, a invenção compreende um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, em que o anticorpo compreende uma região variável de cadeia pesada que inclui a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 13 e uma região variável de cadeia
10 leve que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 14; ou uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 33 e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 14; ou uma região variável de cadeia
15 pesada que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 29 e uma região variável de cadeia leve que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 30; ou uma região variável de cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 35 e uma região variável de cadeia
20 leve que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 30, e em que o anticorpo neutraliza o vírus da influenza A. A invenção compreende ainda um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, em que o anticorpo é o variante 1 de F16 ou o variante 2 de F16.

25 Ainda em outra realização da invenção, a invenção compreende um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, que neutraliza a infecção de um subtipo do grupo 1 e um subtipo do grupo 2 do vírus da influenza A, em que o anticorpo ou o seu fragmento é expresso por um clone de
30 célula B imortalizado.

Em outro aspecto, a invenção compreende uma molécula de ácido nucleico que compreende um polinucleotídeo que codifica um anticorpo ou um fragmento de anticorpo da

invenção. Ainda em outro aspecto, a invenção compreende um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico da invenção ou uma célula que expressa um anticorpo da invenção ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo. Ainda em
5 outro aspecto, a invenção compreende um polipeptídeo imunogênico isolado ou purificado que compreende um epítopo que se liga com um anticorpo ou fragmento de ligação do antígeno da invenção.

A invenção compreende adicionalmente uma composição
10 farmacêutica que compreende um anticorpo da invenção ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, uma molécula de ácido nucleico da invenção, um vetor que compreende uma molécula de ácido nucleico da invenção, uma célula que expressa um anticorpo ou um fragmento de anticorpo da
15 invenção, ou um polipeptídeo imunogênico da invenção, e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável. A invenção também compreende uma composição farmacêutica que compreende um primeiro anticorpo ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, e um segundo anticorpo, ou um fragmento de ligação
20 do antígeno do mesmo, em que o primeiro anticorpo é um anticorpo da invenção, e o segundo anticorpo é um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, que neutraliza a infecção do vírus da influenza A.

Uso de um anticorpo da invenção, ou um fragmento de
25 ligação do antígeno do mesmo, um ácido nucleico da invenção, um vetor que compreende um ácido nucleico da invenção, uma célula que expressa um vetor da invenção, um polipeptídeo imunogênico isolado ou purificado que compreende um epítopo que se liga com um anticorpo ou um fragmento de anticorpo da
30 invenção, ou uma composição farmacêutica da invenção (i) na fabricação de um medicamento para tratamento da infecção do vírus da influenza A, (ii) em uma vacina, ou (iii) no diagnóstico da infecção do vírus da influenza A também é

contemplada estando inserida no escopo da invenção. Além disso, o uso de um anticorpo da invenção, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, para monitoramento da qualidade da vacinas antivírus da influenza A mediante a verificação de que o antígeno de tal vacina contém o específico epítopo na conformação correta também é contemplada estando inserida no escopo da invenção.

Em outro aspecto, a invenção compreende um método para a redução da infecção do vírus da influenza A ou para redução do risco de infecção do vírus da influenza A que compreende a administração para um indivíduo com necessidade do mesmo, de uma quantidade terapeuticamente eficiente de um anticorpo ou um fragmento de anticorpo de ligação do antígeno da invenção.

Em um aspecto adicional, a invenção compreende um epítopo que se liga especificamente em um anticorpo da invenção, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, para uso (i) em terapia, (ii) na fabricação de um medicamento para tratamento da infecção do vírus da influenza A, (iii) como uma vacina, ou (iv) na triagem por aglutinantes capazes de neutralizar a infecção do vírus da influenza A.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

A invenção é baseada, em parte, na descoberta e isolamento, a partir de indivíduos que foram vacinados com a vacina sazonal contra a influenza A, de anticorpos humanos de ocorrência natural que neutralizam amplamente o vírus da influenza A de diferentes subtipos, bem como os novos epítomos nos quais os anticorpos da invenção se ligam. Tais anticorpos são desejáveis, pois apenas um ou poucos anticorpos são necessários para neutralizar diferentes subtipos do vírus da influenza A. Além disso, os epítomos reconhecidos pelos anticorpos podem ser parte de uma vacina capaz de induzir uma ampla proteção contra ambas os isolados

pandêmicos sazonais ou candidatos de diferentes subtipos.

Consequentemente, em um aspecto, a invenção proporciona um anticorpo e fragmentos de ligação do antígeno do mesmo, que neutralizam pelo menos dois vírus influenza da
5 A nos subtipos do grupo 1 e do grupo 2. Em uma realização, a invenção proporciona um anticorpo, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, que neutraliza a infecção de um subtipo do grupo 1 e um subtipo do grupo 2 do vírus da influenza A.

Em outro aspecto da invenção, ela fornece um
10 anticorpo neutralizante e seus fragmentos de anticorpo de ligação do antígeno possuindo uma ampla especificidade contra HA de diferentes subtipos do vírus da influenza A. Em uma realização, o anticorpo, ou fragmento de ligação do antígeno da invenção se liga especificamente em um epítopo na região
15 do tronco de HA que é conservado entre dois ou mais subtipos de vírus da influenza A selecionados a partir do grupo 1 e grupo 2. Em outra modalidade, o anticorpo, ou fragmento de ligação do antígeno da invenção, se liga especificamente com um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de
20 qualquer um dos SEQ ID N°s: 37, 38, 39 ou 40.

Os anticorpos monoclonais humanos, os clones de célula B imortalizados ou as células hospedeiras transfectadas que secretam os anticorpos da invenção, e os ácidos nucleicos que codificam os anticorpos da invenção
25 também estão incluídos no escopo da invenção.

Conforme usado aqui, os termos "fragmento de ligação do antígeno", "fragmento", e "fragmento de anticorpo" são usados alternadamente para se referir a qualquer fragmento de um anticorpo da invenção que retém a atividade
30 de ligação do antígeno do anticorpo. Os exemplos de fragmentos de anticorpos incluem, mas não estão limitados a, um anticorpo de cadeia simples, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, ou scFv. O termo "anticorpo" conforme usado aqui inclui ambos os

anticorpos e seus fragmentos de anticorpo de ligação do antígeno.

Conforme usado aqui, o termo "ampla especificidade" é usado para se referir a um anticorpo ou um fragmento de
5 ligação do antígeno da invenção que pode se ligar e/ou neutralizar um ou mais subtipos do grupo 1 e um ou mais subtipos do grupo 2 do vírus da influenza A.

Conforme usado aqui, um "anticorpo neutralizante" é aquele que pode neutralizar, isto é, prevenir, inibir,
10 reduzir ou interferir com, a habilidade de um patógeno para iniciar e/ou perpetuar uma infecção em um hospedeiro. Os termos "anticorpo neutralizante" e "um anticorpo que neutraliza" ou "anticorpos que neutralizam" são usados alternadamente no presente documento. Esses anticorpos podem
15 ser usados, sozinhos ou em combinação, como agentes profiláticos ou terapêuticos mediante uma adequada formulação, em associação com vacinação ativa, como uma ferramenta de diagnósticos, ou como uma ferramenta de produção conforme descrito no presente.

20 O anticorpo, ou fragmento de ligação do antígeno, da invenção neutraliza um ou mais vírus da influenza A, a partir dos subtipos do grupo 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13 e H16 e seus variantes) e um ou mais vírus da influenza A, a partir dos subtipos grupo 2 (H3, H4, H7, H10,
25 H14 e H15 e seus variantes). Em uma modalidade, os exemplos dos subtipos do grupo 1 incluem H1, H2, H5, H6 e H9 e os exemplos de subtipos do grupo 2 incluem H3 e H7.

O anticorpo e o fragmento de anticorpo da invenção são capazes de neutralizar várias combinações dos subtipos de
30 vírus da influenza A. Em uma modalidade, o anticorpo pode neutralizar os subtipos do vírus da influenza A H1 e H3, ou os subtipos H2 e H3, ou os subtipos H3 e H5, ou os subtipos H3 e H9, ou os subtipos H1 e H7, ou os subtipos H2 e H7, ou

os subtipos H5 e H7, ou os subtipos H7 e H9.

Em outra realização, o anticorpo e o fragmento de anticorpo da invenção pode neutralizar os subtipos do vírus da influenza A H1, H2 e H3, ou os subtipos H1, H3 e H5, ou os subtipos H1, H3 e H9, ou os subtipos H2, H3 e H5, ou os subtipos H2, H3 e H9, ou os subtipos H3, H5 e H9, ou os subtipos H1, H2 e H7, ou os subtipos H1, H5 e H7, ou os subtipos H1, H7 e H9, ou os subtipos H2, H5 e H7, ou os subtipos H2, H7 e H9, ou os subtipos H5, H7 e H9, ou os subtipos H1, H3 e H7, ou os subtipos H2, H3 e H7, ou os subtipos H3, H5 e H7, ou os subtipos H3, H7 e H9.

Já em outra realização, o anticorpo pode neutralizar os subtipos de vírus da influenza A H1, H2, H3 e H7, ou os subtipos H1, H3, H5 e H7, ou os subtipos H1, H3, H7 e H9, ou os subtipos H2, H3, H5 e H7, ou os subtipos H2, H3, H7 e H9, ou os subtipos H3, H5, H7 e H9, ou os subtipos H1, H2, H3 e H5, ou os subtipos H1, H2, H3 e H9, ou os subtipos H1, H3, H5 e H9, ou os subtipos H2, H3, H5 e H9, ou os subtipos H1, H2, H5 e H7, ou os subtipos H1, H2, H7 e H9, ou os subtipos H1, H5, H7 e H9, ou os subtipos H2, H5, H7 e H9.

Ainda em outra realização, o anticorpo da invenção pode neutralizar os subtipos do vírus da influenza A H1, H2, H3, H5 e H7, ou os subtipos H1, H2, H3, H7 e H9, ou os subtipos H1, H3, H5, H7 e H9, ou os subtipos H2, H3, H5, H7 e H9, ou os subtipos H1, H2, H3, H5 e H9, ou os subtipos H1, H2, H5, H7 e H9, ou os subtipos H1, H2, H3, H5, H7 e H9. Já em outra realização, o anticorpo e os fragmentos de ligação do antígeno da invenção neutralizam uma ou mais das combinações mencionadas acima, em adição à neutralização do subtipo do vírus da influenza A H6.

O anticorpo e o fragmento de ligação do antígeno da invenção possuem uma alta potência de neutralização. A concentração do anticorpo da invenção necessária para obter

50% de neutralização do vírus da influenza A, pode, por exemplo, estar em torno de 50 µg/ml ou menos. Em uma realização, a concentração do anticorpo da invenção necessária para obter 50% de neutralização do vírus da influenza A está em torno de 50; 45; 40; 35; 30; 25; 20; 17,5; 15; 12,5; 11; 10; 9; 8; 7; 6; 5; 4,5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5 ou em torno de 1 µg/ml ou menos. Em outra realização, a concentração do anticorpo da invenção necessária para obter 50% de neutralização do vírus da influenza A está em torno de 0,9; 0,8; 0,75; 0,7; 0,65; 0,6; 0,55; 0,5; 0,45; 0,4; 0,35; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15; 0,1; 0,075; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01; 0,008; 0,006; 0,004; 0,003; 0,002 ou em torno de 0,001 µg/ml ou menos. Isso significa que apenas baixas concentrações de anticorpos são necessárias para obter 50% de neutralização do vírus da influenza A. a especificidade e a potência podem ser medidas usando um ensaio padrão de neutralização conforme aqueles que são conhecidos por técnicos no assunto.

ANTICORPOS DA INVENÇÃO

20 A invenção fornece um anticorpo que possui uma ampla especificidade em particular para HA e que neutraliza um ou mais subtipos de vírus da influenza A, a partir do grupo 1 e um ou mais subtipos de vírus da influenza A, a partir do grupo 2. O anticorpo da invenção se liga em um epítopo em uma região do HA que é conservado entre dois ou mais subtipos de vírus da influenza A selecionados a partir do grupo 1 e grupo 2.

