



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

(21) PI 0720464-7 A2



(22) Data de Depósito: 17/12/2007
(43) Data da Publicação: 14/01/2014
(RPI 2245)

(51) Int.Cl.:
C12N 5/06
C07K 16/00
C07K 16/08

(54) Título: ANTICORPOS CONTRA
CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV)

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 20/06/2007 EP 07110693.4,
15/12/2006 EP PCT/EP2006/069780, 15/12/2006 EP
PCT/EP2006/069780, 20/06/2007 EP 07110693.4

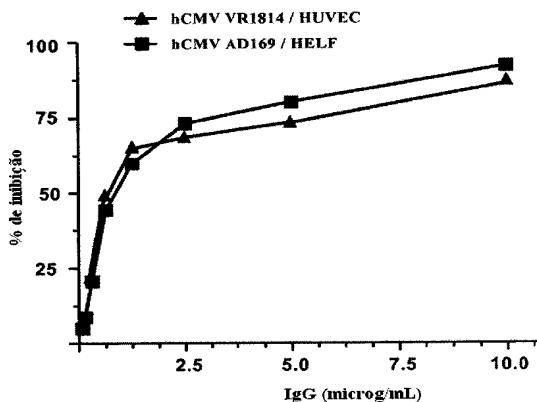
(73) Titular(es): Ribovax Biotechnologies SA

(72) Inventor(es): Ada Funaro, Giorgio Gribaudo, Santo Landolfo

(74) Procurador(es): Tavares Propriedade Intelectual
Ltda.

(86) Pedido Internacional: PCT EP2007064094 de
17/12/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2008/071806de
19/06/2008



Relatório Descritivo da Patente de Invenção
“ANTICORPOS CONTRA CITOMEGALOVÍRUS HUMANO
(HCMV)”.

CAMPO DA TÉCNICA

5 A invenção refere-se a novas sequências de anticorpos isolados de células B humanas tendo atividades biológicas específicas para um vírus que infectam células humanas.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

10 O Citomegalovírus Humano (hCMV) é um herpesvírus disseminado, altamente específico à espécie, que causa uma morbidade e mortalidade significativas em indivíduos imunossuprimido ou imunologicamente imaturos.

Muitas análises recentes analisam a biologia e
15 as manifestações clínicas do hCMV (Landolfo S et al., 2003; Gandhi M e Khanna R, 2004; Soderberg-Naucler C, 2006). Este patógeno viral contamina a maioria da população em todo o mundo e é adquirido na infância, seguindo o contato com um fluido corporal, pois o vírus entra através de células endoteliais e
20 células epiteliais do sistema alimentar ou respiratório superior, ou através do sistema urogenital. Soropositividade ao hCMV é mais prevalente em países subdesenvolvidos ou em áreas geográficas de baixa renda.

Seguindo uma infecção primária, o hCMV pode
25 persistir em células hospedeiras específicas da linhagem mielóide em um estado latente, replicando-se e disseminando-se em muitos

tipos diferentes de células (células hematopoéticas, células epiteliais, células endoteliais, ou fibroblastos) e escapando do sistema imunológico hospedeiro. A infecção por hCMV é geralmente assintomática em pessoas saudáveis, pois a infecção e a disseminação do hCMV é mantida sob controle pelo sistema imunológico, mas a limpeza total de hCMV é raramente obtida. Na realidade, o vírus hCMV desenvolveu mecanismos eficientes que permitem que o genoma viral permaneça em sítios selecionados em um estado latente.

10 Qualquer situação que enfraquece as funções imunológicas, como condições de estresse ou tratamentos médicos específicos, pode levar a reativação do hCMV. Manifestações clínicas de hCMV (como retinite, enterocolite, pneumotite, gastrite, ou hepatite) podem ocorrer após a infecção, reinfecção ou reativação viral primária. Cerca de 10% das crianças são infectadas com a idade de 6 meses, após a transmissão pelas suas mães através da placenta, durante o parto, ou pela amamentação.

20 O vírion do hCMV consiste de um nucleocapsídeo icosaedral que contém um genoma de DNA linear, de 230 kb, de cadeia dupla. A expressão do genoma de hCMV é controlada por uma complexa cascata de eventos transcricionais que levam à síntese de mais de 200 proteínas envolvidas em uma grande variedade de atividades biológicas envolvidas na infecção, latência e replicação viral (Britt W e Mach M, 1996).

As proteínas estruturais formam a membrana de vírion, que é extremamente complexa e ainda incompletamente indefinida. Esta inclui glicoproteínas que são homólogas de proteínas estruturais identificadas em outros herpesviridae e que podem formar complexos de proteína ligados por dissulfeto no interior do vírion: gCI (incluindo apenas gB), gCII (incluindo gM e gN) e gCIII (incluindo gH, gL e gO). Os genes gB, gH e gN também têm sido usados para genotipar linhagens de hCMV (Coaquette A et al., 2004; Dar L, 2007).

As glicoproteínas gN e gM são as mais abundantes e, juntas das gH e gB, têm sido mostradas como essenciais para a interação inicial entre a membrana de hCMV e a superfície da célula hospedeira, e conseqüentemente para a produção do hCMV infeccioso. Por esta razão, os compostos tendo como alvo gB, gH, gN e/ou gM podem inibir eficientemente a infecção por hCMV bloqueando a entrada de vírions circulantes de hCMV para o interior das células, seguida por infecção, reinfecção e reativação de hCMV.

O tratamento de infecções por hCMV é difícil porque há poucas opções terapêuticas disponíveis. Os compostos médicos atualmente disponíveis que inibem a replicação viral (Ganciclovir, Cidofivir, Foscarnet, Maribavir e outros fármacos em desenvolvimento) produzem um significativo aperfeiçoamento clínico, mas podem sofrer de pouca biodisponibilidade oral, baixa potência, a emergência de resistência do hCMV (devida a mutações nos alvos virais), e toxicidades que limitam as doses (De

Clercq E, 2003; Baldanti F e Gerna G, 2003; Gilbert C e Boivin G, 2005).

Novos meios para se prevenir e tratar a infecção por hCMV são necessários, especialmente para indivíduos imunologicamente comprometidos, em ambientes de transplantes, e na prevenção pré-natal. De fato, o hCMV é um patógeno oportunista clinicamente relevante em pacientes portadores de HIV e em receptores de transplante de órgãos, onde contribui para a perda de enxerto independentemente da rejeição de enxerto, resultando em morbidade e mortalidade (Puius Y e Snyderman D, 2007). O número crescente de receptores de medula óssea e de transplantes de órgãos sólidos aumentam a probabilidade das manifestações clínicas do hCMV, como a retinite por hCMV (Wiegand T e Young L, 2006). Além disso, o hCMV é a maior causa infecciosa de defeitos de nascimento (como perda da audição, desenvolvimento atrasado, ou retardamento mental) que se devem a uma infecção congênita ou pré-natal por hCMV transmitida por uma mãe infectada por hCMV (Griffiths P e Walter S, 2005).

Portanto, é importante fornecer fármacos para tratamentos preventivos, profiláticos, específicos para hCMV, por exemplo, para a prevenção de doença de hCMV em receptores de transplantes (Hebart H e Einsele H, 2004; Kalil A et al., 2005; Snyderman D, 2006), em pacientes desenvolvendo neuropatologias relacionadas a hCMV (Griffiths P, 2004) ou em gravidezes de risco (Schleiss M, 2003), para prevenir a transmissão vertical e a

infecção por hCMV que oferece risco de vida a fetos e recém-nascidos.

Além disso, composições farmacêuticas contra o hCMV podem ser úteis para o tratamento de outras, mais disseminadas doenças (como doenças autoimunes e cardiovasculares, ou alguns tipos de câncer), onde o hCMV é um possível co-fator e/ou pode ser reativado durante tratamentos imunossupressores. Por exemplo, o hCMV é agora um patógeno humano de importância crescente para distúrbios como complicações duradouras em invasividade de tumor ou evasão imunológica, como a infecção por hCMV pode ter efeitos oncomodulatórios na apoptose, diferenciação e migração celular. Em doenças auto-imunes ou vasculares, a infecção por hCMV pode alterar as reações inflamatórias e imunológicas (Cinatl J et al., 2004; Soderberg-Naucler C, 2006b).

Uma maneira alternativa para se prevenir a infecção por hCMV é a vacinação, no escopo de fornecer a proteção em um conjunto de populações pacientes de alto risco. No entanto, a correlação entre a vacinação e a resposta imunológica resultante não é integralmente entendida, e uma estratégia otimizada de vacina para hCMV (usando um específico antígeno candidato ou vacinas de vida atenuada) parece depender na população paciente escolhida como alvo para a proteção. Portanto, estratégias de vacinação profilática ainda estão sob avaliação (McLean G et al., 2006; Schleiss M, 2005).

Em vista das presentes limitações de estratégias farmacológicas para infecções por hCMV, o conhecimento crescente da relação hCMV-hospedeiro – e em particular na resposta imunológica específica ao hCMV – tornam as terapias com base imunológica boas alternativas para substituir, ou complementar, terapias existentes para o tratamento bem-sucedido de complicações associadas ao hCMV (Ghandhi M e Khanna R, 2004). Recentemente, uma proteção duradoura do curso letal da infecção por CMV em ratos imunodeficientes foi obtida pela transferência de células B de memória específicas ao vírus, sugerindo que tais células possam ter uma utilidade terapêutica (Klenovsek K et al., 2007).

Uma alternativa mais fácil para terapias baseadas em células pode ser a imunoterapia passiva, consistindo na administração a indivíduos de composições farmacêuticas compreendendo anticorpos terapêuticos com uma atividade neutralizante definida contra um antígeno viral ou humano (por exemplo, o hCMV).

Esta abordagem terapêutica foi projetada nas características biológicas e de ligação de antígenos de anticorpos e fragmentos de anticorpos dirigidos contra alvos terapêuticos virais ou humanos (Dunman P e Nesin M, 2003; Keller M e Stiehm E, 2000). A imunoterapia passiva foi introduzida na prática clínica, expandindo rapidamente as oportunidades para o tratamento de uma ampla variedade de doenças (incluindo doenças infecciosas, doenças imunologicamente mediadas, e

câncer). Esta abordagem por ser particularmente eficaz em pacientes cujos sistemas imunológicos são incapazes de produzir anticorpos nos volumes e/ou com a especificidade necessária para bloquear e/ou eliminar a molécula alvejada (Chatenoud L, 2005; 5 Laffly E e Sodoyer R, 2005).