Em uma realização, a invenção fornece um anticorpo, por exemplo, um anticorpo isolado ou um anticorpo purificado, 30 que se liga especificamente em um epítopo conservado na região haste de HA dos subtipos do grupo 1 e do grupo 2 do vírus da influenza A e interfere com a replicação ou dispersão viral. A invenção também fornece um anticorpo, por exemplo,

um anticorpo isolado ou um anticorpo purificado, que se liga especificamente em um epítopo conservado na região haste de HA dos subtipos do grupo 1 e do grupo 2 e inibe a entrada do vírus dentro da célula. Sem ser limitado por nenhuma teoria, em uma realização exemplar o anticorpo ou fragmento de ligação do antígeno da invenção se liga em um epítopo conservado na região haste do vírus da influenza A e inibe a entrada do vírus para dentro de uma célula através da interferência com a etapa de fusão. Um epítopo ou o determinante antigênico de uma proteína corresponde às partes da molécula que são especificamente reconhecidas pelo local de ligação (ou parátopo) de um anticorpo. Os epítopos são, portanto, entidades relacionais que exigem parátomos complementares para o seu reconhecimento operacional. Um epítopo que é conservado entre as diferentes variantes de uma proteína significa que o mesmo parátomo pode reconhecer especificamente estas diferentes variantes através do contato com as mesmas partes das moléculas.

Os anticorpos da invenção podem ser monoclonais, por exemplo, anticorpos monoclonais humanos, ou anticorpos recombinantes. A invenção também fornece fragmentos dos anticorpos da invenção, particularmente os fragmentos que mantêm a atividade de ligação do antígeno dos anticorpos. Apesar de que a especificação, incluindo as reivindicações, pode, em alguns momentos, se referir explicitamente ao(s) fragmento(s) de ligação do antígeno, fragmento(s) de anticorpo(s), variante(s) e/ou derivado(s) dos anticorpos, é compreendido que o termo "anticorpo" ou "anticorpo da invenção" inclui todas as categorias de anticorpos, ou seja, fragmento(s) de ligação do antígeno, fragmento de anticorpo(s), variante(s) e derivado(s) dos anticorpos.

Em uma realização, os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção neutralizam uma combinação de dois ou

mais subtipos de vírus da influenza A do grupo 1 e do grupo 2. Os exemplos de subtipos de vírus da influenza A incluem, mas não estão limitados a, H5N1 (A/Vietnã/1203/04), H1N1 (A/Nova Caledônia/20/99), H1N1 (A/Ilhas Salomão/3/2006), H3N2 (A/Wyoming/3/03) e H9N2 (A/galinha/Hong Kong/G9/97). Em outra realização, os anticorpos neutralizam e/ou são específicos para uma combinação de 3, 4, 5, 6, 7 ou mais subtipos do grupo 1 e do grupo 2 do vírus da influenza A.

Em uma realização exemplar, a invenção compreende um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, que é específico para os subtipos de vírus da influenza A H1 e H3 (por exemplo, H1N1 e H3N2); ou H1, H3, H5, e H9 (por exemplo, H1N1, H3N2, H5N1 e H9N2). Já em outra realização, o anticorpo ou o fragmento de anticorpo do mesmo é específico para H1, H3, H5, H7 e H9 (por exemplo, H1N1, H3N2, H5N1, H7N1, H7N7, H9N2). Outros exemplos de combinações dos subtipos do vírus da influenza A são fornecidos no início da aplicação.

Os números de SEQ ID para a sequência de aminoácido para a região variável da cadeia pesada (V_H) e a região variável da cadeia leve (V_L) dos exemplos de anticorpos da invenção bem como os números de SEQ ID para as sequências de ácido nucleico que codificam eles estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Números de SEQ ID para os Polipeptídeos e Polinucleotídeos V_H e V_L para os exemplos de anticorpos de neutralização do vírus da Influenza A

	SEQ ID N ^{os} para Polipeptídeos e Polinucleotídeos V_H e V_L			
	Polipeptídeo V_H	Polipeptídeo V_L	Polinucleotídeo V_H	Polinucleotídeo V_L
FI6 variante 1	13	14	15	16
FI6 variante 2	33	14	34	16
FI28 variante 1	29	30	31	32
FI28 variante 2	35	30	36	32

Em uma realização, um anticorpo ou um fragmento de

anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia pesada que possui uma sequência de aminoácido que é em torno de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência citada em qualquer um dos SEQ ID N^os: 13, 33, 29 ou 35. Em outra realização, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo da invenção compreende uma região variável de cadeia leve que possui uma sequência de aminoácido que é em torno de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência citada nos SEQ ID N^os: 14 ou 30.

Já em outra realização, a região variável de cadeia pesada de um anticorpo da invenção pode ser codificada através de uma sequência de ácido nucleico que possui uma sequência que é em torno de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência citada em qualquer um dos SEQ ID N^os: 15, 34, 31 ou 36. Já em outra realização, a região variável de cadeia leve de um anticorpo da invenção pode ser codificada através de uma sequência de ácido nucleico que possui uma sequência que é em torno de 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou 100% idêntica à sequência citada nos SEQ ID N^os: 16 ou 32.

As CDRs das cadeias pesadas do anticorpo são referidas como CDRH1, CDRH2 e CDRH3, respectivamente. De maneira similar, As CDRs das cadeias leves do anticorpo são referidas como CDRL1, CDRL2 e CDRL3, respectivamente. As posições dos aminoácidos da CDR são definidas de acordo com o sistema de numeração IMGT como: CDR1 - posições IMGT 27 até 38, CDR2 - posições IMGT 56 até 65 e CDR3 - posições IMGT 105 até 117.

A Tabela 2 fornece os números de SEQ ID para a sequência de aminoácidos dos seis CDRs das cadeias pesadas e das cadeias leves, respectivamente, dos exemplos de anticorpos da invenção.

Tabela 2. Números de SEQ ID para os Polipeptídeos de CDR dos exemplos de Anticorpos de neutralização do vírus da Influenza A

	SEQ ID N ^o s para os Polipeptídeos de CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
FI6 variante 1	1	2	3	4	5	6
FI6 variante 2	1	2	3	4	5	6
FI28 variante 1	17	18	19	20	21	22
FI28 variante 2	17	18	19	20	21	22

Em uma realização, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo da invenção compreende ao menos um CDR com uma sequência que é ao menos 95% idêntica à sequência de qualquer um dos SEQ ID N^os: 1-6 ou 17-22,

Em outra realização, a invenção fornece um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que compreende um ou mais (por exemplo, um, dois ou todos os três) CDRs de cadeia pesada do variante 1 de FI6, variante 2 de FI6, variante 1 do FI28 ou variante 2 de FI28. Em uma realização exemplar, o anticorpo ou fragmento de ligação do antígeno da invenção compreende um CDR1 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido de SEQ ID N^o: 1 ou SEQ ID N^o: 17; um CDR2 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido de SEQ ID N^o: 2 ou SEQ ID N^o: 18; e um CDR3 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido de SEQ ID N^o: 3 ou SEQ ID N^o: 19. Em certas realizações, um anticorpo ou um fragmento de anticorpo conforme fornecido no presente documento compreende uma cadeia pesada que compreende (i) SEQ ID N^o: 1 para CDRH1, SEQ ID N^o: 2 para CDRH2 e SEQ ID N^o: 3 para CDRH3, ou (ii) SEQ ID N^o: 17 para CDRH1, SEQ ID N^o: 18 para CDRH2 e SEQ ID N^o: 19 para CDRH3.

Também é fornecido um anticorpo que compreende uma cadeia leve que compreende um ou mais (por exemplo, um, dois

ou todos os três) CDRs de cadeia leve do variante 1 de FI6, variante 2 de FI6, variante 1 de FI28 ou variante 2 de FI28. Em uma realização exemplar, o anticorpo ou fragmento de ligação do antígeno da invenção compreende uma CDR1 de cadeia
5 leve com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 4 ou SEQ ID N°: 20; uma CDR2 de cadeia leve com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 5 ou SEQ ID N°: 21; e uma CDR3 de cadeia leve com a sequência de aminoácido de SEQ ID N°: 6 ou SEQ ID N°: 22. Em certas realizações, um anticorpo conforme fornecido no
10 presente documento compreende uma cadeia leve que compreende (i) SEQ ID N°: 4 para CDRL1, SEQ ID N°: 5 para CDRL2 e SEQ ID N°: 6 para CDRL3, ou (ii) SEQ ID N°: 20 para CDRL1, SEQ ID N°: 21 para CDRL2 e SEQ ID N°: 22 para CDRL3.

Em uma realização, um anticorpo da invenção, ou um
15 fragmento de ligação do antígeno do mesmo, compreende todos As CDRs do anticorpo variante 1 de FI6 conforme listados na Tabela 2, e neutraliza a infecção do vírus da influenza A. Em outra realização, um anticorpo da invenção, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, compreende todos As CDRs do
20 anticorpo variante 2 de FI6 conforme listados na Tabela 2, e neutraliza a infecção do vírus da influenza A. Já em outra realização, um anticorpo da invenção, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, compreende todos As CDRs do anticorpo variante 1 de FI28 conforme listados na Tabela 2, e
25 neutraliza a infecção do vírus da influenza A. Ainda em outra modalidade, um anticorpo da invenção, ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, compreende todos As CDRs do anticorpo variante 2 de FI28 conforme listados na Tabela 2, e neutraliza a infecção do vírus da influenza A.

30 Os exemplos de anticorpos da invenção incluem, mas não estão limitados a, variante 1 de FI6, variante 2 de FI6, variante 1 de FI28, ou variante 2 de FI28.

A invenção compreende ainda um anticorpo, ou o seu

fragmento, que se liga ao mesmo epítopo como um anticorpo da invenção, ou um anticorpo que compete com um anticorpo ou fragmento de ligação do antígeno da invenção.

Os anticorpos da invenção também incluem moléculas
5 de anticorpos híbridos que compreendem um ou mais CDRs de um anticorpo da invenção e um ou mais CDRs de outro anticorpo para o mesmo epítopo. Em uma realização, tais anticorpos híbridos compreendem três CDRs de um anticorpo da invenção e três CDRs de outro anticorpo para o mesmo epítopo. Os
10 exemplos de anticorpos híbridos compreendem i) os três CDRs de cadeia leve de um anticorpo da invenção e os três CDRs de cadeia pesada de outro anticorpo para o mesmo epítopo, ou ii) os três CDRs de cadeia pesada de um anticorpo da invenção e os três CDRs de cadeia leve de outro anticorpo para o mesmo
15 epítopo.

Os anticorpos variantes também estão incluídos no escopo da invenção. Além disso, os variantes das sequências citadas neste pedido também estão incluídos no escopo da
invenção. Tais variantes incluem os variantes naturais
20 gerados através de mutação somática *in vivo* durante a resposta imunológica ou *in vitro* mediante o cultivo de clones de célula B imortalizados. Alternativamente, os variantes podem surgir devido à degeneração do código genético, conforme mencionado acima ou podem ser produzido devido aos
25 erros na transcrição ou na tradução.

Variantes adicionais das sequências de anticorpos que possuem afinidade e/ou potência aprimorada podem ser obtidos usando métodos conhecidos na técnica e estão incluídos no escopo da invenção. Por exemplo, as
30 substituições de aminoácidos podem ser usadas para se obter anticorpos com adicional afinidade aprimorada. Alternativamente, a otimização de códon da sequência de nucleotídeo pode ser usada para aprimorar a eficiência da

tradução nos sistemas de expressão para a produção do anticorpo. Adicionalmente, os polinucleotídeos que compreendem uma sequência otimizada para a especificidade do anticorpo ou para a atividade de neutralização através da aplicação de um método de evolução direcionada para qualquer uma das sequências de ácido nucleico da invenção também estão incluídos no escopo da invenção.

Em uma realização as sequências de anticorpos variantes podem compartilhar 70% ou mais (por exemplo, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99% ou mais) da identidade da sequência de aminoácido com as sequências citadas no pedido. Em algumas realizações tal identidade da sequência é calculada com respeito ao tamanho completo da sequência de referência (por exemplo, a sequência citada no pedido). Em algumas realizações adicionais, o percentual de identidade, conforme mencionado no presente documento, é conforme determinada usando o BLAST versão 2.1.3, utilizando os parâmetros padrão definidos pelo NCBI (*the National Center for Biotechnology Information*; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) [matriz Blosum 62; penalidade por abertura de intervalo = 11 e penalidade por extensão de intervalo = 1].

Em outro aspecto, a invenção também inclui sequências de ácido nucleico que codificam uma parte ou todas as CDRs de cadeia leve e pesada dos anticorpos da presente invenção. São fornecidas aqui as sequências de ácido nucleico que codificam uma parte ou todas as CDRs de cadeias leves e pesadas dos exemplos de anticorpos da invenção. A Tabela 1 fornece os números de SEQ ID para as sequências de ácido nucleico que codificam as regiões variáveis de cadeias leves e pesadas dos exemplos de anticorpos da invenção. Por exemplo, sequências de ácido nucleico fornecidas no presente incluem SEQ ID N°: 15 (que codifica o variante 1 de FI6 de região variável de cadeia pesada), SEQ ID N°: 34 (que

codifica o variante 2 de FI6 de região variável de cadeia pesada), SEQ ID N°: 16 (que codifica o variante 1 de FI6 e o variante 2 de FI6 de região variável de cadeia leve), SEQ ID N°: 31 (que codifica o variante 1 de FI28 de região variável de cadeia pesada); SEQ ID N°: 36 (que codifica o variante 2 de FI28 de região variável de cadeia pesada) e SEQ ID N°: 32 (que codifica a variante 1 e variante 2 de FI28 de região variável de cadeia leve).

A Tabela 3 fornece os números de SEQ ID para as sequências de ácido nucleico que codificam As CDRs dos exemplos de anticorpos da invenção. Devido à redundância do código genético, existirão os variantes dessas sequências que codificam as mesmas sequências de aminoácidos.

Tabela 3. Números de SEQ ID para Polinucleotídeos de CDR dos exemplos de Anticorpos de neutralização do vírus Influenza A

	SEQ ID N° ^s para Polinucleotídeos de CDR					
	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
Variante 1 de FI6	7	8	9	10	11	12
Variante 2 de FI6	7	8	9	10	11	12
Variante 1 de FI28	23	24	25	26	27	28
Variante 2 de FI28	23	24	25	26	27	28

Em uma modalidade, as sequências de ácido nucleico de acordo com a invenção incluem as sequências de ácido nucleico que são ao menos 70%, ao menos 75%, ao menos 80%, ao menos 85%, ao menos 90%, ao menos 95%, ao menos 98%, ou ao menos 99% idênticas ao ácido nucleico que codifica a cadeia leve ou pesada de anticorpo da invenção. Em outra realização, uma sequência de ácido nucleico da invenção possui a sequência de um ácido nucleico que codifica um CDR de cadeia leve ou pesada de um anticorpo da invenção. Por exemplo, uma sequência de ácido nucleico de acordo com a invenção

compreende uma sequência que é ao menos 75% idêntica às sequências de ácido nucleico dos SEQ ID N°s: 7-12, 15, 16, 34, 23-28, 31, 32 ou 36.

Estão incluídos ainda no escopo da invenção os
5 vetores, por exemplo, os vetores de expressão, que compreendem uma sequência de ácido nucleico de acordo com a invenção. As células transformadas com esses vetores também estão incluídas no escopo da invenção. Os exemplos de tais células incluem, mas não estão limitados a, células
10 eucarióticas, por exemplo, células de leveduras, células de animais ou células de plantas. Em uma realização as células são de mamíferos, por exemplo, células humanas, CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, células de mieloma ou hibridoma.

A invenção também está relacionada com anticorpos
15 monoclonais que se ligam em um epítopo capaz de ligar os anticorpos da invenção, incluído, mas não estando limitado a, o anticorpo monoclonal selecionado a partir do grupo que consiste de variante 1 de FI6, variante 2 de FI6, variante 1 de FI28 e variante 2 de FI28.

20 Os anticorpos monoclonais e recombinantes são particularmente úteis na identificação e purificação dos polipeptídeos individuais ou outros antígenos contra os quais eles são direcionados. Os anticorpos da invenção possuem utilidade adicional para isso podem ser empregados como
25 reagentes em imunoensaaios, radioimunoensaaios (RIA) ou no ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA). Nessas aplicações, os anticorpos podem ser marcados com um reagente analiticamente detectável, tais com um radioisótopo, uma molécula fluorescente ou uma enzima. Os anticorpos também
30 podem ser usados para a identificação e caracterização molecular (mapeamento do epítopo) dos antígenos.

Os anticorpos da invenção podem ser acoplados em um fármaco para serem liberados em um local de tratamento ou

acoplados em um marcador detectável para facilitar o imageamento de um local que compreende as células de interesse, tais como as células infectadas com o vírus da influenza A. Os métodos para realizar o acoplamento dos anticorpos nas drogas e em marcadores detectáveis são bem conhecidas na técnica, bem como os métodos para imageamento usando marcadores detectáveis. Os anticorpos marcados podem ser empregados em uma ampla variedade de ensaios, empregando uma grande variedade de marcadores. A detecção da formação de um complexo de anticorpo-antígeno entre um anticorpo da invenção e um epítipo de interesse (um epítipo do vírus da influenza A) pode ser facilitada por meio da anexação de uma substância detectável no anticorpo. Os meios para detecção que são adequados incluem o uso de marcadores tais como os radionuclídeos, enzimas, coenzimas, agentes fluorescentes, quimioluminescentes, cromógenos, substratos de enzimas ou cofatores, inibidores de enzima, complexos de grupos prostéticos, radicais livres, partículas, corantes, e os semelhantes. Os exemplos de enzimas que são adequadas incluem peroxidase de rábano silvestre, fosfatase alcalina, β -galactosidase, ou acetilcolinesterase; os exemplos de complexos de grupos prostéticos que são adequados incluem estreptavidina/biotina e avidina/biotina; os exemplos de materiais fluorescentes que são adequados incluem umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina de fluoresceína, cloreto de dansila ou ficoeritrina; um exemplo de material luminescente é o luminol; os exemplos de materiais bioluminescentes incluem luciferase, luciferina e aequorina; e os exemplos de material radioativo que são adequados incluem ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S , ou ^3H . Tais reagentes marcados podem ser usados em uma grande variedade de ensaios bem conhecidos na técnica, tais como os radioimunoensaios, os imunoensaios de enzimas, por exemplo,

ELISA, imunoenaios fluorescentes, e os semelhantes. (Ver, por exemplo, US 3.766.162; US 3.791.932; US 3.817.837; e US 4.233.402).

Um anticorpo de acordo com a invenção pode ser conjugado para uma fração terapêutica como uma citotoxina, uma gente terapêutico, ou um íon metálico radioativo ou radioisótopo. Os exemplos de radioisótopos incluem, mas não estão limitados a, I-131, I-123, I-125, Y-90, Re-188, Re-186, At-211, Cu-67, Bi-212, Bi-213, Pd-109, Tc-99, In-111, e os semelhantes. Tais conjugados de anticorpos podem ser usados para modificar certa resposta biológica; a fração da droga não deve ser interpretada de forma que esteja limitada aos clássicos agentes químicos terapêuticos. Por exemplo, a fração da droga pode ser uma proteína ou um polipeptídeo que possui uma desejada atividade biológica. Tais proteínas podem incluir, por exemplo, uma toxina como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, ou toxina de difteria.

As técnicas para a conjugação de tais frações terapêuticas para anticorpos são bem conhecidas na técnica. Ver, por exemplo, Arnon et al. (1985) "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy," em *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, ed. Reisfeld et al. (Alan R. Liss, Inc.), pp. 243-256; ed. Hellstrom et al. (1987) "Antibodies for Drug Delivery," em *Controlled Drug Delivery*, ed. Robinson et al. (2d ed; Marcel Dekker, Inc.), pp. 623-653; Thorpe (1985) "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy: A Review," em *Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications*, ed. Pinchera et al. pp. 475-506 (Editrice Kurtis, Milano, Italy, 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy," em *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, ed. Baldwin et al. (Academic Press, New York, 1985), pp. 303-316;

e Thorpe et al. (1982) *Immunol. Rev.* 62:119-158.

Alternativamente, um anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, pode ser conjugado para um segundo anticorpo, ou um fragmento de anticorpo do mesmo, para formar
5 um anticorpo heteroconjugado conforme descrito em US 4,676,980. Além disso, os ligantes podem ser usados entre os marcadores e os anticorpos da invenção (por exemplo, US 4,831,175). Os anticorpos, ou os fragmentos de ligação do antígeno dos mesmos, podem ser diretamente marcados com iodo
10 radioativo, índio, ítrio, ou outra partícula radioativa conhecida na técnica (por exemplo, US 5.595.721). O tratamento pode consistir em uma combinação do tratamento com anticorpos conjugados e não conjugados administrados simultaneamente ou subsequentemente (por exemplo, WO00/52031;
15 WO00/52473).

Os anticorpos da invenção também podem ser anexados em um suporte sólido. Adicionalmente, os anticorpos da invenção, ou os fragmentos de anticorpos dos mesmos, podem ser modificados quimicamente por meio da conjugação covalente
20 com um polímero para, por exemplo, aumentar a sua meia-vida de circulação. Os exemplos de polímeros, e os métodos para anexar estes em peptídeos estão apresentados em US 4.766.106; US 4.179.337; US 4.495.285 e US 4.609.546. Em algumas realizações os polímeros podem ser selecionados a partir de
25 polióis polioxietilados e polietilenoglicol (PEG). O PEG é solúvel em água em temperatura ambiente e possui a fórmula geral: $R(O-CH_2-CH_2)_nO-R$ em que R pode ser um hidrogênio, ou um grupo protetor tal como o grupo alquila ou o grupo alcanol. Em uma realização o grupo de proteção pode ter entre
30 1 e 8 carbonos. Em outra modalidade o grupo protetor é metila. O símbolo n é um número inteiro positivo. Em uma realização n está entre 1 e 1.000. Em outra realização n está entre 2 e 500. Em uma realização o PEG possui um peso

molecular médio entre 1.000 e 40.000. Em outra realização o PEG possui um peso molecular entre 2.000 e 20.000. Ainda em outra modalidade o PEG possui um peso molecular entre 3.000 e 12.000. Em uma modalidade o PEG possui ao menos um grupo
5 hidróxi. Em outra modalidade o PEG possui um grupo hidróxi terminal. Já em outra modalidade é o grupo hidróxi terminal que é ativado para reagir com um grupo amino livre no inibidor. Entretanto, será entendido que o tipo e a quantidade de grupos reagentes podem variar para se obter um
10 PEG/anticorpo covalentemente conjugado da presente invenção.

Os polióis polioxietilados solúveis em água também são úteis na presente invenção. Eles incluem sorbitol polioxietilado, glicose polioxietilada, glicerol polioxietilado (POG), e os seus semelhantes. Em uma
15 realização, o POG é usado. Sem ser limitado por nenhuma teoria, como a cadeia principal do glicerol de glicerol polioxietilado é a mesma estrutura que ocorre naturalmente em, por exemplo, animais e humanos em mono-, di-,
triglicerídeos, esta ramificação não seria necessariamente
20 visto como um agente estranho no organismo. Em algumas realizações o POG possui um peso molecular na mesma faixa do PEG. Outro sistema de distribuição de fármaco que pode ser usado para aumentar a meia-vida de circulação é o lipossoma. Os métodos para a preparação dos sistemas de liberação do
25 lipossoma estão discutidos em Gabizon et al. (1982), Cafiso (1981) e Szoka (1980). Outros sistemas de distribuição de fármacos são conhecidos na técnica e estão descritos em, por exemplo, em Poznansky et al. (1980) e Poznansky (1984).

Os anticorpos da invenção podem ser fornecidos na
30 forma purificada. Tipicamente, o anticorpo estará presente em uma composição que é substancialmente livre de outros polipeptídeos, por exemplo, onde menos do que 90% (por peso), normalmente menos do que 60% e mais normalmente menos do que

50% da composição é constituída de outros polipeptídeos.

Os anticorpos da invenção podem ser imunogênicos em hospedeiros não-humanos (ou heterólogos), por exemplo, em camundongos. Em particular, os anticorpos podem ter um
5 idiotope que é imunogênico em hospedeiros não humanos, mas não em uma célula hospedeira humana. Os anticorpos da invenção para uso em humanos incluem aqueles que não podem ser facilmente isolados a partir de hospedeiros, tais como camundongo, cabras, coelhos, ratos, mamíferos não primatas,
10 etc. e que não podem ser geralmente obtidos por meio de humanização ou por meio de xeno-camundongo.

Os anticorpos da invenção podem ser de qualquer isotipo (por exemplo, IgA, IgG, IgM por exemplo, uma cadeia pesada α , γ ou μ), mas geralmente será IgG. Dentro do isotipo
15 de IgG, os anticorpos podem ser da subclasse IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4. Os anticorpos da invenção podem compreender uma cadeia leve κ ou λ .

PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Os anticorpos de acordo com a invenção podem ser
20 produzidos por meio de qualquer método conhecido na técnica. Por exemplo, a metodologia geral para a produção de anticorpos monoclonais usando a tecnologia de hibridoma é bem conhecida (Kohler, G. and Milstein, C., 1975; Kozbar et al. 1983). Em uma realização, o método alternativo de
25 imortalização EBV descrito em WO2004/076677 é usado.

Usando o método descrito em WO2004/076677, as células B que produzem o anticorpo da invenção podem ser transformados com EBV na presença de um ativador de célula B policlonal. A transformação com EBV é uma técnica padrão e
30 pode ser adaptada para incluir os ativadores de células B policlonais.

Estimulantes adicionais para o crescimento e a diferenciação celular podem ser opcionalmente adicionados

durante a etapa de transformação para aprimorar ainda mais a eficiência. Esses estimulantes podem ser citocinas tais como IL-2 e IL-15. Em um aspecto, IL-2 é adicionado durante e etapa de imortalização para aprimorar ainda mais a eficiência da imortalização, mas o seu uso não é essencial. As células B imortalizadas produzidas usando esses métodos podem então ser cultivadas usando os métodos conhecidos na técnica e os anticorpos isolados a partir daí.

Usando o método descrito no Pedido de Patente UK 0819376.5, uma célula de plasma simples pode ser cultivada em placas de micro poços de cultura. Os anticorpos podem ser isolados a partir de culturas de célula de plasma simples. Além disso, a partir de culturas de células de plasma simples, o RNA pode ser extraído e o PDR de uma célula simples pode ser realizado usando os métodos conhecidos na técnica. As regiões VH e VL dos anticorpos podem ser amplificadas por meio de RT-PCR, sequenciadas e clonadas em um vetor de expressão que é então transfectado para dentro de células HEK293T ou outras células hospedeiras. A clonagem do ácido nucleico em vetores de expressão, a transfecção de células hospedeiras, o cultivo de células hospedeiras transfectadas e o isolamento do anticorpo produzido podem ser realizados usando os métodos conhecidos por técnicos no assunto.

Os anticorpos podem ainda ser purificados, caso seja desejado, usando a filtração, centrifugação e vários outros métodos cromatográficos tais com HPLC ou cromatografia por afinidade. As técnicas para a purificação dos anticorpos, por exemplo, os anticorpos monoclonais, incluindo as técnicas para a produção de anticorpos de grau farmacêutico, são bem conhecidas na técnica.

Os fragmentos dos anticorpos da invenção podem ser obtidos a partir dos anticorpos por meio de método que

incluem a digestão com enzimas, tais como pepsina ou papaína, e/ou através de clivagem ou de pontes de dissulfeto por meio de redução química. Alternativamente, os fragmentos dos anticorpos podem ser obtidos por meio de clonagem e expressão de parte das sequências das cadeias leves e pesadas. Os "fragmentos" de anticorpo podem incluir os fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ e Fv. A invenção também engloba os fragmentos Fv de cadeia simples (scFv) derivados a partir das cadeias leves e pesadas de um anticorpo da invenção, por exemplo, a invenção inclui uma scFv que compreende As CDRs de um anticorpo da invenção. Também estão incluídos os monômeros e dímeros de cadeia leve ou pesada, anticorpos de cadeia pesada de domínio simples, anticorpos de cadeia leve de domínio simples, bem como os anticorpos de cadeia simples, por exemplo, Fv de cadeia simples em que os domínios variáveis de cadeia leve ou pesada são unidos por um ligante de peptídeo.

Os fragmentos de anticorpos da invenção podem transmitir interações monovalentes ou polivalentes e podem ser contidos em uma variedade de estruturas, como descrito acima. Por exemplo, as moléculas de scFv podem ser sintetizadas para criar um "triacorpo" trivalente ou um "tetracorpo" tetravalente. As moléculas de scFv podem incluir um domínio da região Fc, resultando em minicorpos bivalentes. Além disso, as sequências da invenção podem ser um componente de moléculas multiespecíficas nas quais as sequências da invenção têm como alvo os epítomos da invenção, e outras regiões da molécula se ligam em outros alvos. Os exemplos de moléculas incluem, mas não estão limitados a, Fab₂ biespecífico, Fab₃ triespecífico, scFv biespecífico, e diacorpos (Holliger and Hudson, 2005, *Nature Biotechnology* 9: 1126-1136).

As técnicas padrão de biologia molecular podem ser utilizadas para preparar as sequências de DNA que codificam

os anticorpos ou os fragmentos de anticorpos da presente invenção. As sequências de DNA desejadas podem ser sintetizadas em sua totalidade ou em parte, usando as técnicas de síntese de oligonucleotídeos. A mutagênese sítio-dirigida e a reação em cadeia da polimerase (PCR) podem ser utilizadas conforme for adequado.

Qualquer célula hospedeira apropriada/sistema de vetores pode ser utilizado para a expressão de sequências de DNA que codificam as moléculas de anticorpo da presente invenção ou os fragmentos dos mesmos. Os sistemas bacterianos, por exemplo, *E. coli*, e outros sistemas microbianos podem ser usados, em parte, para a expressão de fragmentos de anticorpos tais como os fragmentos Fab e $F(ab')_2$, e especialmente os fragmentos Fv e os fragmentos de cadeia simples de anticorpos, por exemplo, Fvs de cadeia simples. Os sistemas de expressão de células hospedeiras eucarióticas, por exemplo, de mamíferos, podem ser usados para a produção de moléculas de anticorpo maiores, incluindo moléculas completas de anticorpos. As células hospedeiras mamíferas que são adequadas incluem, mas não estão limitadas a, células CHO, HEK293T, PER.C6, NS0, células de mieloma ou hibridoma.

A presente invenção também fornece um processo para a produção de uma molécula de anticorpo de acordo com a presente invenção que compreende o cultivo de uma célula hospedeira que compreende um vetor que codifica um ácido nucleico da presente invenção sob condições adequadas para conduzir a expressão da proteína do DNA que codifica a molécula de anticorpo da presente invenção, e isolar a molécula de anticorpo.

A molécula de anticorpo pode compreender apenas um polipeptídeo de cadeia leve ou pesada, em cada caso apenas uma sequência de codificação do polipeptídeo de cadeia leve

ou cadeia pesada precisa ser usada para transfectar as células hospedeiras. Para a produção dos produtos que incluem ambas as cadeias pesada e leve, a linhagem celular pode ser transfectada com dois vetores, um primeiro vetor que codifica um polipeptídeo de cadeia leve e um segundo vetor que codifica um polipeptídeo de cadeia pesada. Alternativamente, um único vetor pode ser utilizado, em que o vetor inclui as sequências que codificam os polipeptídeos de cadeia leve e de cadeia pesada.

Alternativamente, os anticorpos de acordo com a invenção podem ser produzidos por meio de i) expressão de uma sequência de ácido nucleico de acordo com a invenção em uma célula hospedeira, e ii) isolamento do produto de anticorpo expressado. Adicionalmente, o método pode incluir iii) a purificação do anticorpo.

Triagem de Células B transformadas, Células cultivadas de plasma simples e Células HEK293T Transfectadas

As células B transformadas e as células cultivadas de plasma simples podem ser submetidas à triagem por aqueles que produzem anticorpos com a especificidade ou função desejada.

A etapa de triagem pode ser realizada por meio de qualquer imunoensaio, por exemplo, ELISA, através do tingimento de tecidos ou células (incluindo as células transfectadas), por meio de ensaio de neutralização ou através de um dentre numerosos outros métodos conhecidos na técnica para a identificação da especificidade ou função desejada. O ensaio pode ser selecionado com base no simples reconhecimento de um ou mais antígenos, ou pode ser adicionalmente selecionado com base na função desejada, por exemplo, para selecionar os anticorpos de neutralização ao invés de selecionar apenas os anticorpos de ligação de antígeno, para selecionar os anticorpos que podem alterar as

características das células alvo, tais como as suas cascatas de sinalização, os seus formatos, as suas taxas de crescimento, as suas capacidades de influenciar outras células, as suas respostas para a influência exercida por outras células ou por outros reagentes ou pela mudança nas condições, as suas condições de diferenciação, etc.

Os clones de célula B individuais transformados podem ser então produzidos a partir da cultura de células B positivas transformadas. A etapa de clonagem para separação de clones individuais da mistura de células positivas pode ser realizada através de diluição limitante, micro manipulação, deposição de célula simples por separação de célula ou outro método conhecido na técnica.

Os ácidos nucleico das culturas de células simples do plasma pode ser isolado, clonado e expresso em células HEK293T ou outras células hospedeiras usando os métodos conhecidos na técnica.

Os clones de célula B imortalizados das células HEK293T transfectadas da invenção podem ser usados de várias maneiras, por exemplo, como uma fonte de anticorpos monoclonais, como uma fonte de ácido nucleico (DNA ou mRNA) que codifica um anticorpo monoclonal de interesse, para pesquisa, etc.

A invenção fornece uma composição que compreende células B de memória imortalizadas ou células hospedeiras transfectadas que produzem os anticorpos que neutralizam ao menos dois subtipos diferentes do vírus da influenza A selecionados a partir dos subtipos do grupo 1 e do grupo 2.

EPÍTOPOS

Conforme mencionado acima, os anticorpos da invenção podem ser usados para mapear os epítomos nos quais eles se ligam. Os inventores descobriram que os anticorpos que neutralizam a infecção do vírus da influenza A estão

direcionados para os epítomos encontrados em HA. Em uma realização, os anticorpos são direcionados para um ou mais epítomos na região haste de HA que estão conservados entre um ou mais subtipos do grupo 1 e do grupo 2 do vírus da
5 influenza A. Os epítomos nos quais os anticorpos da invenção se ligam podem ser lineares (contínuos) ou conformacionais (descontínuos). Em uma realização, os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção se ligam em uma região do polipeptídeo que compreende SEQ ID N°s: 37, 38, 39 ou 40,
10 conforme apresentado no presente documento.

Os epítomos reconhecidos pelos anticorpos da presente invenção podem ter numerosas utilidades. O epítomo e os mimótopos do mesmo na forma purificada ou na forma sintética podem ser usados para elevar as respostas
15 imunológicas (por exemplo, como uma vacina, ou para a produção de anticorpos para outros usos) ou para soro de triagem para anticorpos que são imunorreagentes com o epítomo ou os seus mimótopos. Em uma modalidade tal epítomo ou mimótopo, ou antígeno que compreende tal epítomo ou mimótopo
20 pode ser usado como uma vacina para elevar uma resposta imunológica. Os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção também podem ser usados em um método para monitoramento da qualidade das vacinas. Em particular, os anticorpos podem ser usados para verificar se o antígeno em
25 uma vacina contém o correto epítomo imunogênico na conformação correta.

O epítomo também pode ser útil na triagem por ligantes que se ligam no tal epítomo. Tais ligantes incluem, mas não estão limitados a, anticorpos; incluindo aqueles
30 oriundos de camelos, tubarões, e outras espécies, fragmentos de anticorpos, peptídeos, produtos da tecnologia "phage display", aptâmeros, adnectinas ou fragmentos de outras proteínas virais ou celulares, podem bloquear o epítomo e

dessa forma prevenir a infecção. Tais ligantes estão englobados no escopo da invenção.

EXPRESSÃO RECOMBINANTE

O clone de célula B imortalizado ou a célula de plasma cultivada da invenção também pode ser usado como uma fonte de ácido nucleico para a clonagem dos genes do anticorpo genes para a subsequente expressão recombinante. A expressão a partir de fontes recombinantes é mais comum para finalidades farmacêuticas do que a expressão a partir de células B ou hibridomas, por exemplo, por razões de estabilidade, reprodutividade, facilidade de cultivo, etc.

Assim, a invenção fornece um método para a preparação de uma célula recombinante, compreendendo as etapas para: (i) obter um ou mais ácidos nucleicos (por exemplo, mRNAs de cadeia leve e/ou cadeia pesada) a partir do clone de célula B ou a célula de plasma simples cultivada que codifica o anticorpo de interesse; (ii) inserção do ácido nucleico em um vetor de expressão e (iii) transfecção do vetor para dentro de uma célula hospedeira a fim de permitir a expressão do anticorpo de interesse naquela célula hospedeira.