No campo da terapia para hCMV, esta abordagem é executada através da administração intravenosa de preparações de imunoglobulina humana que são obtidas através da combinação de plasma humano com altas concentrações de anticorpos anti-hCMV, e comercializada para usos clínicos (sob o nome de Cytotect ou CytoGam). No entanto, estes produtos são apenas uma solução parcialmente satisfatória para bloquear a infecção por hCMV. Na realidade, este tratamento é usado em pacientes com imunidade comprometida, principalmente para 10 tratamento preventivo e profilático onde antivirais são frequentemente co-administrados (Marasco W e Sui J, 2007; Nigro G et al., 2005; Bonaros N et al., 2004; Kocher A et al., 2003; Kruger R et al., 2003). Além disso, questões de segurança e a escassez de tais preparações são uma preocupação crescente, 15 como relatado na literatura (Bayry J et al., 2007; Hamrock D, 2006).

Os anticorpos humanos recombinantes que têm alta afinidade com antígenos expressos na membrana de hCMV e são capazes de neutralizar a infecção representariam fármacos 25 mais apropriados para a imunização passiva. Na realidade, muitas das glicoproteínas de hCMV evocam fortes respostas

imunológicas do hospedeiro, incluindo a produção de anticorpos neutralizantes de vírus, ainda que a estequiometria das proteínas da membrana sejam variáveis e possam ser alteradas para escapar da resposta imunológica do hospedeiro. Esta resposta é considerada como sendo um componente chave da imunidade do hospedeiro e representa uma meta tanto para o desenvolvimento do anticorpo quando da vacina.

Anticorpos humanos monoclonais são os anticorpos mais preferíveis para aplicações clínicas, devido às limitações intrínsecas de anticorpos monoclonais murinos. No entanto, o desenvolvimento de anticorpos humanos previamente identificados para o tratamento de hCMV (Matsumoto Y et al., 1986) foi interrompido, pois nenhum benefício clínico foi observado em estudos que avaliaram a eficácia de tais anticorpos, por exemplo, em transplantes hematopoéticos de células germinais (Boeckh M et al., 2001), ou em retinites (Gilpin A et al., 2003). Estas tentativas falhas justificam os estudos posteriores focados na seleção de anticorpos humanos monoclonais que neutralizem com maior eficiência a ampla variedade de linhagens de hCMV. O tratamento de infecções por CMV teria o benefício de ter composições farmacêuticas mais fortes compreendendo anticorpos humanos monoclonais que são purificados a partir de células B humanas mantidas em cultura ou produzidas como proteínas recombinantes que são expressas por seqüências humanas introduzidas nas linhas celulares de mamíferos.

REVELAÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção fornece novas sequências de anticorpos que ligam e neutralizam o hCMV, e que podem ser usadas para detectar, tratar, inibir, prevenir e/ou atenuar uma
5 infecção por hCMV ou uma doença relacionada a hCMV.

Células B humanas foram obtidas de um indivíduo soropositivo a hCMV e imortalizadas. A população policlonal de células B humanas imortalizadas foi dividida para gerar subculturas que foram testadas para a presença de
10 anticorpos (Imunoglobulinas G, IgG) na cultura celular sobrenadante neutralizando a infectividade por hCMV *in vitro*. Em particular, o tipo de atividade neutralizante, o isotipo, e a clonalidade foram determinados para o anticorpo secretado pela subcultura nomeada 26A1. O anticorpo foi purificado em
15 afinidades tanto com a cultura celular sobrenadante original quanto como um anticorpo humano monoclonal recombinante, confirmando a atividade neutralizante específica ao hCMV usando modelos *in vitro* para a infecção por hCMV. Este anticorpo pode ser usado para caracterizar antígenos neutralizante
20 na membrana de hCMV.

As sequências de DNA que codificam as regiões variáveis do anticorpo secretado pela subcultura 26A1 foram amplificadas, clonadas, e seqüenciadas. As sequências de proteína correspondentes foram analisadas para identificar as Regiões de
25 Determinação de Complementaridade (CDRs) que são responsáveis pela atividade biológica específica ao hCMV. Estas

sequências podem ser usadas para produzir proteínas tendo propriedades de ligação e neutralização específicas para hCMV, na forma de anticorpos completos, fragmentos de anticorpos, ou qualquer outro formato de proteína funcional (por exemplo, 5 peptídeos bioativos, proteínas de fusão) usando tecnologias apropriadas para produzir proteínas recombinantes.

As composições tendo utilidade terapêutica, profilática e/ou diagnóstica na administração de infecção por hCMV e distúrbios relacionados a hCMV podem ser preparadas 10 usando-se as proteínas da invenção, tanto como proteínas recombinantes quanto como anticorpos naturais purificados de culturas celulares originadas a partir da subcultura 26A1. Tais composições podem ser usadas para suplementar ou substituir os tratamentos de hCMV atuais baseados em compostos antivirais 15 e/ou preparações intravenosas de imunoglobulinas (IVIg).

Modalidades adicionais da presente invenção serão fornecidas na Descrição Detalhada a seguir.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

Figura 1: (A) Representação esquemática do 20 antígeno CG3 que foi agregado e usado em um teste ELISA específico a gB como descrito na literatura (Rothe M et al., 2001). A fusão de interlinhagens recombinantes do antígeno CG3 corresponde a uma combinação do gB Domínio Antigênico 2 (AD2; SEQ ID NO: 1 e 2) a partir das linhagens de hCMV 25 AD169 (SwissProt Acc. No. P06473; aminoácidos 27-84) e Towne (SwissProt Acc. No. P13201; aminoácidos 27-84). A

região AD2 contém um sítio (aminoácidos 70-81, sublinhado) que é conservado em diferentes linhagens virais e que foi mostrado como sendo reconhecido por neutralizar anticorpos (Qadri I et al., 1992; Kropff B et al., 1993). (B) Representação esquemática do antígeno gH incluído na proteína de fusão gH(Ag)-GST usada para o teste ELISA específico a gH. O antígeno recombinante gH(Ag)-GST corresponde a uma fusão em quadro entre a região terminal do amino gH (aminoácidos 16-144; SEQ ID NO: 3) da linhagem de hCMV VR1814 (Revello M et al., 2001) e Glutathione-S-Transferase (GST). A extensão de amino de gH contém um sítio de ligação de anticorpos linear (aminoácidos 34-43; sublinhado) que é reconhecido por neutralizar anticorpos (Urban M et al., 1992).

Figura 2: panorama do processo de seleção para identificar e caracterizar subculturas (poços) que contêm anticorpos IgG ligando e neutralizando o hCMV. As subculturas foram obtidas imortalizando-se células B de um paciente portador do hCMV (CMV7) usando-se o processo de imortalização baseado em EBV revelado em PCT/EP2005/056871. Os sobrenadantes que mostraram atividade neutralizante foram, então, tamisados usando-se um ELISA específico a gB e GH. O número de poços positivos para cada teste de tamisação é indicado nos ovais de cor cinza.

Figura 3: a atividade neutralizante de hCMV do anticorpo natural 26A1, conforme purificado por cromatografia com afinidade usando-se a Proteína A do sobrenadante de cultura

celular derivada da subcultura 26A1 mantida em um meio isento de soro. A curva responsiva à dose foi executada no teste de neutralização de hCMV incluindo tanto fibroblastos embriônicos humanos (HELFI) juntos da linhagem de hCMV AD169 (1,000 5 PFU/reação; IC50 0.82 µg/ml), ou células endoteliais de veia de cordão umbilical humano (HUVEC) junto com a linhagem de hCMV VR1814 (1,000 PFU/reação; IC50 0.67 µg/ml).

Figura 4: Atividade de ligação específica a (A) gH(Ag) e (B) antígeno CG3 de sobrenadantes contendo IgG a 10 partir de subculturas de células B humanas imortalizadas. O ELISA foi executado usando-se apenas o meio de cultura celular (meio, controle negativo), ou o sobrenadante das subculturas 26A1, IF7 (identificadas nas células imortalizadas obtidas do doador de CMV5, como descrito no pedido de patente 15 EP07111741), e 8C10 (identificada nas células imortalizadas obtidas do doador de CMV7, como descrito no pedido de patente EP07115410). A linha pontilhada representa o valor limiar (O.D. = 0.1) para se considerar positiva uma subcultura.

Figura 5: (A) Alinhamento do DNA (caso mais 20 baixo, 393 pares de base) e da sequência consensual de proteína (caso mais alto, 131 aminoácidos) da região variável para a cadeia pesada de 26A1 IgG (VH 26A1; SEQ ID NO: 4 e 5). (B) A sequência consensual de proteína para VH 26A1 com a indicação dos CDRs previstos (HCDR1, HCDR2 e HCDR3; sublinhado; 25 SEQ ID NO: 6, 7 e 8). Os aminoácidos alternativos que foram codificados pelas sequências de DNA clonadas em plasmida de *E.*

coli transformantes isolados são indicados abaixo da sequência consensual de proteína.

Figura 6: (A) Alinhamento do DNA (caso mais baixo, 330 pares de base) e da sequência consensual de proteína (caso mais alto, 110 aminoácidos) da região variável para a cadeia leve de 26A1 IgG (VH 26A1; SEQ ID NO: 9 e 10). (B) A sequência consensual de proteína para VL 26A1 com a indicação de CDRs previstos de VL 26A1 (LCDR1, LCDR2, e LCDR3; sublinhado; SEQ ID NO: 11, 12 e 13).

10 Figura 7: Alinhamento do DNA (caso mais baixo, 1449 pares de base; SEQ ID NO: 14) e sequência consensual de proteína (caso mais alto, 482 aminoácidos) da pesada cadeia de anticorpos monoclonais humanos recombinantes 26A1 (SEQ ID NO: 15). O mais provável sítio de clivagem para 15 peptídeos de sinal é entre as posições 19 e 20 (VLS-QV), como determinado usando-se o programa de previsão online SignalP 3.0 (Bendtsen J et al., 2004). A sequência original identificada no cDNA gerado das células na subcultura 26A1 está sublinhada (ver Fig. 5). Os aminoácidos 153-482 correspondem à região constante 20 da cadeia pesada do IgG1 humano (SwissProt Acc. No. P01857).