De maneira semelhante, a invenção fornece um método para a preparação de uma célula recombinante, que compreende as etapas para: (i) sequenciamento de ácidos nucleicos a partir do clone de célula B ou da célula de plasma simples cultivada que codifica o anticorpo de interesse; e (ii) uso da informação da sequência da etapa (i) para preparar os ácidos nucleicos para inserção dentro da célula hospedeira a fim de permitir a expressão do anticorpo de interesse naquela célula hospedeira. O ácido nucleico pode, mas não precisa, ser manipulado entre as etapas (i) e (ii) para introduzir os locais de restrição, para alterar a utilização de códon, e/ou para otimizar as sequências reguladora de transcrição e/ou

tradução.

A invenção também fornece um método para a preparação de uma célula hospedeira transfectada, que compreende a etapa de transfecção de uma célula hospedeira com um ou mais ácido nucleicos que codificam um anticorpo de interesse, em que os ácidos nucleicos são ácidos nucleicos que foram derivados a partir de um clone de célula B imortalizado ou uma célula de plasma simples cultivada da invenção. Além disso, os procedimentos para a preparação inicial dos ácidos nucleicos e então para usá-los para transfectar uma célula hospedeira podem ser realizados em diferentes momentos, por pessoas diferentes em locais diferentes (por exemplo, em diferentes países).

Essas células recombinantes da invenção podem então ser usadas para finalidades de expressão e cultivo. Elas são particularmente úteis para a expressão de anticorpos para a produção farmacêutica em larga escala. Elas também podem ser usadas como o ingrediente ativo de uma composição farmacêutica. Quaisquer técnicas adequadas de cultura podem ser usadas, incluindo, mas não estão limitadas a, cultura estática, cultura em garrafa rotatória, fluidos ascíticos, cartucho de biorreator de fibras ocas, mini fermentador modular, tanque agitado, cultura de micro carregador, perfusão de núcleo cerâmico, etc.

Os métodos para a obtenção e sequenciamento dos genes de imunoglobulina a partir de células B ou células do plasma são bem conhecidas na técnica (por exemplo, ver o capítulo 4 de *Kuby Immunology*, 4ª edição, 2000).

A célula hospedeira transfectada pode ser uma célula eucariótica, incluindo células de leveduras e célula de animais, particularmente, células de mamíferos (por exemplo, células CHO, células NS0, células humanas tais como as células PER.C6 (Jones et al 2003) ou HKB-11 (Cho et al.

2001; Cho et al. 2003), células de mieloma (US 5,807,715; US 6,300,104 etc.), bem como células de plantas. Os hospedeiros de expressão preferenciais podem glicosilar o anticorpo da invenção, particularmente com estruturas de carboidratos, em
5 que elas próprias não são imunogênicas em humanos. Em uma realização a célula hospedeira transfectada pode crescer em um meio livre de soro. Em uma outra realização a célula hospedeira transfectada pode crescer em uma cultura sem a presença de produtos derivados de animais. A célula
10 hospedeira transfectada também pode ser cultivada para gerar uma linhagem celular.

A invenção fornece um para a preparação de uma ou mais moléculas de ácido nucleico (por exemplo, genes de cadeia leve e cadeia pesada) que codificam um anticorpo de
15 interesse, compreendendo as etapas para: (i) preparação de um clone de célula B imortalizado ou cultivo de uma célula do plasma de acordo com a invenção; (ii) obtenção do ácido nucleico a partir do clone de célula B ou a célula simples do plasma cultivada que codifica o anticorpo de interesse. A
20 invenção também fornece um método para a obtenção de uma sequência de ácido nucleico que codificam um anticorpo de interesse, que compreende as etapas para: (i) preparação de um clone de célula B imortalizado ou o cultivo de uma célula simples do plasma de acordo com a invenção; (ii)
25 sequenciamento do ácido nucleico a partir do clone de célula B ou a célula do plasma cultivada que codifica o anticorpo de interesse.

A invenção também fornece um método para a preparação de moléculas de ácido nucleico que codificam um
30 anticorpo de interesse, compreendendo as etapas de obtenção do ácido nucleico que foi obtido a partir do clone de célula B transformado ou uma célula do plasma cultivada da invenção. Além disso, os procedimentos para a inicial obtenção do clone

de célula B ou a célula do plasma cultivada, e então a obtenção dos ácidos nucleicos a partir do clone de célula B ou a célula do plasma cultivada podem ser realizados em diferentes momentos por diferentes pessoas em diferentes lugares (por exemplo, em diferentes países).

A invenção fornece um para a preparação de um anticorpo (por exemplo, para uso farmacêutico), que compreende as etapas para: (i) obtenção e/ou sequenciamento de uma ou mais ácidos nucleicos (por exemplo, genes de cadeia leve e cadeia pesada) a partir dos clones de célula B ou da célula do plasma cultivada que expressa o anticorpo de interesse; (ii) inserção dos ácidos nucleicos em, ou uso das sequências de ácido nucleico para preparar um vetor de expressão; (iii) transfecção da célula hospedeira que pode expressar o anticorpo de interesse; (iv) cultivo ou subcultivo das células hospedeiras transfectadas sob condições em que o anticorpo de interesse é expresso; e, opcionalmente, (v) purificação do anticorpo de interesse.

A invenção também fornece um método para a preparação de um anticorpo que compreende as etapas para: cultivo ou subcultivo de uma população de células hospedeiras transfectadas sob condições em que o anticorpo de interesse é expresso e, opcionalmente, purificação do anticorpo de interesse, em que tal população de células hospedeiras transfectadas foi preparada através (i) do fornecimento de ácidos nucleicos que codificam um selecionado anticorpo de interesse que é produzido por um clone de célula B ou uma célula do plasma cultivada preparada conforme descrito acima, (ii) da inserção dos ácidos nucleicos em um vetor de expressão, (iii) da transfecção de um vetor em uma célula hospedeira que pode expressar o anticorpo de interesse, e (iv) do cultivo ou subcultivo da célula hospedeira transfectada compreendendo os ácidos nucleicos inseridos para

produzir o anticorpo de interesse. Assim, os procedimentos para a preparação da primeira célula hospedeira recombinante e o cultivo dela para expressar o anticorpo podem ser feitos em diferentes momentos por diferentes pessoas em diferentes
5 lugares (por exemplo, em diferentes países).

COMPOSIÇÕES FARMACÊUTICAS

A invenção fornece uma composição farmacêutica que contém os anticorpos e/ou fragmentos de anticorpos da invenção e/ou ácido nucleico que codifica tais anticorpos
10 e/ou os epítomos reconhecidos pelos anticorpos da invenção. A composição farmacêutica também pode conter um veículo farmacêuticamente aceitável para permitir a administração. O veículo não deve propriamente induzir a produção de anticorpos prejudiciais para o indivíduo que recebe a
15 composição e não deve ser tóxico. Os veículos adequados podem ser macromoléculas grandes de metabolização lenta como as proteínas, os polipeptídeos, lipossomas, polissacarídeos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido e partículas de vírus
20 inativo.

Sais farmacêuticamente aceitáveis podem ser usados, por exemplo, sais minerais ácidos, tais como os cloridratos, bromidratos, fosfatos e sulfatos, ou sais de ácidos orgânicos, tais como os acetatos, propionatos, malonatos e
25 benzoatos.

Os veículos farmacêuticamente aceitáveis em composições terapêuticas podem conter adicionalmente os líquidos como água, soro, glicerol e etanol. Adicionalmente, as substâncias auxiliares, tais com agentes umidificantes ou
30 emulsificantes ou substâncias tampão de pH, podem estar presentes em tais composições. Tais veículos permitem que as composições farmacêuticas sejam formuladas como comprimidos, pílulas, drágeas, cápsulas, líquidos, géis, xaropes, pastas

fluidas, e suspensões, para ingestão pelo objeto.

Dentro do escopo da invenção, as formas de administração podem incluir aquelas formas adequadas para a administração parenteral, por exemplo, por meio de injeção ou infusão, por exemplo, por meio de injeção de bolo ou infusão contínua. Onde os produtos forem para injeção ou infusão, eles podem ter a forma de uma suspensão, solução ou emulsão em um veículo aquoso ou oleoso e também pode conter agentes de formulação, tais como agentes de suspensão, de preservação, estabilização e/ou de dispersão. Alternativamente, a molécula do anticorpo pode estar na forma seca, para reconstituição antes do uso com um líquido estéril apropriado.

Uma vez formuladas, as composições da invenção podem ser administradas diretamente para um objeto. Em uma realização as composições são adaptadas para administração para indivíduos humanos.

As composições farmacêuticas desta invenção podem ser administradas por vários números de rotas que incluem, mas não estão limitadas à, administração, oral, intravenosa, intramuscular, intra arterial, intramedular, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, transdermal, transcutânea, tópica, subcutânea, intranasal, enteral, sublingual, intravaginal ou rotas retais. Os hiposprays também podem ser usados para administrar as composições farmacêuticas da invenção. Tipicamente, as composições terapêuticas podem ser preparadas em forma injetáveis tanto em forma líquidas ou em forma de suspensões. As formas sólidas adequadas para a solução em, ou suspensão em veículos líquidos antes da injeção também podem ser preparadas.

A liberação direta das composições será geralmente acompanhada pela injeção, subcutaneamente, intraperitonealmente, intravenosamente ou intramuscularmente,

ou distribuída no espaço intersticial de um tecido. As composições também podem ser administradas em uma lesão. O tratamento por dosagem pode seguir uma programação de dose única, ou um programa de doses múltiplas. Os produtos farmacêuticos baseados em anticorpos conhecidos fornecem orientações relativas à frequência de administração, por exemplo, se um produto farmacêutico deve ser liberado diariamente, semanalmente, mensalmente, etc. a frequência e a dosagem podem também depender da gravidade dos sintomas.

10 As composições da invenção podem ser preparadas de varias formas. Por exemplo, as composições podem ser preparadas como tanto como injetáveis, ou como soluções aquosas ou suspensões. As formas sólidas adequadas para a solução, ou suspensão, em veículos líquidos antes da injeção.
15 também podem ser preparadas (por exemplo, uma composição liofilizada, como Synagis™ e Herceptin™, para a reconstituição com água estéril, contendo um conservante). A composição pode ser preparada para a administração tópica, por exemplo, como uma pomada, creme ou pó. A composição pode
20 ser preparada para administração oral, por exemplo, como um comprimido ou cápsula, como um spray, ou como um xarope (opcionalmente aromatizados). A composição pode ser preparada para a administração pulmonar, por exemplo, como um inalador, utilizando um pó fino ou um pulverizador. A composição pode
25 ser preparada como um supositório, ou pessário. A composição pode ser preparada para administração nasal, oral ou ocular, por exemplo, como gotas. A composição pode ser em forma de kit, projetado de tal forma que uma composição combinada é reconstituída imediatamente antes da administração a um
30 indivíduo. Por exemplo, um anticorpo liofilizado pode ser fornecido em forma de kit com água esterilizada ou de tampão estéril.

Será observado que o ingrediente ativo na

composição será uma molécula de anticorpo, um fragmento de anticorpo ou variantes e derivados dos mesmos. Como tal, será suscetível à degradação no trato gastrointestinal. Assim, se a composição for administrada por uma rota utilizando o trato gastrointestinal, a composição deverá conter agentes que protegem o anticorpo da degradação, mas que liberam o anticorpo uma vez que ele foi absorvido pelo trato gastrointestinal.

Uma profunda discussão sobre veículos farmacologicamente aceitáveis está disponível em Gennaro (2000) *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 20ª edição, ISBN: 0683306472.

As composições farmacêuticas da invenção geralmente possuem um pH entre 5.5 e 8.5, Em algumas realizações ele pode estar entre 6 e 8, e em realizações adicionais ele podem ser aproximadamente 7. O pH pode ser mantido através do uso de uma tampão. A composição pode ser estéril e/ou livre de pirogênio. A composição pode ser isotônica com relação aos humanos. Em uma realização as composições farmacêuticas da invenção são fornecidas em recipientes hermeticamente vedados.

As composições farmacêuticas incluirão uma quantidade efetiva de um ou mais dos anticorpos da invenção e/ou um polipeptídeo que compreende um epítipo que se liga um anticorpo da invenção, por exemplo, uma quantidade que é suficiente para tratar, aliviar ou prevenir uma doença ou condição desejada, ou para exibir um efeito terapêutico detectável. Os efeitos terapêuticos incluem também a redução em sintomas físicos. A quantidade exata que é eficiente para qualquer indivíduo em particular dependerá de seu tamanho e da saúde, da natureza e da extensão da condição, e dos terapêuticos ou da combinação de terapias selecionadas para a administração. A quantidade efetiva para uma dada situação é

determinada pela experimentação de rotina e está dentro do julgamento de um médico. Para as finalidades da presente invenção, uma dose eficiente geralmente será de cerca de 0,01 mg/kg até cerca de 50 mg/kg, ou cerca de 0.05 mg/kg até cerca de 10 mg/kg das composições da presente invenção no indivíduo para quem foi administrado. Os produtos farmacêuticos baseados em anticorpos conhecidos fornecem orientação com relação à isso, por exemplo, Herceptin™ é administrado por meio de infusão intravenosa de uma solução de 21 mg/ml, com uma carga de dose inicial de 4mg/kg por peso corporal e uma dose de manutenção semanal de 2mg/kg por peso corporal; Rituxan™ é administrado semanalmente com 375 mg/m²; etc.

Em uma realização as composições podem incluir mais de um (por exemplo, 2, 3, etc.) dos anticorpos da invenção para proporcionar um efeito aditivo ou sinérgico terapêutico. Em outra realização, a composição pode incluir um ou mais (por exemplo, 2, 3, etc.) dos anticorpos da invenção e um ou mais (por exemplo, 2, 3, etc.) anticorpos adicionais contra o vírus da influenza A. Por exemplo, um anticorpo pode se ligar a um epítopo HA, enquanto outro pode se ligar a um epítopo diferente no HA, ou em um epítopo na neuraminidase e/ou nas proteínas da matriz. Além disso, a administração dos anticorpos da invenção juntamente com uma vacina contra a Influenza A ou com anticorpos de outras especificidades além do vírus da Influenza A estão dentro do escopo da invenção. Os anticorpos da invenção podem ser administrados tanto combinados/simultaneamente ou momentos separados a partir de uma vacina de influenza ou a partir de anticorpos com outras especificidades além daquelas do vírus da influenza A.

Em outra realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende dois ou mais anticorpos em que o primeiro anticorpo é um anticorpo da invenção e é específico para um epítopo de HA, e o segundo

anticorpo é específico para o epítopo de neuraminidase, um segundo epítopo de HA e/ou um epítopo da matriz. Por exemplo, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende dois ou mais anticorpos, em que o primeiro anticorpo é específico para um epítopo na haste de HA do vírus da influenza A, e o segundo anticorpo é específico para uma epítopo de neuraminidase, um segundo epítopo de HA (por exemplo, um epítopo na cabeça globular de HA, um segundo epítopo na haste de HA), e/ou um epítopo da matriz. O segundo epítopo na haste ou o epítopo na cabeça globular do HA do vírus da influenza A pode, mas não precisa, ser conservado entre mais de um subtipos de vírus da influenza A.

Já em outra realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende dois ou mais anticorpos, em que o primeiro anticorpo é específico para a neuraminidase epítopo, e o segundo anticorpo é específico para uma segundo epítopo de neuraminidase, um epítopo de HA e/ou um epítopo da matriz.

Ainda em outra realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende dois ou mais anticorpos, em que o primeiro anticorpo é específico para um epítopo da matriz, e o segundo anticorpo é específico para um segundo epítopo da matriz, um epítopo de HA e/ou neuraminidase.

Os exemplos de anticorpos da invenção específicos para uma proteína alvo do vírus Influenza A incluem, mas não estão limitados a, variante 1 de FI6, variante 2 de FI6, variante 1 de FI28 ou variante 2 de FI28.

Em uma realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo variante 1 de FI6 ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em outra realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende o

anticorpo variante 2 de FI6 ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Já em outra realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo variante 1 de FI28 ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, e um veículo farmacêuticamente aceitável. Ainda em outra realização, a invenção fornece uma composição farmacêutica que compreende o anticorpo variante 2 de FI28 ou um fragmento de ligação do antígeno do mesmo, e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Os anticorpos da invenção podem ser administrados (sejam combinados ou separados) com outras terapias, por exemplo, com compostos quimioterápicos, com a radioterapia, etc. Em uma realização, os compostos terapêuticos incluem compostos antivirais como o Tamiflu™. Essa terapia de combinação proporciona uma melhoria adicional ou sinérgica na eficácia terapêutica relativa a cada um dos agentes terapêuticos, quando administrados sozinhos. O termo "sinergia" é usado para descrever o efeito combinado de dois ou mais agentes ativos que é maior que a soma dos efeitos individuais de cada uma dos respectivos agentes ativos. Assim, quando o efeito combinado de dois ou mais agentes resultar na "inibição sinérgica" de uma atividade ou processo, pretende-se que a inibição da atividade ou do processo seja maior que a soma dos efeitos inibitórios de cada um dos respectivos agentes ativos. O termo "efeito terapêutico sinérgico" se refere a um efeito terapêutico observado com uma combinação de dois ou mais tratamentos em que o efeito terapêutico (conforme medido por qualquer um de uma série de parâmetros) é maior do que a soma dos efeitos terapêuticos individuais observados com as respectivas terapias individuais.

Os anticorpos podem ser administrados para os indivíduos que anteriormente não demonstraram resposta ao

tratamento da Infecção do vírus da Influenza A, por exemplo, se mostraram refratários ao tratamento anti-influenza. Esse tratamento pode incluir o tratamento anterior com um agente antiviral. Isto pode ser devido, por exemplo, por causa da
5 infecção com uma cepa resistente ao antiviral do vírus da Influenza A.

Em uma realização, a composição da invenção pode incluir os anticorpos da invenção, em que os anticorpos podem constituir até ao menos 50% por peso (por exemplo, 60%, 70%,
10 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, ou mais) da proteína total na composição. Em tal composição, os anticorpos estão na forma purificada.

A invenção fornece um método para a preparação de um produto farmacêutico, que compreende as etapas para: (i)
15 preparação de um anticorpo da invenção; e ~~-(ii)-~~ mistura do anticorpo purificado com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis.

A invenção também fornece ~~um método para a~~ preparação de um produto farmacêutico, que compreende a etapa
20 para misturar um anticorpo com um ou mais veículos farmacêuticamente aceitáveis, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal que foi obtido a partir de uma célula B transformada ou uma célula do plasma cultivada da invenção. Assim, os procedimentos para a obtenção do primeiro anticorpo
25 monoclonal e então a preparação de um produto farmacêutico pode ser realizados em momentos diferentes por pessoas diferentes em lugares diferentes (por exemplo, em diferentes países).

Como uma forma alternativa para a distribuição de
30 anticorpos ou células B para finalidades terapêuticas, é possível distribuir o ácido nucleico (Tipicamente DNA) que codifica o anticorpo monoclonal (ou o fragmento ativo do mesmo) de interesse derivado a partir da célula B ou da

célula do plasma cultivada para um objeto, de forma que o ácido nucleico pode ser expresso no objeto *in situ* para fornecer o desejado efeito terapêutico. Adequadas terapias de genes e vetores distribuição de ácido nucleico são conhecidas na técnica.

As composições da invenção podem ser composições imunogênicas e, em algumas realizações, podem ser composições de vacinas que compreendem um antígeno que compreende um epítopo reconhecido por um anticorpo da invenção. As vacinas, de acordo com a invenção, podem ser tanto profiláticas (por exemplo, para prevenir a infecção) ou terapêuticas (por exemplo, para tratar uma infecção). Em uma realização, a invenção fornece uma vacina que compreende um polipeptídeo que compreende a sequência de aminoácido de SEQ ID N°s: 37, 38, 39 ou 40.

As composições podem incluir um produto antimicrobiano, particularmente se embalado em formato de doses múltiplas. Eles podem compreender um detergente, por exemplo, um Tween (polissorbato), como o Tween 80. Os detergentes são geralmente presente em níveis baixos, por exemplo, <0.01%. As composições podem também incluir sais de sódio (por exemplo, cloreto de sódio) para dar tonicidade. Uma concentração de 10±2 mg/ml NaCl é típica.

Além disso, as composições podem incluir um álcool de açúcar (por exemplo, o manitol) ou um dissacarídeo (por exemplo, sacarose ou trealose), por exemplo, em torno de 15-30mg/ml (por exemplo, 25 mg/ml), particularmente se eles devem ser liofilizados ou se incluem material que tenha sido reconstituído a partir de material liofilizado. O pH de uma composição de liofilização pode ser ajustado para cerca de 6,1 antes da liofilização.

As composições da invenção também podem incluir um ou mais agentes imunomoduladores. Em uma modalidade, um ou

mais dos agentes imunorreguladores incluem um adjuvante.

As composições do epítopo da invenção podem provocar tanto uma resposta imunológica mediada por célula, bem como uma resposta imunológica humoral, a fim de enfrentar eficazmente a infecção do vírus da Influenza A. Essa resposta imunológica pode induzir os anticorpos de longa duração (por exemplo, de neutralização) e imunidade mediada por células que podem responder rapidamente quando expostas ao vírus da Influenza A.

TRATAMENTO E USOS MÉDICOS

Os anticorpos e os fragmentos de anticorpos da invenção ou seus derivados e variantes podem ser usados para o tratamento da infecção do vírus da influenza A, para prevenção da infecção do vírus da influenza A ou para o diagnóstico da infecção do vírus da influenza A.

Os métodos de diagnóstico podem incluir o contato com um anticorpo ou um fragmento de anticorpo com uma amostra. As amostras podem ser amostras de tecido retiradas de, por exemplo, fossas nasais, cavidades nasais, glândulas salivares, pulmão, fígado, pâncreas, rins, ouvidos, olhos, placenta, trato digestivo, coração, ovários, hipófise, glândulas supra-renais, tireóide, cérebro, ou pele. Os métodos de diagnóstico podem incluir também a detecção de um complexo de antígeno/anticorpo.

A invenção fornece, portanto, (i) um anticorpo, um fragmento de anticorpo, ou seus variantes e derivados de acordo com a invenção, (ii) um clone de célula B imortalizado de acordo com a invenção, (iii) um epítopo capaz de ligar um anticorpo da invenção ou (iv) um ligante, preferencialmente um anticorpo, capaz de ligar um epítopo que liga um anticorpo da invenção para uso em terapia.

A invenção também fornece um método para o tratamento de um objeto que compreende a administração para o

objeto de um anticorpo, um fragmento de anticorpo, ou as suas variações ou derivados de acordo com a invenção, ou, um aglutinante, preferencialmente um anticorpo, capaz de ligar um epítopo que liga um anticorpo da invenção. Em uma
5 modalidade, o método resulta na redução da Infecção do vírus da Influenza A em um objeto. Em outra realização, o método previne, reduz o risco ou retarda a Infecção do vírus da Influenza A no objeto.

A invenção também fornece o uso de (i) um
10 anticorpo, um fragmento de anticorpo, ou as suas variações ou derivados de acordo com a invenção, (ii) um clone de célula B imortalizado de acordo com a invenção, (iii) um epítopo capaz de ligar um anticorpo da invenção, ou (iv) um ligante, preferencialmente um anticorpo, que se liga em um epítopo
15 capaz de ligar um anticorpo da invenção, na fabricação de um medicamento para prevenção ou tratamento da infecção do vírus da influenza A.

~~A invenção fornece uma composição da invenção para~~
uso como um medicamento para a prevenção ou o tratamento da
20 infecção do vírus da influenza A. Esta também fornece o uso de um anticorpo da invenção e/ou uma proteína que compreende um epítopo no qual tal anticorpo se liga na fabricação de um medicamento para tratamento de um indivíduo e/ou diagnóstico de um indivíduo. Ele também fornece um método para o
25 tratamento de um objeto, que compreende a etapa para administrar uma composição da invenção para o objeto. Em algumas realizações o objeto pode ser um humano. Uma maneira de verificar a eficácia do tratamento terapêutico envolve o monitoramento dos sintomas da doença depois da administração
30 da composição da invenção. O tratamento pode ser uma programação de dose única ou uma programação de dose múltipla.

Em uma realização, um anticorpo, fragmento de

anticorpo, clone de célula B imortalizado, epítopo ou composição de acordo com a invenção é administrado para um objeto que tem necessidade de tal tratamento. Tais objetos incluem, mas não estão limitados à, alguém em particular que com risco de, ou esteja suscetível à infecção do vírus da influenza A, incluindo, por exemplo, um indivíduo imunodeficiente. O anticorpo ou o fragmento de anticorpo da invenção também pode ser usado em imunização passiva ou vacinação ativa.