Figura 8: Alinhamento do DNA (caso mais baixo, 705 pares de base; SEQ ID NO: 16) e sequência consensual de proteína (caso mais alto, 234 aminoácidos) da cadeia pesada do recombinante humano 26A1 IgG (SEQ ID NO: 25 17). O mais provável sítio de clivagem para peptídeos de sinal é entre as posições 16 e 17 (CTG-SV), como determinado usando-

se o programa de previsão online SignalP 3.0 (Bendtsen J et al., 2004). A sequência original identificada em células da subcultura 26A1 está sublinhada (ver Fig. 5). Os aminoácidos 1-19 e 131-234 correspondem a 1-19 e 131-234 da cadeia lambda do Ig humano (SwissProt Acc. No. Q8N355).

Figura 9: A atividade neutralizante de hCMV do anticorpo humano recombinante 26A1 comparada ao anticorpo natural de Proteína A-purificado 26A1. A atividade foi testada usando-se células HELF e a linhagem de hCMV AD16 em um teste de microneutralização (A; 1000 PFU/reação, 72 horas pós-infecção) ou em um teste de redução de placa (B).

Figura 10: A atividade neutralizante do hCMV do anticorpo humano monoclonal recombinante 26A1 comparada ao anticorpo natural de Proteína A-purificado. A atividade foi testada usando-se células humanas HUVEC e a linhagem de hCMV VR1814 em um teste de microneutralização (A; 1000 PFU/reação), ou usando-se células humanas HELF e a linhagem de hCMV AL-1 em um teste de redução de placa (B; 1000 PFU/reação).

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Os métodos descritos em PCT/EP2005/056871 permitem a imortalização eficiente de células B humanas específicas a isotipo obtidas de um indivíduo, cujo sangue contém anticorpos tendo atividades biológicas (por exemplo, a ligação e/ou a neutralização de um alvo humano ou viral), no escopo de obter populações policlonais de células que secretam anticorpos

apresentando tais atividades biológicas. Testes de tamisação extensivos podem, então, ser executados usando-se sobrenadantes de subculturas obtidas através destes métodos seguindo um único passo de clonagem a uma baixa densidade celular (por exemplo, 5 50, 20 células ou menos por poço). Dessa maneira, é possível obter populações policlonais de células B imortalizadas nas quais um grande repertório de subculturas que secretam o IgG pode ser caracterizado e conseqüentemente um número de IgG humanos monoclonais tendo a especificidade de ligação desejada para 10 antígenos e/ou a atividade biológica pode ser identificado.

No presente caso, uma população policlonal de células B humanas imortalizadas, que secretam o IgG, foi obtida do sangue de um paciente com hCMV cujo soro apresentou, como atividade biológica, uma forte atividade neutralizante de 15 hCMV. A população policlonal foi usada para gerar, em um único passo de subclonagem a 20 células por poço e em condições apropriadas de cultura, milhares de subculturas que continham células B humanas imortalizadas. A atividade biológica específica, então, foi testada no sobrenadante de centenas de 20 culturas celulares de crescimento eficiente no escopo de selecionar aquelas que apresentavam a atividade mais forte, e então se determinando o isotipo e, se possível, o epítotope do anticorpo secretado.

Uma das subculturas mais promissoras, 25 nomeada 26A1, foi usadas tanto para purificar o anticorpo humano natural de culturas de larga escala quanto para isolar o

DNA codificando tal anticorpo das células B imortalizadas. A sequência de DNA foi usada para produzir o anticorpo natural humano como um anticorpo humano recombinante. O anticorpo monoclonal humano recombinante 26A1 e o natural foram usados para a execução de testes biológicos mais extensivos e para a determinação de sua utilidade potencial em aplicações clínicas relacionadas a hCMV.

Os exemplos mostram como o sobrenadante de cultura celular, o anticorpo humano natural, e o anticorpo humano recombinante apresentam a mesma atividade biológica determinada no soro sanguíneo original e na população policlonal de células C humanas imortalizadas EBV. Estas evidências confirmam que os métodos descritos em PCT/EP2005/056871 permitem a identificação, a caracterização, e a produção de anticorpos humanos monoclonais recombinantes e naturais, específicos a isotipo, biologicamente ativos. Na realidade, o processo completo de crescimento e imortalização celular em condições de cultura celular dá acesso ao repertório de anticorpos humanos em uma maneira direta, eficiente e rápida. Além disso, as células resultadas do processo podem ser congeladas e tamisadas em um momento diferente, ou em paralelo, para diferentes atividades biológicas e/ou antígenos.

Em uma modalidade, a presente invenção fornece proteínas compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência do HCDR3 (CDR3 da região variável de cadeia pesada) do anticorpo de 26A1 (SEQ ID

NO: 8). Junto com o HCDR1 e o HCDR2 (SEQ ID NO: 6 e SEQ ID NO: 7), este HCDR3 é incluído na região variável da cadeia pesada do anticorpo 26A1 (VH 26A1; Fig. 5; SEQ ID NO: 5). Esta sequência é codificada pela sequência de DNA (Fig. 5A; SEQ ID NO: 4) que foi ampliada e clonada usando-se células obtidas da subcultura original que secreta o anticorpo 26A1. Portanto, uma proteína da invenção pode conter, junto com o HCDR3 do anticorpo 26A1 (SEQ ID NO: 8), a sequência do HCDR1 (SEQ ID NO: 6) e/ou do HCDR2 (SEQ ID NO: 7) do anticorpo 26A1 (Fig. 5B). Tal proteína pode compreender uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade com a sequência inteira da região variável da cadeia pesada do anticorpo 26A1.

O anticorpo 26A1 também contém uma região variável de uma cadeia leve para a qual, usando-se a mesma abordagem, as sequências de DNA (SEQ ID NO: 9) e de proteína (SEQ ID NO: 10), juntas com os LCDRs específicos (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13), foram determinadas (Figura 6). Portanto, uma proteína da invenção pode adicionalmente compreender uma ou mais sequências selecionadas do grupo consistindo de únicos LCDRs do anticorpo 26A1 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13), os quais podem ser fornecidos como uma sequência de proteína compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade com a VL 26A1 (Fig. 6B; SEQ ID NO: 10). Isto se aplica em particular quando um anticorpo humano recombinante, compreendendo tanto a sequência natural VL 26A1 quanto a VH

26A1 como cadeias pesadas e leves (na conformação natural de um completo tetramérico compreendendo duas cadeias pesadas e duas cadeias leves, ou uma única proteína como variante recombinante do anticorpo natural), é desejado.

5 Onde quer que um nível de identidade seja indicado, este nível de identidade deve ser determinado na extensão integral da sequência relevante da invenção.

 O HCDR3 do anticorpo 26A1 pode ser considerado como caracterizando a porção de ligação de
10 antígenos de um anticorpo humano específico que é capaz de ligar e neutralizar o hCMV, como mostrado nos Exemplos. Ainda que muitos ou todos os CDRs de um anticorpo sejam geralmente requisitados para a obtenção de uma superfície de ligação de antígenos, o HCDR3 é o CDR que mostra a maior diferença entre
15 os anticorpos não apenas no que diz respeito a sequência mas também com respeito a extensão. Tais diversidades são componentes fundamentais de regiões de ligação para o reconhecimento de essencialmente qualquer antígeno pelo sistema imunológico humoral (Xu e David, 2000; Barrios Y et al., 2004;
20 Bond C et al., 2003). Alternativamente, combinações de CDRs podem ser ligadas umas às outras em proteínas muito curtas que retêm as propriedades originais de ligação, como recentemente analisado (Ladner R, 2007).

 Portanto, as proteínas neutralizantes de hCMV
25 podem ser geradas usando-se o HCDR3 do anticorpo 26A1 como componente de ligação de hCMV, em combinação ou não com

outros CDRs do anticorpo 26A1, que pode ser expresso no interior de uma estrutura de proteína de anticorpo (Knappik A et al., 2000), ou no interior de uma estrutura de proteína sem relação com anticorpos (Kiss C et al., 2006).

5 A região variável das cadeias leve e pesada formando o anticorpo 26A1 (ou porções selecionadas, como HCDRs e LCDRs isolados) pode ser incluída em qualquer outro formato de proteína para fragmentos de anticorpos funcionais, como descrito na literatura sob diferentes nomes como Scfv
10 (variável de fragmento de cadeia única), Fab (heterodímero de cadeia pesada/leve variável), diacorpo, peptacorpo, VHH (domínio variável de anticorpo de cadeia pesada), cadeias pesadas ou leves isoladas, anticorpos biespecíficos, e outras variantes de anticorpos engenhadas para aplicações não-clínicas (Jain M et al.,
15 2007; Laffy E e Sodoyer R, 2005).

 Anticorpos alternativos podem ser gerados usando-se as sequências do anticorpo 26A1 através de um processo de rearranjo de domínio variável de cadeia leve (VL). Na realidade, muitos anticorpos diferentes podem ser gerados e
20 testados para atividades específicas a hCMV usando-se um único domínio variável de cadeia pesada VH (como o do anticorpo 26A1) combinado com uma biblioteca de domínios VL, no escopo de determinar combinações VH/VL com propriedades aperfeiçoadas em termos de afinidade, estabilidade, e/ou produção
25 recombinante (Ohlin M et al., 1996; Rojas G et al., 2004; Watkins N et al., 2004).

Novas abordagens para o desenvolvimento de novos peptídeos bioativos também mostraram a viabilidade de se sintetizar peptídeos derivados de CDR que contêm L-aminoácidos e/ou D-aminoácidos, que mantêm a atividade original, e que
5 podem ter um perfil farmacológico mais apropriado (Smith J et al., 1995; Levi M et al., 2000; Wijkhuisen A et al., 2003).

Portanto, o HCDR3 do anticorpo 26A1, assim como sequências altamente similares com o HCDR3 do anticorpo 26A1, proteínas de fusões que os contêm, e peptídeos sintéticos
10 derivados dos mesmos (por exemplo, contendo L-aminoácidos, D-aminoácidos, na conformação normal ou retro-inversa), podem ser testados e usados como proteínas neutralizantes e de ligação de hCMV.

Além disso, sabe-se que anticorpos podem ser
15 modificados em posições específicas a fim de se ter anticorpos com características aperfeiçoadas, em particular para aplicações clínicas (como melhor perfil farmacocinético ou maior afinidade para um antígeno). Estas mudanças podem ser feitas nos CDRs e/ou na estrutura do anticorpo 26A1 e a sequência pode ser
20 escolhida aplicando-se qualquer das tecnologias dedicadas para o projeto racional de anticorpos que faz uso de maturação de afinidade e outros processos (Kim S et al., 2005; Jain M et al., 2007).

As proteínas da invenção podem ser fornecidas
25 como anticorpos em geral, como anticorpos monoclonais humanos integrais tendo um isotipo específico. O isotipo IgG, por

exemplo, é o formato de anticorpo de quase todos os anticorpos terapêuticos aprovados (Laffy E e Sodoyer R, 2005). No entanto, porções de ligação de antígenos isoladas de um IgG1 neutralizante de hCMV foram transferidas em uma sequência IgA humana e o anticorpo resultante é capaz de inibir a infecção por HIV também (Mantis N et al., 2007).

A proteína da invenção também pode ser fornecida como fragmentos de anticorpos, peptídeos bioativos, ou proteínas de fusão. Todas estas moléculas alternativas devem manter, se não realçar, as propriedades neutralizantes e de ligação de hCMV originais que foram determinadas para o anticorpo 26A1. No caso de proteínas de fusão, as sequências de proteína heterólogas podem ser localizadas na posição terminal C ou N para a sequência derivada do 26A1, sem afetar a expressão correta e a atividade biológica do componente específico a hCMV (por exemplo, um fragmento de anticorpo).

O termo "sequência de proteína heteróloga" indica uma sequência de proteína que não é naturalmente presente na posição terminal C ou N para o componente específico a hCMV (por exemplo, um fragmento de anticorpo). A sequência de DNA que codifica essa proteína é geralmente fundida por tecnologias recombinantes de DNA e compreende uma sequência que codifica pelo menos 5 aminoácidos.

Tal sequência de proteína heteróloga é geralmente escolhida para fornecer propriedades adicionais ao fragmento de anticorpo específico a hCMV para diagnóstico

específico e/ou usos terapêuticos. Exemplos de tais propriedades adicionais incluem: melhores meios para detecção e purificação, componentes adicionais de ligação ou ligas biológicas, ou modificação pós-translacional de uma proteína de fusão (por exemplo, fosforilação, glicosilação, ubiquinação, SUMOilação, ou clivagem endoproteolítica).

Alternativamente (ou adicionalmente à fusão com uma sequência de proteína heteróloga), a atividade de uma proteína da invenção pode ser aperfeiçoada com a conjugação com compostos diferentes como agentes terapêuticos, estabilizantes, ou diagnósticos. Exemplos destes agentes são rótulos detectáveis (por exemplo, um radioisotopo, um composto fluorescente, uma toxina, um átomo de metal, um composto quimiluminescente, um composto bioluminescente, ou uma enzima) que podem ser ligados usando-se ligantes químicos ou polímeros. A atividade biológica específica a hCMV pode ser aperfeiçoada pela fusão com outra proteína terapêutica, como uma proteína ou um polímero que altere o metabolismo e/ou a estabilidade em aplicações terapêuticas ou diagnósticas.

Meios para se escolher e se projetar componentes de proteína, ligas, e ligantes apropriados, assim como métodos e estratégias para a construção, purificação, detecção e uso de proteínas de fusão são fornecidos na literatura (Nilsson J et al., 1997; "Application of Chimeric Genes and Hybrid Proteins" *Methods Enzymol.* Vol. 326-328, Academic Press, 2000; WO 01/77137) e estão comumente disponíveis em

laboratórios clínicos e de pesquisa. Por exemplo, a proteína de fusão pode conter sequências reconhecidas por anticorpos comerciais (incluindo etiquetas como etiquetas de polihistidina, FLAG, c-Myc, ou HA) que podem facilitar a identificação *in vivo* e/ou *in vitro* da proteína de fusão, ou sua purificação.

Outras sequências de proteína podem ser identificadas pela análise direta de fluorescência (como no caso da Proteína Verde Fluorescente), ou por enzimas e substratos específicos (por exemplo, usando-se sítios proteolíticos). A estabilidade de anticorpos específicos a hCMV, fragmentos de anticorpos, peptídeos bioativos, e proteínas de fusão pode ser aperfeiçoada com a fusão com uma proteína transportadora, como a proteína de revestimento de fago (cp3 ou cp8), Proteína de Ligação de Maltose (MBP), Albumina de Soro Bovino (BSA), ou Glutathione-S-Transferase (GST).

O antígeno de hCMV específico que é reconhecido pelo anticorpo 26A1 não foi determinado usando-se um painel de epítopes neutralizantes de hCMV conhecidos em antígenos virais (ver Fig. 1, 2 e 4). Conseqüentemente, este anticorpo IgG pode ser usado para definir um epítopo neutralizante de hCMV e as proteínas que ligam tal antígeno (por exemplo, na forma dos anticorpos, fragmentos de anticorpos, peptídeos bioativos, proteína de fusão, ou quaisquer proteínas naturais/recombinantes) que deve ser capaz de neutralizar a infecção por hCMV através do reconhecimento de tal epítopo.

No passado, os testes ELISA e Western Blot que usavam proteínas truncadas específicas a hCMV ou peptídeos sintéticos também foram usados (Greijer A et al., 1999; Ohlin M et al., 1993) e dessa maneira os anticorpos direcionados a hCMV foram definidos de acordo com seus antígenos, sendo glicoproteína H (WO 94/16730, WO 94/09136, WO 92/11018), glicoproteína B (EP248909, WO 93/21952) ou glicoproteína M/glicoproteína N (Shimamura M et al., 2006). Além disso, outros componentes do vírion de hCMV não apenas afetam o tropismo viral, mas podem ser alvos de anticorpos neutralizantes de hCMV, tal como no caso do pUL130 e pUL128 (Wang D e Shenk T, 2005). Assim, o antígeno/epítipo CMV reconhecido pelos anticorpos 26A1 pode ser identificado por diferentes ensaios *in vitro* baseados na literatura citada acima.

Uma modalidade adicional da presente invenção é o anticorpo IgG1 humano secretado pela subcultura 26A1, o qual pode ser fornecido como um anticorpo natural a Proteína A purificada que aglutina e neutraliza hCMV. Este anticorpo IgG1 pode ser usado para identificar proteínas concorrentes que também podem aglutinar e neutralizar hCMV. Proteínas similares são fornecidas na descrição acima e nos Exemplos, em particular como anticorpos humanos recombinantes e fragmentos de anticorpos.

O mecanismo de neutralização do hCMV, que está associado ao epítipo viral reconhecido pelo anticorpo 26A1 e as outras proteínas definidas acima, pode ser caracterizado usando

os ensaios disponíveis para proteínas e/ou cepas hCMV estruturais específicas, como mostrado na literatura usando painéis de soro humano (Navarro D e outros, 1997; Klein M e outros, 1999; Weber B e outros, 1993; Rasmussen L e outros, 5 1991; Marshal G e outros, 2000) ou de anticorpos monoclonais (Schppel K e outros, 1996; Simpson J e outros, 1993; Gicklhorn D e outros, 2003).

Ácidos nucléicos são objetos adicionais das invenções codificando qualquer de anticorpos, fragmentos de 10 anticorpos, proteínas de fusão, peptídeos bioativos, ou HCDRs isolados e LCDRs definidos acima. Os exemplos fornecem tais sequências em particular como codificação das regiões variáveis completas das cadeias pesada (SEQ ID No.:4) e leve (SEQ ID No.:9) do 26A1 (Figuras 5A e 6A). Estas sequências de DNA (ou 15 partes selecionadas, tais como aquelas codificando os HCDRs e LCDRs específicos, Figuras 5 e 6) podem ser transferidas em vetores para expressá-las em um dos formatos alternativos para anticorpos (por exemplo, completo, maturado por afinidade, ou CDR-enxertado ou fragmentos de anticorpo) ou proteínas de 20 fusão. Estes ácidos nucléicos podem compreender uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade com SEQ ID No.:4, com ou sem uma sequência adicional compreendendo uma sequência tendo pelo menos 90% de identidade com SEQ ID No.:9, dependendo de, se sequências apenas da cadeia pesada de 26A1 25 ou se ambas as cadeias pesada e leve são necessárias.

Quando um anticorpo inteiramente humano é desejável, o anticorpo poderia adicionalmente compreender uma região constante de cadeia pesada selecionada do grupo que consiste de regiões constantes IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA e IgE. Preferencialmente, a região constante de cadeia pesada é um IgA, IgG1 (como no anticorpo 26A1 natural caracterizado a partir da subcultura 26A1), IgG2, ou IgG4 humano. As sequências de ácido nucléico codificando regiões variáveis completas de cadeias pesadas e leves de 26A1 têm sido clonadas e caracterizadas por meio de reações PCR e vetores contendo produtos resultantes de PCR, as quais têm usado para transformar células *E coli*. Tais sequências podem ser transferidas (em parte ou integralmente) para outro vetor, em particular na expressão cassette de um vetor ou de vetores distintos onde eles são ligados operavelmente a sequências regulatórias apropriadas (por exemplo, promotores, terminadores de transcrição).

O anticorpo monoclonal 26A1 humano, ou quaisquer outras sequências de proteínas derivadas de tal anticorpo, podem ser expressas como uma proteína recombinante usando tais vetores para transformar a célula hospedeira apropriada. As células hospedeiras compreendendo os ácidos nucléicos da invenção podem ser células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas e poderiam permitir a secreção das proteínas recombinantes desejadas. Métodos para produção de tais proteínas incluem, cultivar células hospedeiras transformadas com os vetores de expressão compreendendo suas sequências de

código sob condições adequadas para expressão da proteína e recuperação da proteína da cultura da célula hospedeira. Os vetores poderiam incluir um promotor, um sítio aglutinador ribossoma (se necessário), os códons de início/fim, e a sequência de líder/secreção, que pode dirigir a expressão de um transcrito mono ou bicistrônico para a proteína desejada. Os vetores poderiam permitir a expressão das proteínas recombinantes nas células hospedeiras procarióticas e eucarióticas. Uma linhagem de células substancialmente enriquecidas em tais células pode então ser isolada para fornecer uma linhagem de células estável.

Os ácidos nucléicos e células hospedeiras podem ser usados para produzir uma proteína da invenção pela aplicação de tecnologias de DNA recombinante comuns. Brevemente, as sequências de DNA desejadas podem ser ou extraídas pela digestão do vetor de clonagem inicial com enzimas de restrição, ou amplificadas usando o tal vetor como um padrão para uma Reação de Cadeia Polimerase (PCR) e os primers PCR para ampliação específica de regiões integralmente variáveis das cadeias pesadas e leves ou apenas partes delas (por exemplo, a sequência HCDR3). Estes fragmentos de DNA podem então ser transferidos para vetores mais apropriados para a expressão dentro de células hospedeiras procarióticas e eucarióticas, como descrito em livros e revisões de como clonar e produzir proteínas recombinantes, incluindo títulos da série “A Practical Approach” publicada pela Oxford Univ. Press (“DNA Cloning 2: Expression Systems”, 1995; “DNA Cloning 4: Mammalian Systems”, 1996;

“Protein Expression”, 1999; “Protein Purification Techniques”, 2001).