Os anticorpos e fragmentos dos mesmos, conforme descritos na presente invenção também podem ser usados em um kit para fazer o diagnóstico da Infecção do vírus da Influenza A. Além disso, os epítopos capazes de se ligar em um anticorpo da invenção podem ser usados em um kit para monitorar a eficácia dos procedimentos de vacinação, detectando a presença de anticorpos protetores antivírus da Influenza A. Os anticorpos, os fragmentos de anticorpos, ou as suas variações ou derivados, conforme descritos na presente invenção também podem ser usados em um kit para o monitoramento da fabricação da vacina com a imunogenicidade desejada.

A invenção também fornece um método para a preparação de um produto farmacêutico, que compreende a etapa para a mistura de um anticorpo monoclonal com um ou mais carreadores farmacêuticamente aceitáveis, em que o anticorpo monoclonal é um anticorpo monoclonal que foi obtido a partir de uma célula hospedeira transfectada da invenção. Assim, os procedimentos para a inicial obtenção do anticorpo monoclonal (por exemplo, expressando ele e/ou purificando ele), e então a mistura deste com o(s) veículo(s) farmacêutico(s) pode ser realizada em diferentes momentos por diferentes pessoas em diferentes lugares (por exemplo, em diferentes países).

Começando com uma célula B transformada ou uma

célula do plasma cultivada da invenção, as várias etapas de cultivo, de subcultivo, de clonagem, de subclonagem, de sequenciamento, de preparação de preparação de ácido nucleico etc. podem ser realizadas para perpetuar o anticorpo expresso
5 pela célula B transformada ou a célula do plasma cultivada, com a otimização opcional em cada etapa. Em uma modalidade preferencial, os métodos citados acima incluem ainda técnicas de otimização (por exemplo, a maturação por afinidade, ou otimização), aplicada para os ácidos nucléicos que codificam
10 o anticorpo. A invenção engloba todas as células, ácidos nucleicos, vetores, sequências, anticorpos, etc. utilizados e preparados durante tais etapas.

Em todos esses métodos, o ácido nucleico usado no hospedeiro de expressão pode ser manipulado para inserir,
15 ~~eliminar ou alterar certas sequências de ácido nucleico. As~~ alterações feitas a partir de tais manipulações incluem, mas não estão limitadas a, alterações para introduzir locais de restrição, ~~para alteração de uso dos códons, para acrescentar~~ ou otimizar as sequências reguladoras de transcrição e/ou de
20 tradução, etc. Também é possível alterar o ácido nucleico para alterar os aminoácidos codificados. Por exemplo, pode ser útil para introduzir uma ou mais (por exemplo, 1, 2, 3,
4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc.) das substituições de aminoácidos, eliminações e/ou inserções em uma sequência de aminoácido do
25 anticorpo. Tais mutações pontuais podem modificar as funções efetoras, a afinidade de ligação ao antígeno, as modificações pós-translacionais, a imunogenicidade, etc., podem introduzir aminoácidos para a anexação de grupos covalentes (por exemplo, marcadores) ou pode introduzir rótulos (por exemplo,
30 para finalidades de purificação). As mutações podem ser introduzidas em locais específicos ou podem ser introduzidas de forma aleatória, seguido pela seleção (por exemplo, evolução molecular). Por exemplo, um ou mais ácidos nucleicos

que codificam qualquer uma das regiões de CDR, região variável de cadeia pesadas ou regiões variáveis de cadeia leve dos anticorpos da invenção podem ser aleatoriamente ou dirigidamente submetidos à mutação para introduzir propriedades diferentes nos aminoácidos codificados. Tais alterações podem ser o resultado de um processo iterativo em que as mudanças iniciais são mantidas e as novas alterações em outras posições de nucleotídeos são introduzidas. Além disso, as mudanças alcançadas em etapas independentes podem ser combinadas. As diferentes propriedades introduzidas nos aminoácidos codificados podem incluir, mas não estão limitadas a, afinidade aprimorada.

GERAL

O termo "que compreende" engloba "incluindo" bem como "consistindo", por exemplo, uma composição "que compreende" X pode consistir exclusivamente de X ou pode incluir algo adicional, como por exemplo, X + Y.

A palavra "substancialmente" não exclui "completamente", por exemplo, uma composição que é "substancialmente livre" de Y pode ser completamente livre de Y. Nos casos onde for necessária, a palavra "substancialmente" pode ser omitida da definição da invenção.

O termo "cerca de" com relação ao valor numérico x significa, por exemplo, $x \pm 10\%$.

O termo "doença" conforme usado aqui é interpretado como sendo geralmente sinônimo, e é usado alternadamente com, os termos "distúrbio" e "condição" (como em uma condição medica), em tudo que reflete uma condição anormal do organismo humano ou animal, ou uma de suas partes que impede o funcionamento norma, é tipicamente manifestada através da distinção dos sinais e sintomas, e faz com que o ser humano ou animal tenha uma duração ou qualidade de vida reduzida.

Conforme usado aqui, a referência para o

"tratamento" de um indivíduo ou paciente destina-se a incluir a prevenção, profilaxia ou terapia. Os termos "indivíduo" ou "paciente" são usados alternadamente aqui significando todos os mamíferos, incluindo os seres humanos. Os exemplos de objetos incluem seres humanos, vacas, cães, gatos, cavalos, cabras, ovelhas, porcos e coelhos. Em uma realização, o paciente é um ser humano.

EXEMPLOS

Modalidades exemplares da presente invenção são fornecidos nos seguintes exemplos. Os seguintes exemplos são apresentados apenas com finalidade de ilustração e para auxiliar os técnicos no assunto no uso desta invenção. Os exemplos não estão destinados a limitar de nenhuma maneira o escopo da invenção.

Exemplo 1. Geração e Caracterização de Anticorpos neutralizantes ampliada do vírus da Influenza A, a partir de Células do Plasma

Para identificar os indivíduos que podem produzir anticorpos heterosubtípicos em resposta à vacina sazonal contra a Influenza (contendo HAS H1 e H3), nós submetemos à triagem através de ELISPOT as células circulantes do plasma coletadas no dia 7 depois do reforço quanto à sua capacidade de secretar anticorpos que se ligam à vacina ou em um HA H5 não relacionado (A/VN/1203/04). Surpreendentemente, enquanto que em quatro dos cinco doadores testados as células plasmáticas H5 específicas eram indetectáveis, em um doador 14% de células plasmáticas secretoras de IgG produziram anticorpos para H5, enquanto que 57% produziram anticorpos para a vacina. As células plasmáticas CD138⁺ foram isoladas a partir de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) coletados 7 dias após a vacinação com micro-esferas magnéticas, seguido pela separação de células usando uma máquina FACSaria. Um número limitado de células plasmáticas

foi cultivado em placas de cultura de micro poços. Os sobrenadantes de cultura foram testados em três ensaios ELISA paralelos usando como antígenos os recombinantes HA H5 ou H9 e o antígeno irrelevante toxóide tetânico. Dentre 4,928 sobrenadantes de culturas submetidos à triagem, 12 se ligam em H5 mas não em H9 HA, 25 para H9 mas não em H5 HA e 54 para ambos H5 e H9. Algumas das 54 culturas com o maior sinal OD foram submetidas ao RT-PCR e dois genes pareados VH e VL foram recuperados.

Os genes VH e VL foram clonados dentro dos vetores de expressão e anticorpos recombinantes foram produzidos por meio da transfecção de células HEK293T. Os dois anticorpos monoclonais, FI6 e FI28, compartilhavam a maioria dos fragmentos de genes V, D e J (IGHV3-30*01, IGHD3-9*01, IGHJ4*02 e IGKV4-1*01), mas eram diferentes nas regiões N, na utilização IGKJ e nos seus padrões de mutação somática e, portanto, não possuíam relação clonal.

A especificidade dos anticorpos recombinantes foi investigada por meio de ELISA, utilizando um painel de HAS pertencentes a diferentes subtipos. Notavelmente, FI6 liga todos os subtipos HA do vírus de Influenza A testados, incluindo o Grupo 1 (H1, H5 e H9) e Grupo 2 (H3 e H7), embora não se ligue em HA do vírus da Influenza B. Em contraste FI28 se liga apenas aos três HA do Grupo 1 (H1, H5 e H9).

Tabela 4.

	Ligação com HA por ELISA (% de anticorpos de controle específico de subtipo)				
	H1	H3	H5	H7	H9
	A/NC/ 20/99	A/BR/ 10/07	A/VN/ 1203/04	A/NL/ 219/03	A/HK/ 1073/99
FI6	85,9	68,5	73,7	87,9	98,7
FI28	59,4	1,3	46,3	-0,5	87,7

Devido a homologia de sequências de VH e VL dos dois anticorpos, os experimentos para embaralhar foram realizados usando as cadeias H e L de FI6, FI28 e 7I13, um

anticorpo específico de HCMV que usa os mesmos elementos V, D e J da cadeia H. enquanto que a ligação em H7 necessitava do pareamento das cadeias H e L de FI6, a ligação em H5 foi mantida quando as cadeias L de FI6 e FI28 foram embaralhadas.

5 Além disso, a ligação com H5 também foi observada quando a cadeia H de FI6 foi pareada com a cadeia L não relacionada de 7I13. Em contraste, a ligação de H5 não foi observada quando a cadeia H homóloga de 7I13 foi pareada com a cadeia L de FI6.

10 Sem estarem limitados por nenhuma teoria em partículas, esses resultados sugerem que a maior contribuição para a ligação de H5 vem a partir da cadeia H, enquanto que a ligação de H7 necessita de um pareamento preciso entre as cadeias H e L de FI6.

FI6 e FI28 foram então testados quanto à sua

15 capacidade de neutralizar os subtipos do grupo 1 e do grupo 2 da Influenza A usando vírus pseudotipados (Tabela 5) bem como vírus infecciosos (Tabela 6). Notavelmente, o FI6 neutralizou todos os pseudovírus testados, incluindo seis isolados de H5 pertencentes aos clados antigenicamente divergentes 0, 1,

20 2.1, 2.2 e 2.3, e dois isolados de aves H7. Além disso, o FI6 neutralizou todos os vírus infecciosos testados, incluindo dois vírus H3N2 e quatro vírus H1N1 abrangendo várias décadas, até o mais recente isolado pandêmico H1N1 A/CA/04/09 (Tabela 6). O FI28 neutralizou todos os pseudovírus H5, mas

25 não neutralizou os pseudovírus H7 bem como todos os vírus infecciosos testados. Os títulos de neutralização nos pseudovírus foram maiores do que na titulação de vírus infecciosos.

Tabela 5.

Neutralização dos pseudotipos HA (IC90, µg/ml)								
H5N1						H7N1		
A/HK/ 491/9 7	A/HK / 213/	A/VN/ 1203/ 04	A/INDO / 5/05	A/WS/ MONG/0 5	A/AH/ 1/05	A/ck/I T/ 13474/	A/ck/F PV/ Ro/34	

		03					99	
FI6	0,07	0,02	0,02	0.31	0,03	0,05	1.87	0,09
FI28	0,05	0.33	0,02	0.35	0,04	0,05	>100	>100

Tabela 6.

	Neutralização dos vírus infecciosos (IC50, µg/ml)					
	H1N1				H3N2	
	A/PR/ 8/34	A/NC/ 20/99	A/SI/ 3/06	A/CA/ 4/09	A/CA/ 7/04	A/WI/ 67/05
FI6	2,2	6,3	8,8	12,5	7,9	12,5
FI28	>100	>100	>100	nd	>100	>100

Nd = não desenvolvido

Exemplo 2. Locais Antigênicos de Ligações de FI6**e FI28**

5 Para identificar os locais antigênicos nos quais os anticorpos FI6 e FI28 se ligam nós testamos primeiro as suas capacidades para inibir a ligação de C179, um anticorpo monoclonal de camundongo que foi mapeado para uma região conservada da região de tronco de HA (Y. Okuno, et al., *J Virol* 67, 2552 (1993)). Ambos os FI6 e FI28 inibiram completamente a ligação de C179 com o H5 recombinante VN/1203/04 HA, indicando que eles reconhecem um epítipo sobreposto. Em contraste, FI6 e FI28 não competiram com um painel de anticorpos específicos de H5 isolados a partir de

10 doadores imunes à H5N1 que reconhecem diferentes epítipos na cabeça globular de HA (C. P. Simmons et al., *PLoS Med* 4, e178 (2007); S. Khurana et al., *PLoS Med* 6, e1000049 (2009)). As tentativas para mapear o epítipo de FI6 através da seleção de

15 mutantes de escape falharam sugerindo que o seu epítipo não pode ser facilmente mutado sem comprometer a capacidade de replicação viral (*viral fitness*).