Para hospedeiros eucarióticos (por exemplo, leveduras, células de insetos ou mamíferos), diferentes sequências regulatórias transcricionais e translacionais podem ser empregadas, dependendo da natureza do hospedeiro. Elas podem ser derivadas de fontes virais, tais como adenovírus, vírus Papilloma bovino, vírus Simian ou semelhantes, onde os sinais regulatórios são associados com um gene particular que tem um alto nível de expressão. Exemplos são o promotor TK do vírus Herpes, o promotor precoce SV40, o promotor de gene levedura gal4, etc. Os sinais regulatórios de iniciação transcricional podem ser selecionados o que permite a repressão e ativação transiente (ou constitutiva) e a modulação da expressão do gene.

A sequência codificando a proteína recombinante pode ser adaptada e reclonada para fazer modificações no nível de DNA apenas àquelas podem ser determinadas, por exemplo, usando software para selecionar a sequência de DNA na qual a utilização do códon e os sítios de restrição são os mais apropriados para clonar e expressar uma proteína recombinante em vetores específicos e células hospedeiras (Grote A e outros, 2005; Carton J e outros, 2007).

Durante etapas adicionais de clonagem, sequências de proteína podem ser adicionadas em conexão ao formato de anticorpo desejado (Scfv, Fab, fragmento de anticorpo, anticorpo inteiramente humano, etc.), ou a inserção,

substituição, ou eliminação de um ou mais amino ácidos internos. Estas tecnologias podem também ser usadas para caracterização estrutural e funcional adicional e otimização das propriedades terapêuticas das proteínas em geral, e dos anticorpos em particular
5 (KIM S e outros, 2005), ou para gerar vetores permitindo sua distribuição estável *in vivo* (Fang J e outros, 2005). Por exemplo, anticorpos recombinantes também podem ser modificados no nível de estrutura e/ou atividade pela escolha de uma região Fc específica para ser fundida às regiões variáveis (Furebring C e
10 outros, 2002; Logtenberg T, 2007), pela geração de cadeia simples de fragmentos de anticorpos (Gilliland L e outros, 1996), e pela adição de sequências de peptídeo estabilizantes, (WO 01/49713), polímeros ou rádioquímicos para resíduos modificados quimicamente (Chapman A e outros, 1999).

15 O código de sequência de DNA para proteína recombinante, uma vez inserido não homologamente ou homologamente em um epissômico adequado ou vetor integrador, pode ser introduzido em células hospedeiras apropriadas por um meio adequado (transformação, transfecção, conjugação, fusão
20 protoplástica, eletroporação, precipitação cálcio fosfato, micro-injeção direta, etc.) para transformá-las. Fatores importantes a serem considerados quando selecionando um vetor particular incluem: a facilidade com que células hospedeiras que contém o vetor podem ser reconhecidas e selecionadas, o número de cópias
25 desejado do vetor, e se o vetor é capaz de “transportar” entre células hospedeiras de diferentes espécies.

As células que têm sido transformadas estavelmente pela introdução de DNA podem ser selecionadas por também introduzir um ou mais marcadores que permitem a seleção de células hospedeiras que contém o vetor de expressão.

- 5 O marcador pode também propiciar resistência biocida por fototrofia para um hospedeiro auxotrófico, por exemplo, antibióticos, ou metais pesados tal como cobre, ou semelhantes, e pode ser separável ou reprimido se necessário. O gene marcador selecionável pode tanto ser diretamente ligado a sequências de
- 10 DNA do gene para ser expresso, como introduzido na mesma célula por co-transfecção. Elementos reguladores transcricionais adicionais também podem ser necessários para expressão ótima.

- As células hospedeiras podem ser ou procarióticas ou eucarióticas. Entre as células hospedeiras
- 15 procarióticas, as pditas são *B. subtilis* e *E. coli*. Entre as células hospedeiras eucarióticas, as pditas são leveduras, células de insetos ou mamíferos. Em particular, células tais como de humanos, macacos, camundongos, insetos (usando sistemas de expressão baseado em baculovírus) e células de Ovário de
- 20 Hamster Chinês (CHO) (como mostrado nos exemplos), fornecem modificações pós-translacionais às moléculas de proteína, incluindo correto enovelamento ou certas formas de glicosilação em sítios corretos. As células de levedura também podem realizar modificações peptídeo translacionais incluindo a glicosilação.
- 25 Existe uma quantidade de estratégias de DNA recombinante que utilizam sequências de promotores fortes e grande quantidade de

cópias de plasmídeos que podem ser utilizados para a produção das proteínas desejadas na levedura. A levedura reconhece as sequências líderes nos produtos de gene de mamífero clonado e secreta sequências líderes de comportamento peptídeo (por exemplo, pré-peptídeos).

As linhagens de células de mamíferos disponíveis como hospedeiras para expressão são conhecidas na técnica e incluem muitas linhagens de células imortalizadas da American Type Culture Collection (ATCC) incluindo, mas não limitada a, células de ovário de hamster Chinês (CHO), HeLa, rim de bebê hamster (BHK), rim de macaco (COS), C127, 3T3, BHK, HEK 293, Per.C6, melanoma de Bowes e carcinoma hepatocelular humano (por exemplo, Hep G2) e uma quantidade de outras linhagens de células. No sistema baculovírus, os materiais para sistemas de expressão de células baculovírus/inseto são comercialmente disponíveis em forma de kit (por exemplo, comercializado pela Invitrogen).

Para produção de alto rendimento de longo termo de um polipeptídeo recombinante, é pdita expressão estável. Por exemplo, linhagens de células que expressam estavelmente o polipetídeo de interesse podem ser transformadas usando vetores de expressão que podem conter origem de replicação viral e/ou elementos de expressão endógenos e um gene marcador selecionável no mesmo ou em um vetor separado. Seguindo a introdução do vetor, pode ser permitido as células crescer por um ou mais dias em um meio enriquecido antes de

serem trocadas para um meio seletivo. O propósito do marcador selecionável é conferir resistência a seleção, e sua presença permite o crescimento e recuperação de células que expressam com sucesso as sequências introduzidas. Os clones resistentes das células transformadas podem proliferar usando técnicas de cultura de tecido apropriadas para o tipo de célula. Uma linhagem de células substancialmente enriquecidas dentro das tais células pode então ser isolada para fornecer uma linhagem de células estável.

No caso de imunoglobulina humana totalmente recombinante, uma etapa importante é a seleção do isotipo específico e região constante. Os vetores especificamente designados para expressar anticorpos com o isotipo e subtipo desejados (por exemplo, humano IgA, IgG1, IgG2, ou IgG4) são largamente descritos na literatura. Então os anticorpos integrais ou as proteínas de fusão podem ser expressos como proteínas recombinantes em organismos procarióticos (por exemplo, *Escherichia coli*, Sorensen H e Mortensen K, 2005; Venturi M e outros, 2002), plantas (MA J e outros, 2005), ou células eucarióticas, que permitem um alto nível de expressão como células transientes ou transformadas estáveis (Dinni D e James D, 2005). Isto poderia ser requerido em particular quando a caracterização dos anticorpos tem que ser executada usando ensaios mais sofisticados, incluindo ensaios *in vivo*, onde a vida média do anticorpo pode ser determinada. As células hospedeiras podem ser selecionadas adicionalmente com base no nível de expressão da proteína recombinante.

Adicionalmente quando a proteína é expressa, especialmente como um anticorpo, em células hospedeiras eucarióticas (linhagens de células mamíferas em particular), diferentes vetores e sistemas de expressão têm sido projetados para gerar grupos estáveis de linhagens de células transfectadas (aldrich T e outros, 2003; Bianchi A e McGrew J, 2003). Expressões estáveis, otimizadas de alto nível de anticorpos recombinantes têm sido obtidas (Schlatter S e outros, 2005), também graças a otimização das condições de cultura de células (Grunberg J e outros, 2003; Yoon S e outros, 2004) e por clones selecionados ou de engenharia com altos níveis de produção de anticorpos e secreção (Bonm E e outros, 2004; Butler M, 2005).

O anticorpo, fragmentos de anticorpo, o peptídeo bioativo, a proteína de fusão, e qualquer outra proteína definida acima como sendo capaz de aglutinar e neutralizar hCMV pode ser purificada usando as tecnologias bem estabelecidas que permitem o isolamento ou de proteínas não/recombinantes a partir da cultura de células ou a partir de preparados sintéticos. Estas tecnologias poderiam fornecer uma quantidade suficiente de proteína (da faixa de micrograma a miligrama) para executar uma caracterização mais extensiva e validação para usos profilático, diagnóstico, e terapêutico relacionados com hCMV. Para este propósito, os preparados de proteínas recombinante ou natural podem ser testados em ensaios *in vitro* ou *in vivo* (bioquímicos, ensaios baseados em tecidos ou células, modelos de doenças confirmados em roedores ou

primatas, métodos biofísicos para medições de afinidade, mapeamento de epítipo, etc.), em particular usando qualquer daqueles revelado nos Exemplos ou na literatura para estudo de patogênese e imunobiologia hCMV.

5 Os anticorpos, como preparados purificados a partir de células humanas B sobrenadantes ou expressados com proteínas recombinantes, podem ser adicionalmente validados usando ensaios *in vitro* baseados em órgãos ou células conhecidos na literatura (Eggers M e outros, 1998; Lam V e outros, 2006; 10 Reinhardt B e outros, 2003; Forthal D e outros, 2001; Goodrum F e outros, 2002). Além disso, podem ser feitos testes pré-clínicos relevantes em animais infectados por hCMV, em particular em modelos onde células hospedeiras humanas podem ser transplantadas (Barry P e outros, 2006; Gosselin J e outros, 2005; 15 Thomsen M e outros, 2005).

A purificação das proteínas recombinantes da invenção pode ser realizada por qualquer método convencional conhecido para este propósito, por exemplo, qualquer procedimento envolvendo extração, precipitação cromatográfica, 20 ou semelhantes. Em particular, métodos para purificação podem fazer uso de matrizes gel imobilizadas dentro de uma coluna (Nisnevitch M e Firer M, 2001; Huse K e outros, 2002; Horenstein A e outros, 2003), explorando a forte afinidade dos anticorpos por substratos como Proteína A, Proteína G, ou 25 substratos sintéticos (verdoliva A e outros, 2002; Roque A e outros, 2004), ou por antígenos específicos ou epítopos (Murray

A e outros, 2002; Jensen L e outros, 2004). Após a lavagem, a proteína é eluída do gel por uma mudança no pH ou força iônica. Alternativamente, HPLC (High Performance Liquid Chromatography) pode ser usada. A eluição pode ser realizada
5 usando um solvente baseado em água e acetonitrila comumente empregado para purificação de proteína.

O anticorpo, os fragmentos de anticorpo, os peptídeos bioativos, as proteínas de fusão, e qualquer outro composto definido acima usando sequências de anticorpos 26A1
10 podem ser usados para detectar, tratar, inibir, prevenir, e/ou atenuar a infecção hCMV. Para este propósito, tais compostos podem ser usados para preparar compostos de diagnóstico, terapêutica, ou profilático para o gerenciamento da infecção hCMV.

15 Em particular tais componentes podem ser usados para preparar compostos farmacêuticos, junto com qualquer veículo ou portador farmacêuticamente aceitável. Estes compostos podem adicionalmente compreender qualquer agente terapêutico ou profilático adicional, tal como vacinas, anticorpo
20 neutralizante de hCMV, preparados de imunoglobulina intravenosa, compostos imunomodulantes, e/ou compostos antivirais. A literatura fornece alguns exemplos destes compostos agindo na replicação do hCMV (Foscarnet, Vangaciclovir, Fomivirsen, ou Ganciclovir) e já testados em humanos, sozinhos
25 ou em combinação com preparados de imunoglobulina intravenosa (De Clercq E, 2003; Nigro G e outros, 2005).

Além disso, a literatura recente sugere que os anticorpos monoclonais humanos podem ser usados para complementar (e substituir, se possível) tratamentos presentes, tais como preparados de imunoglobulina intravenosa e/ou compostos antivirais, dando a oportunidade para reduzir a frequência e/ou a dosagem daqueles compostos farmacêuticos (Barry J e outros, 2007).

Estes compostos podem compreender um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um peptídeo bioativo, uma proteína de fusão, e qualquer outro composto definido acima com base na sequência e atividade da sequência anticorpo monoclonal 26A1 humano. Os compostos podem adicionalmente compreender um anticorpo neutralizante de hCMV diferente, um preparado de imunoglobulinas intravenosas (IVIg) e/ou composto antiviral. O anticorpo neutralizante de hCMV diferente poderia ser caracterizado por um epítipo diferente, tal como aqueles descritos na literatura ou nos pedidos de patente EP07114782, EP07115410, e EP07111741 (10B7, 810, e 1F7, respectivamente) que estão associados ao gH, gB, ou outros antígenos de hCMV. De fato, a literatura mostra muitos exemplos nos quais, quando dois ou mais anticorpos direcionados a um alvo viral ou humano são combinados em uma composição farmacêutica, a composição resultante pode ter uma eficácia terapêutica melhorada graças não apenas a um efeito aditivo, mas a um efeito sinérgico específico (Logtenberg T, 2007).

As composições compreendendo qualquer das proteínas (por exemplo, anticorpos, fragmentos de anticorpos, proteínas de fusão, peptídeos bioativos) e dos ácidos nucleicos definidos acima podem ser usadas e administradas para um indivíduo com diagnóstico, terapêutica, ou propósito profilático relacionado a hCMV. Estas composições podem ser administradas como meios de imunização passiva específica para hCMV que fornecem compostos terapêuticos (em particular anticorpos terapêuticos ou fragmentos de anticorpos terapêuticos) que, por alvejarem vírions hCMV, podem inibir a propagação do vírus no paciente tratado, e potencialmente bloquear o surto de uma infecção viral na população.

Dependendo do uso específico, a composição poderia fornecer o composto para o paciente humano (em particular uma mulher grávida ou qualquer outro indivíduo que esteja infectado por hCMV ou considerado em risco por hCMV devido a contato com um indivíduo infectado por hCMV) por um período de tempo maior ou menor. Para este propósito, a composição pode ser administrada, em dosagens única ou múltipla e/ou usando dispositivos apropriados, através de vias diferentes: intramuscular, intravenosa, subcutânea, tópica, mucosal, por um nebulizador ou um inalador, como colírio, em materiais de matriz não/biodegradável, ou usando sistemas de distribuição de droga em partículas. Em particular, o composto pode permitir administração tópica ou ocular, que representa uma abordagem útil dada a presença do hCMV na mucosa e olho.

Além disso, anticorpos e fragmentos de anticorpos podem ser efetivamente quando topicamente aplicado a feridas (Streit M e outros, 2006), córnea (Brereton H e outros, 2005) ou vagina (Castle P e outros, 2002).

5 Uma composição farmacêutica da Invenção poderia fornecer uma quantidade efetiva terapêuticamente e profilaticamente do composto para o paciente que permite ao composto exercer sua atividade por um período de tempo suficiente. O efeito desejado é melhorar o status do paciente de
10 hCMV pelo controle da infecção do hCMV, reativação, e/ou re-infecção, e pela redução pelo menos das manifestações clínicas da infecção do hCMV, tais como retinite ou pneumonite (Landolfo S e outros, 2003). Por exemplo, a composição poderia ser administrada a uma quantidade efetiva de em torno de 0,005 a em
15 torno de 50 mg/kg.peso corporal, dependendo da via de administração, do número de doses administradas, e do status do indivíduo.

No caso das composições tendo usos diagnósticos, o composto poderia ser detectado usando
20 tecnologias usualmente estabelecidas em laboratórios clínicos e de pesquisa para detecção de vírus em amostras biológicas (por exemplo, ELISA ou outro ensaio serológico), ou, quando administrado para um paciente *in vivo*, pelo menos 1, 2, 5, 10, 24, ou mais horas após a administração. A detecção do hCMV pode
25 ser executada, usando as proteínas da invenção, em substituição ou acoplado a meios conhecidos e procedimentos que têm sido

estabelecidos para monitorar populações em risco de infecção por hCMV crônica ou aguda de ambos hospedeiros imunocompetente e imunocomprometido, onde uma correlação entre o dado gerado *in vitro* e o status clínico existe (Gilbert G, 2002; Gerna G e Lilleri D, 2006; Lazzarotto T e outros, 2007).

Um método para tratamento, profilaxia, ou diagnóstico de hCMV, ou de doença relacionada com hCMV pode compreender a administração de uma proteína ou de um ácido nucléico como definido acima. O método pode adicionalmente compreender a administração de um anticorpo diferente neutralizante de hCMV, um preparado de imunoglobulina intravenosa (IVIg) e/ou composto antiviral.

O desenvolvimento clínico e uso deveriam ser baseados na farmacocinética e farmacodinâmica do anticorpo (Lobo E e outros, 2004; Arizono H e outros, 1994), nos dados de segurança pré-clínica e clínica (Tabrizi Me Riskos L, 2007), e na conformidade com exigências internacionais para a produção e controle de qualidade de anticorpos monoclonais para serem usados para terapia e diagnóstico *in vivo* em humanos (Harris R e outros, 2004).

As proteínas da invenção podem ser também usadas para a preparação de uma composição para detectar, tratar, inibir, prevenir, e/ou atenuar outras, mais doenças muito difundidas (tais como doenças cardiovasculares e auto-imunes, ou alguns tipos de câncer) que podem ser definidos como doenças relacionadas com hCMV ou associadas com hCMV. Nestas

condições, o hCMV é considerado como um cofator possível visto que é bem sabido que este vírus está associado com processos inflamatórios celulares/imunológicos (pela simulação da expressão de receptores Fc, moléculas de adesão celular, chemoquinas e citoquinas), atividades auto-imunes (por exemplo, arterioesclerose, restenose) e com alterações aos caminhos de apresentação do antígeno (pela inibição da expressão do MHC classes I e II) levando a apoptose, diferenciação, e migração da célula, por exemplo, em vasos sanguíneos e em células proliferando ativamente (Cinatl J e outros, 2004; Soderberg-Naucler C, 2006).

Além disso, a infecção hCMV tem sido também descoberta associada a alteração do metabolismo celular (Munger J e outros, 2007), depressão (Phillips A e outros, 2007), ou fator de risco para eventos trombóticos (Fridlender Z e outros, 2007). A reativação do hCMV e complicações relacionadas tem também sido descoberta em pacientes com câncer (Sandherr M e outros, 2006; Han X, 2007) ou pacientes afetados por doenças inflamatórias no tecido conjuntivo (Yoda Y e outros, 2006) e em geral em pacientes sob tratamentos imunodepressivos tais como corticóides (Yamashita M e outros, 2006), ou quimioterapia e outros regimes imunossupressivos baseados em anticorpos (O'Brien S e outros, 2006; Scheinberg P e outros, 2007).

A invenção será agora descrita por meio dos exemplos seguintes, os quais não deveriam ser interpretados com de alguma forma limitando a presente invenção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Produção de culturas de células secretando anticorpos monoclonais humanos que neutralizam a infectividade do hCMV

5 Materiais & métodos

Seleção de doadores humanos que apresentam anticorpos IgG neutralizando o hCMV no soro sanguíneo

Estes ensaios específicos de hCMV têm sido executados como descrito na PCT/EP2005/056871 ou na
10 literatura, como sumarizado abaixo.

Os anticorpos neutralizantes de hCMV foram detectados de acordo com um ensaio de microneutralização de hCMV baseado em Fibroblastos de Pulmão de Embrião humano (células HELF) e cepa AD169 do hCMV (Uma cepa de hCMV de
15 laboratório da ATCC, cod. VR-538).

O ensaio de microneutralização do hCMV foi também executado com a cepa endoteliotrópica VR1814 do hCMV, um derivativo de um isolamento clínico recuperado de uma zangaratoa cervical de uma mulher grávida Revello M e
20 outros, 2001), e células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC). Estas células foram obtidas pelo tratamento enzimático de veias do cordão umbilical e cultivadas em meio de crescimento endotelial (EGM-2, Cambrex Bio Science) suplementado com Soro Bovino Fetal (FBS) 2%, fator de
25 crescimento endotelial vascular recombinante humano (VEGF), fator de crescimento fibroblasto básico (bFGF), fator de

crescimento epidérmico humano (hEGF), fator de crescimento de insulina (IGFI), hidrocortisona, ácido ascórbico, heparina, gentamicina e anfotericina B, (1 µg/ml cada). Experimentos foram executados com células na passagem 2-6.