20

Em seguida, realizamos um mapeamento baseado em peptídeo usando bibliotecas de peptídeos lineares e ciclizados de HA A/VN/1194/04 bem como uma varredura por

25 hélice usando os sistemas de Pepscan Presto BV (Lelystad, Holanda). Esta análise identificou uma região de ligação de

FI6 que inclui o peptídeo de fusão FGAIAG de HA2 (aminoácido 3-8, de acordo com a numeração de H3; SEQ ID N°: 37), o peptídeo DGVTKVNS de HA2 Hélice A (aminoácido 46-54; SEQ ID N°: 38), o peptídeo MENERTLDFHDSNVK de HA2 Hélice B (aminoácido 102-116; SEQ ID N°: 39) e o peptídeo LVLATGLRNSP de HA1 C-terminal (aminoácido 315-325; SEQ ID N°: 40). A região de ligação de FI28 foi diferente daquela de FI6 uma vez que este anticorpo não reagiu com o peptídeo de HA1 C-terminal e o peptídeo de HA2 Hélice B.

REFERÊNCIAS

Okuno et al., (1993) Journal of Virology 67: 2552-2558.

Gerhard et al., (2006) Emerging Infectious Diseases 12: 569-574.

Gioia et al., (2008) Emerging Infectious Diseases 14: 121-128.

US 3.766.162

US 3.791.932

US 3.817.837

US 4.233.402

US 4.676.980

US 4.831.175

US 5.595.721

WO00/52031

WO00/52473

US 4.766.106

US 4.179.337

US 4.495.285

US 4.609.546

Gabizon et al., (1982) Cancer Research 42:4734

Cafiso (1981) Biochem Biophys Acta 649:129

Szoka (1980) Ann. Rev. Biophys. Eng. 9:467

Poznansky et al., (1980) Drug Delivery Systems

(R.L. Juliano, ed., Oxford, N.Y.) pp. 253-315

Poznansky (1984) Pharm Revs 36:277

Kohler, G. and Milstein, C., 1975, Nature 256:495-497.

5 Kozbar et al., 1983, Immunology Today 4:72.

WO2004/076677

Chapter 4 of Kuby Immunology (4th edition, 2000;
ASIN: 0716733315

Jones et al., Biotechnol Prog 2003,19(1):163-8

10 Cho et al., Cytotechnology 2001,37:23-30

Cho et al., Biotechnol Prog 2003,19:229-32

US 5.807.715

US 6.300.104

Rowe et al., (1999) J Clin Microbiol 37(4):937-43.

15 Temperton, et al., (2005). Emerg Infect Dis 11,
411-416.

Smirnov et al., (2000). Arch Virol 145, 1733-1741.

Smirnov et al., (1999). Acta Virol 43, 237-244.

Simmons et al., (2007). PLoS Med 4, e178.

20 Traggiai et al., (2004). Nat Med 10, 871-875.

REIVINDICAÇÕES

1. ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTA, que é caracterizado pelo fato de que neutraliza a infecção de um subtipo do grupo 1 e de um
5 subtipo do grupo 2 do vírus influenza A.

2. ANTICORPO, de acordo com a reivindicação 1, ou um fragmento de ligação a antígeno desta, caracterizado pelo fato de que o anticorpo se liga especificamente a um epítopo na região haste da hemaglutinina, e onde o epítopo é
10 conservado entre dois ou mais subtipos do vírus influenza A selecionados dentre o grupo 1 e o grupo 2.

3. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 ou 2, ou um fragmento de ligação a antígeno desta, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou o
15 fragmento de anticorpo se liga a um polipeptídeo compreendendo a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID N°s: 37, 38, 39 ou 40.

4. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a
20 concentração de anticorpo necessária para neutralizar 50% do vírus influenza A é de 20 µg/ml ou menos.

5. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que a
25 concentração de anticorpo necessária para neutralizar 50% do vírus influenza A é de 4 µg/ml ou menos.

6. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, ou um fragmento de ligação a antígeno desta, caracterizado pelo fato de que o subtipo do grupo 1 é H1, H2, H5 ou H9.

30 7. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, ou um fragmento de ligação a antígeno desta, caracterizado pelo fato de que o subtipo do grupo 2 é H3 ou H7.

8. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1, 2 ou 3, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de anticorpo neutraliza a infecção pelo vírus influenza A de três, quatro, cinco ou mais subtipos.

9. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que o anticorpo neutraliza a infecção pelo vírus influenza A dos subtipos (i) H1 e H3; (ii) H1 e H7; (iii) H3 e H5; (iv) H3 e H9; (v) H5 e H7; (vi) H7 e H9; (vii) H1, H3, H5 e H7; ou (viii) H1, H3, H5, H7 e H9.

10. ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTES, caracterizado pelo fato de compreender pelo menos uma sequência de região determinante de complementaridade (CDR) tendo pelo menos 95% de identidade de sequência a qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 1-6 ou 17-22, em que o anticorpo neutraliza o vírus influenza A.

11. ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTES, compreendendo uma CDR1 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido da SEQ ID N^o: 1 ou SEQ ID N^o: 17; uma CDR2 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido da SEQ ID N^o: 2 ou SEQ ID N^o: 18; e uma CDR3 de cadeia pesada com a sequência de aminoácido da SEQ ID N^o: 3 ou SEQ ID N^o: 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo neutraliza o vírus influenza A.

12. ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTES, caracterizado pelo fato de compreender uma CDR1 de cadeia leve com a sequência de aminoácido da SEQ ID N^o: 4 ou SEQ ID N^o: 20; uma CDR2 de cadeia leve com a sequência de aminoácido da SEQ ID N^o: 5 ou SEQ ID N^o: 21; e uma CDR3 de cadeia leve com a sequência de aminoácido da SEQ ID N^o: 6 ou SEQ ID N^o: 22, em que o anticorpo neutraliza o

vírus influenza A.

13. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 ou 12, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de compreender uma
5 cadeia pesada que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 1 para CDRH1, SEQ ID Nº: 2 para CDRH2, e SEQ ID Nº: 3 para CDRH3; ou SEQ ID Nº: 17 para CDRH1, SEQ ID Nº: 18 para CDRH2, e SEQ ID Nº: 19 para CDRH3.

14. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das
10 reivindicações 11, 12 ou 13, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de compreender uma cadeia leve que compreende a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 4 para CDRL1, SEQ ID Nº: 5 para CDRL2, e SEQ ID Nº: 6 para CDRL3; ou SEQ ID Nº: 20 para CDRL1, SEQ ID Nº: 21 para
15 CDRL2, e SEQ ID Nº: 22 para CDRL3.

15. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de compreender uma região variável de cadeia pesada tendo pelo menos 80% de identidade
20 de sequência a sequência de aminoácido de qualquer uma das SEQ ID Nºs: 13, 33, 29 ou 35.

16. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de compreender uma região
25 variável de cadeia leve tendo pelo menos 80% de identidade de sequência com a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 14 ou SEQ ID Nº: 30.

17. ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTA, caracterizado pelo fato de que o anticorpo
30 compreende uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 13 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 14; ou uma região variável de cadeia

pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 33 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 14; ou uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 29 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 30; ou uma região variável de cadeia pesada compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 35 e uma região variável de cadeia leve compreendendo a sequência de aminoácido da SEQ ID Nº: 30, e onde o anticorpo neutraliza o vírus influenza A.

18. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é variante 1 de FI6 ou variante 2 de FI6.

19. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 18, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo humano, um anticorpo monoclonal, um anticorpo purificado, um anticorpo isolado, um anticorpo de cadeia simples, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv ou scFv.

20. ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO DESTA, que se liga ao mesmo epítopo que o anticorpo tal como definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou fragmento de ligação a antígeno deste, neutraliza o vírus influenza A.

21. ANTICORPO, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 20, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de ser para tratamento da infecção pelo vírus influenza A.

22. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO, caracterizado pelo fato de compreender um polinucleotídeo que codifica o anticorpo, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, tal

como definido por qualquer uma das reivindicações 1 a 22.

23. MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO, de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a sequência de polinucleotídeo é pelo menos 75% idêntica à sequência de ácido nucleico de qualquer uma das SEQ ID N^{os}: 7-12, 15, 16, 34, 23-28, 31, 32 ou 36.

24. VETOR, caracterizado pelo fato de compreender a molécula de ácido nucleico, tal como definido por qualquer uma das reivindicações 22 ou 23.

25. CÉLULA QUE EXPRESSA O ANTICORPO, tal como definido por qualquer uma das reivindicações de 1-21, ou um fragmento de ligação a antígeno deste; ou caracterizado pelo fato de compreender o vetor tal como definido pela reivindicação 24.

26. POLIPEPTÍDEO IMUNOGÊNICO ISOLADO OU PURIFICADO, caracterizado pelo fato de compreender um epítopo que se liga ao anticorpo, tal como definido por qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, ou um fragmento de ligação a antígeno deste.

27. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de compreender o anticorpo, tal como definido por qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, o ácido nucleico tal como definido por qualquer uma das reivindicações 22 ou 23, o vetor tal como definido pela reivindicação 24, a célula tal como definido pela reivindicação 25, ou o polipeptídeo imunogênico tal como definido pela reivindicação 26, e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

28. COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, caracterizada pelo fato de compreender um primeiro anticorpo ou um fragmento de ligação a antígeno deste, e um segundo anticorpo, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, em que o primeiro anticorpo é o anticorpo tal como definido por qualquer uma

das reivindicações de 1 a 21, e o segundo anticorpo neutraliza a infecção pelo vírus influenza A.

29. USO DO ANTICORPO, tal como definido por qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, ou um fragmento de
5 ligação a antígeno deste, o ácido nucléico tal como definido por qualquer uma das reivindicações 22 ou 23, o vetor tal como definido pela reivindicação 24, a célula tal como definido pela reivindicação 25, o polipeptídeo imunogênico tal como definido pela reivindicação 26, ou a composição
10 farmacêutica tal como definido por qualquer uma das reivindicações 27 ou 28, caracterizado pelo fato de ser (i) na fabricação de um medicamento para o tratamento da infecção pelo vírus influenza A, (ii) em uma vacina, ou (iii) no diagnóstico da infecção pelo vírus influenza A.

15 30. USO DO ANTICORPO, tal como definido por qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de ser para monitorar a qualidade das vacinas antivírus influenza A verificando se o antígeno da referida vacina contém o epítopo
20 específico na conformação correta.

31. MÉTODO DE REDUÇÃO DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, OU REDUÇÃO DO RISCO DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, caracterizado pelo fato de compreender: administração, a um indivíduo em necessidade, de uma
25 quantidade terapêuticamente eficaz do anticorpo tal como definido por qualquer uma das reivindicações de 1 a 21, ou de um fragmento de ligação a antígeno deste.

32. EPÍTOPO QUE SE LIGA ESPECIFICAMENTE AO ANTICORPO, tal como definido por qualquer uma das
30 reivindicações de 1 a 21, ou um fragmento de ligação a antígeno deste, caracterizado pelo fato de ser para uso (i) em terapia, (ii) na fabricação de um medicamento para o tratamento da infecção pelo vírus influenza A, (iii) como uma

vacina, ou (iv) na triagem de ligantes capazes de neutralizar a infecção pelo vírus influenza A.

RESUMO

ANTICORPO, OU UM FRAGMENTO DE LIGAÇÃO A ANTÍGENO
DESTE, MOLÉCULA DE ÁCIDO NUCLEÍCO, VETOR, CÉLULA QUE EXPRESSA
O ANTICORPO, POLIPEPTÍDEO IMUNOGÊNICO ISOLADO OU PURIFICADO,
5 COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO, MÉTODO DE REDUÇÃO
DA INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, OU REDUÇÃO DO RISCO DE
INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A, E, EPÍTOPO QUE SE LIGA
ESPECIFICAMENTE AO ANTICORPO

A invenção está relacionada aos anticorpos, e os
10 seus fragmentos de anticorpo de ligação do antígeno, que se
ligam em hemaglutinina e neutralizam um subtipo do grupo 1 e
um subtipo do grupo 2 do vírus da influenza A. A invenção
também está relacionada aos ácidos nucleicos que codificam,
células B imortalizadas e célula plasmáticas simples
15 cultivadas que produzem, e aos epítopos que se ligam em tais
anticorpos e fragmentos de anticorpos. Além disso, a invenção
também está relacionada com o uso de os anticorpos,
fragmentos de anticorpos, e epítopos nos métodos de
varreduras bem como no diagnóstico, no tratamento e na
20 prevenção da infecção do vírus da influenza A.