5 O uso de células HELF e HUVEC para estudar infecção e replicação hCVM usando cepas clínicas e de laboratório tem sido descrita em muitos artigos (Gerna G e outros, 2002). No caso presente, as células foram dispostas (2,0-2,5x10⁴/cuba) em cubas de fundo plano de uma placa de 96 cubas em 100 µl de Meio de Crescimento, que contém Meio Essencial
10 Mínimo (MEM; Gibco-BRL) com 10% Soro Fetal de Bezerro (FCS), 1 mM Piruvato de sódio (NaP), e GPS (2 mM glutamina, 100 U/ml penicilina e 100 µg/ml streptomicina). As células foram cultivadas por 24 horas a 37°C.

15 Cinquenta µl de amostras contendo anticorpos (soro humano, células de cultura sobrenadante, ou de IgG natural ou recombinante purificado por Proteína A nas concentrações indicadas) foram incubadas com a cepa de laboratório AD169 do hCMV [500 unidades formadoras de placa (pfu) em 50 µl de
20 MEM com 5% de FCS, o volume total da mistura foi de 100 µl] por 1 hora a 37°C. A mistura do preparado de anticorpos e vírus foi então adicionada às monocamadas de células HELF (por cepas AD169 e AL-1 do hCMV) ou monocamadas de células HUVEC (por VR1814 do hCMV) e incubadas por 1 hora. O Meio de
25 Crescimento foi descartado das monocamadas de células e substituído por mistura anticorpo-vírus.

As placas foram então centrifugadas a 2.000 g por 30 minutos e incubadas por 90 minutos a 37°C em 5% CO₂. Meio de Crescimento (100 µl) foi adicionado e as culturas foram mantidas no incubador por 72 horas adicionais.

5 O efeito das células B sobrenadantes na infectividade do hCMV foi medida por Antígenos Precoces Intermediários de hCMV coloridos (IEA, IE1 + IE2) por imunoperoxidase indireta colorida. As monocamadas de células foram fixadas com solução acetona/metanol (armazenado a -
10 20°C) por 1 minuto e então lavadas com PBS. As células foram permeabilizadas em 0,1% Triton X-100 em PBS com 1% H₂O₂, 5 minutos no gelo, e então lavadas com PBS. A peroxidase endógena foi bloqueada com PBS com 50% de metanol e 0,6% H₂O₂, 30 minutos a temperatura ambiente no escuro e então
15 lavada com PBS. Cinquenta µl de Agente Bloqueador de Proteína (Ultra Tech HRP 500-600 Test, Straptavidin-Biotin Universal Detection System, PN IM2391) foram adicionados por 10 minutos à temperatura ambiente, e então lavadas logo com PBS. Foi adicionado anti hCMV IEA (clone E13, Argene Biosoft, ref.
20 11-003) de camundongo às cubas por 60 minutos à temperatura ambiente. Depois de lavadas, as células foram incubadas com 50 µl de conjugado de biotina, anti-humano secundário IgG (Ultra Tech HRP 500-600 Test, Straptavidin-Biotin Universal Detection System, PN IM2391) ou conjugado de peroxidase de cabra anti-
25 camundongo IgG (Ultratech HRP), por 10 minutos. Foi adicionado substrato DAB (Merck, No 1.02924.0001) em 0,1%

H₂O₂ por 30-45 minutos a 20°C no escuro e a reação parada pela diluição com PBS. Os núcleos IEA-positivos foram contados sob o microscópio.

O meio apenas ou a cultura de células sobrenadantes contendo anticorpos IgG irrelevantes foram usados como um controle negativo. Um preparado comercial de IgG humano, purificado do soro de pacientes hCMV soropositivos (Cytotect, Biotest), foi usado como um controle positivo com diluições progressivas, começando em 125 µg/ml. A positividade foi definida como $\geq 40\%$ de inibição de células IEA-positivas, comparado às cubas de controle negativo.

O ponto final de 50% de inibição, calculado usando o método Reed-Münch será considerado a Concentração de Neutralização (NT):

NT = diluição de anticorpo recíproca [inibição >50%] x $[(\% \text{ inibição maior do que } 50\% - 50\%)/((\% \text{ inibição maior do que } 50\% - \% \text{ inibição menor do que } 50\%)]$

Seleção de doadores humanos baseada na presença no soro, de IgG que se ligam a regiões do envoltório de glicoproteínas gB ou gH do hCMV

Os ensaios de aglutinação específica de hCMV têm sido executados com descrito na PCT/EP2005/056871 ou indicado pelo Fabricante, e validado com uma mistura comercial de anticorpos IgG específicos para CMV (Cytotec, Biotest). O soro foi testado em uma ELISA específica para IgG humano aglutinando proteínas vírion hCMV que são comercialmente

disponíveis (BEIA-CMV IgG Quant; Biotest, cod. 21465) e uma ELISA IgG gB (AD2) hCMV, também comercialmente disponível (CG3 antigen Biotest AG, cod. 807035; Figura 1A).

Brevemente, fitas quebráveis cobertas com uma
5 mistura de proteína de hCMV inativada (derivada da cepa de laboratório AD169) foram colocadas em microplacas e incubadas com células sobrenadantes B diluídas 1:81 (10 µl de sobrenadantes adicionado a 800 µl de diluentes de amostra do sistema BEIA), e a placa incubada à temperatura ambiente por 30
10 minutos. Após um ciclo de lavagem, o anticorpo IgG anti-humano monoclonal pré-diluído conjugado com peroxidase de rábano (100 µl) foi adicionada e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 15 minutos. A reação foi interrompida usando a Solução de Interrupção (100 µl/cuba) e a densidade ótica foi
15 medida em bicromatismo a 450/620 nanômetros.

Produção da cultura de células B humanas imortalizadas

As células mononucleares sanguíneas periféricas (PBMCs) foram obtidas de um paciente recuperado de uma infecção hCMV aguda (CMV7), selecionado devido a
20 presença de anticorpos neutralizantes de hCMV no soro. O processo de imortalização EBV ao qual as PBMCs do paciente CMV7 foram subsequentemente expostas tem sido executado de acordo com os ensinamentos da PCT/EP2005/056871. Brevemente, as PBMCs foram purificadas do sangue periférico
25 por centrifugação gradiente de densidade convencional no Ficoll/Hypaque. As células CD22-positivas foram isoladas das

PBMC frescas (>90% pureza) com granulado revestido de CD22 anti-humano pela técnica VarioMACS (Miltenyi Biotec Inc.) como descrito pelo fabricante. As células purificadas foram estimuladas com uma combinação de CpG2006 (Coley, 1µg/ml) e
5 IL-2 (Roche, 200U/ml). Após 4 dias de estimulação, as células foram lavadas com meio de cultura fresco (RPMI-1640) e as células B foram altamente enriquecidas em células IgG-positivas com granulado revestido de IgG anti-humano pelo uso da técnica VarioMACS (Miltenyi Biotec Inc.), seguindo as instruções do
10 fabricante.

As células selecionadas e estimuladas foram suspensas e mantido em meio de cultura de células RPMI-1640 com 10% (v/v) FCS (Soro Fetal de Bezerro), 1mM piruvato de sódio, 100 µg/ml de streptomicina e 100 U/ml de penicilina, em
15 placas de 24 cubas a 37°C e 5% de CO₂. A imortalização EBV foi executada usando células sobrenadantes B95.8 (1:1 v/v por 16 horas).

Ao fim do processo, as células imortalizadas foram lavadas com meio de cultura fresco (RPMI 1640
20 adicionado com 10% Soro Fetal de Bezerro) e postas em cultura por 3 semanas a uma densidade de $1,5 \times 10^6$ células/ml em placas de 24 cubas com uma camada de alimentador (PBMC alogênico irradiado classificado a 5×10^5 células/cuba), sem CpG2006 (e não com CPG2006 como descrito no PCT/EP2006/069780 para o
25 processo iniciado a partir dos PBMCs obtidos do doador CMV50).

Seleção de subculturas de células B humanas imortalizadas que secretam anticorpos neutralizantes de hCMV

Cinquenta dias após a exposição a EBV, a atividade neutralizante de hCMV foi confirmada na cultura de células expandida policlonal com o ensaio de microneutralização baseado em AD169/HELFL descrito acima. Então as células foram classificadas a 20 células/cuba em PBMCs alogênicos (50.000/cuba) irradiados (30 Gy) em 100µl IMDM adicionado com 10% FCS e aminoácidos não essenciais (NEAA, diluído 1X de uma solução de estoque comercial 100X; EuroClone) na ausência de CpG2006 e IL-2. Um total de 4224 subculturas foram geradas e, após duas semanas, 50 µl do mesmo meio foi adicionado. Após 1-2 semanas adicionais de cultura, os sobrenadantes de células de cultura que apresentaram crescimento e células agregadas foram testados em paralelo usando o ensaio de neutralização de hCMV baseado nas células HELFL e cepa Ad169 do hCMV.

Os sobrenadantes de culturas de células que apresentaram atividade neutralizante de hCMV foram testados usando as ELISAs para detectar ligação de IgG humano a regiões do envoltório de glicoproteínas gB do hCMV, ou total proteínas do hCMV descritas acima.

Alternativamente, antígenos baseados em gB ou gH foram gerados com proteínas de fusão Transferase-S-Glutationo (GST). No caso do antígeno gB(Ag)-GST, a região imunodominante gB da cepa C194 do hCMV foi fundida ao GST

(Biodesign, Cat. No. R18102; GS-4B Sepharose Affinity purified, 1 mg/ml). No caso do antígeno gH(Ag)-GST, o fragmento da glicoproteína gH da linhagem VR1814 de HCMV foi clonado por PCR, fundido ao gene GST, produzido em *E. coli* e purificado de lisado celular bacteriano com base na afinidade de GST. O antígeno gH (AG)-GST recombinante corresponde a uma fusão em alinhamento entre a região amino terminal gH (aminoácidos 16-144; Figura 1B) da linhagem VR1814 de hCMV e GST. Foi usado apenas GST como um controle negativo.

Esses ensaios Elisa foram realizados aplicando-se um protocolo ELISA comum em um formato de 96 poços com poucas modificações. Em resumo, o antígeno é diluído a 2 µg/mL em PBS e 50 µL desta solução de proteína (contendo 100 ng da proteína de fusão expressada em bactéria) foi usada para revestir placas de poliestireno EIA (nunc; Cat N° 469949). O revestimento das placas ELISA foi realizado durante a noite a 4°C, e a seguir, após eliminar a solução de proteína, as placas foram lavadas quatro vezes com 150 µL de Tampão de Lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20). Um tratamento para bloqueio de ligação não específica foi realizado dispensando-se 100 µL de PBS contendo 1% de leite em cada poço durante 1 hora a 37°C. Após quatro ciclos de lavagem com 50 µL de Tampão de Lavagem, 50 µL dos sobrenadantes das culturas de célula foi incubado em cada poço durante 2 horas a 37°C, usando-se 50 µL/poço do meio de cultura celular como controle negativo. Após quatro ciclos de

lavagens, 50 μ L do anticorpo secundário [IgG anti-humano de cabra (Fc específico) conjugado com peroxidase de rábano de cabalo, diluído 1:30.000 em tampão de lavagem, Sigma, Cat. n° A0170] foram colocados em cada poço e as placas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente. Após quatro ciclos de lavagem adicionais, desenvolveu-se a reação enzimática adicionando-se 05 μ L de Substrato-TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; Sigma, Cat. n° T0440) em cada poço por mais 30 minutos a temperatura ambiente. A reação cromogênica foi interrompida administrando-se 100 μ L de solução de finalização (ácido sulfúrico 1N) para cada poço sendo lida a densidade óptica a 450 nm.

Resultados

Foram obtidos PBMCs humanos de um paciente com hCMV (CMV7) apresentando um título de neutralização de hCMV significativa no soro (5% de neutralização a uma diluição 1:105) juntamente com uma forte reatividade em um ensaio ELISA (positivo a diluição de 1:64 de uma amostra é considerado positivo pela presença de IgG anti-gB a diluições de $\frac{1}{4}$ ou maiores) com base na ligação dos domínios AD2 da glicoproteína B, um dos antígenos de hCMV melhor caracterizados por induzirem anticorpos neutralizantes do soro (Qadri I et al., 1992; Kropff B et al., 1993) e clonado dentro do antígeno CG3 (Figura 1A). Além disso, os soros CMV7 foram positivos em um outro ensaio ELISA usando as proteínas de vírion de hCMV total, onde foi medida uma atividade de 74 AU/mL (uma amostra é

considerada positiva pela presença de IgG anti-hCMV quando o resultado é de pelo menos 10 AU/mL).

Células B do paciente CMV7 foram usadas para gerar uma cultura de célula policlonal imortalizada, altamente enriquecida em células B que secretam IgG usando o método de imortalização com base em EBV descrito em PCT/EP2005/056871 e PCT/EP2006/069780. Comparado a este último documento, que descreve a seleção de anticorpos anti-hCMV de um outro doador (CMV5), prepararam-se as subculturas da população policlonal, grosseira de células imortalizadas, na ausência de CpG2006 sendo os sobrenadantes primeiramente selecionados quanto a presença de anticorpos neutralizando infectividade por hCMV pelo ensaio de microneutralização e apenas após quatro anticorpos ligarem-se a antígenos de hCMV selecionados

O ensaio de microneutralização de hCMV foi aplicado apenas a subculturas, que provaram estar desenvolvendo-se ativamente com grupos de células de 3 semanas de cultura. Os sobrenadantes dos 324 poços foram primeiro analisados no ensaio de neutralização de hCMV, 20 sobrenadantes dentre estes foram vistos reduzir a capacidade de infecção de da linhagem AD169 de hCMV em pelo menos 40%. Quando se caracterizou as atividades de ligação a hCMV nesses poços, apenas dois foram encontrados positivos para gB(seja como antígeno de CG3 ou uma proteína de fusão gB(Ag)-GST)

nenhum para gH (como uma proteína de fusão gH(Ag)-GST; Figura 1B) e 18 poços a nenhum destes (Figura 2).

Devido ao baixo numero de células inicialmente
semeadas em cada poço (20 células/ poço) cada subcultura
5 apresentando atividade de neutralização para hCmV, deveriam do
mesmo modo, produzir anticorpos monoclonais (ou seja,
secretados por células originadas por clonagem por uma única
célula imortalizada específica), especialmente dado à baixa
frequência de células na população celular policlonal imortalizada
10 que se espera crescer e secretar IgG neutralizante de hCMV.
Outras atividades experimentais foram planejadas para confirmar
esta suposição.

EXEMPLO 2 - CARACTERIZAÇÃO DO ANTICORPO 26A1

15 Materiais e Métodos

Expansão e caracterização da subcultura 26A1

As células da subcultura original de 26A1 foram
expandidas em PBMC alogênico irradiado em meio IMDM
(adicionado com 10% de FCS e NEAA) sendo a atividade de
20 neutralização de hCMV confirmada pelo menos duas vezes
durante esta etapa de expansão usando o ensaio de
microneutralização de hCMV, conforme descrito o Exemplo 1
(ver a Tabela 1)(.

A quantidade de anticorpo secretada pela
25 subcultura 26A1 foi determinada a 24, 48 e 72 horas usando um
kit ELISA de igG humano quantitativo comercial (Immunotek;

cod. 0801182; Zeptometriz Corp), de acordo com as instruções do fabricante. A subclasse do anticorpo 26A1 foi determinada usando um ensaio comercial (combi-Kit ELISA subclasse IgG humano PeliClass; cod. n°RDI-M1551cib, RDI Division of
5 Fitzgerald Industries Intl.).

A cultura celular foi expandida gradualmente, semeando-se as células contidas em 1 poço de uma placa de 96 poços ($\approx 1 \times 10^5$) em u poço de uma placa de 48 poços em PBMC alogênico irradiado em IMDM adicionado com 5% de
10 FCS. Após 5 a 7 dias, as células foram expandidas em um poço de uma placa de 24 poços na ausência da camada alimentadora em IMDM adicionado com 5% de FCS. A seguir as células ($5 \times 10^5/\text{mL}$) foram colocada em uma placa de 6 poços na ausência da camada alimentadora em 50% de IMDM e 50% de Hibridoma-
15 SFM (Gibco, cod. 12045-084) adicionado com 2,5% de FCS. As células foram cultivadas nessas condições por pelo menos uma semana. Células de crescimento exponencial foram a seguir lavadas e cultivada em Frascos T75 em Hibridoma-SFM a uma concentração variando desde 5×10^5 a $10^6/\text{mL}$. O sobrenadante
20 da cultura celular foi coletado, sendo o IgG quantificado e purificado em colunas de Proteína A, dialisado contra tampão PBS e filtrado ($0,2 \mu\text{M}$).

Caracterização de anticorpo secretado pela subcultura 26A1

25 O BEIA-CMV, com base em gB, e ensaios ELISA com base em gH foram descritos no Exemplo 1 (Figura 1

e 2) O ensaio HSV foi realizado de acordo com a literatura (Laquerre S et al., 1998).

O ensaio de redução de placa de hCMV foi realizado usando a linhagem AD169 de hCMV. Em resumo, o vírus foi diluído a 1000 PFU/reação. Iguais quantidades 0,1 mL de vírus e cada anticorpo ou sobrenadante de cultura celular foram misturados e incubados a 37°C durante uma hora. As misturas foram adicionadas a monocamada de células HELF (em placas de 24 poços), e deixada adsorver por 1 hora a 37°C. A seguir a mistura anticorpo-vírus foi removida adicionando-se sobrecamada de metilcelulose a 1% - MEM - FCS a 2% para as células infectadas. As placas serão contadas como uma medida da infectividade no dia 10 ou 12 pós-infecção.

O sobrenadante de cultura celular 26A1 foi testado em células HELF ou HUVEC de imunofluorescência ou não infectadas. Resumidamente, as células (7×10^4 /mL) foram semeadas lamina de vidro com camada finíssima superposta revestidas de gelatina em placas de 24 poços em MEM adicionado com 10% de FCS sendo a seguir crescido até semi-confluência. AS células foram a seguir lavadas duas vezes com PBS quente, fixadas com uma mistura pré-resfriada (a -20°C) de 50% de acetona / 50% metanol durante 1 minuto a temperatura ambiente sendo lavadas com PBs. As células fixadas foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS por 20 minutos em gelo, lavada com PBS e incubada por 15 minutos a temperatura ambiente, com uma solução de bloqueio (PBS mais

FCS a 2%). Alternativamente, as células fixadas não foram permeabilizadas para se determinar a capacidade dos anticorpos em reconhecer os componentes da superfície celular. Neste caso, as células fixadas foram lavada com PBS, incubada durante 15 minutos a temperatura ambiente com uma solução de bloqueio (PBS adicionado com FCS a 2%) e incubada com sobrenadante de cultura celular 26A1 (80 μ l) por 2 horas a 37°C. As células foram a seguir lavadas com PBS quente (3 X) e incubadas com 80 μ L de F(ab')₂ IgG anti-humano de coelho conjugado a FITC (Jackson ImmunoResearch) para acompanhar o desenvolvimento do manchamento de IgG humano com a cor verde. Os anticorpos secundários foram diluídos 1:50 em PBS adicionado com Tween 80 a 0,05% e adicionados para as células durante 1 hora a 37°C no escuro. A seguir, as células foram lavadas com PBS quente (3X) contra-manchadas com iodeto de propídio (0,25 μ g / mL) em PBS; Sigma) As lâminas com camada superposta foram montadas em laminas de microscópio usando o Mounting Medium (Vector Laboratories). As imagens foram registradas com um microscópio de varredura a laser confocal invertido Olympus Fluoview-IX70.

*Caracterização de DNA de IgG de 26A1 /
seqüência de proteína e expressão recombinante*

Uma alíquota da cultura de célula, resultante da expansão da cultura de célula 26A1 inicial, foi usada para sequenciamento das regiões variáveis de cadeia pesada (VH) e cadeia leve (VL) do anticorpo 26A1 de acordo com a tecnologia

estabelecida por Fusion Antibodies Ltd. Pellets, de células congeladas (contendo pelo menos 50.000 células) que foram usadas para extração total de RNA. O cDNA correspondente foi produzido por transcrição reversa com um iniciador oligo(dT). As reações da PCR foram ajustadas para amplificar a região VH usando uma mistura de iniciadores específicos para IgG, e a região VL com uma mistura de iniciadores IgK/ λ . Os produtos da PCR de duas reações de amplificação foram clonados usando um sítio de restrição *Eco RI* em um vetor de sequenciamento (pCR2.1; Invitrogen) e empregados para transformar células de *E. coli* TOP10.

Pelo menos dez colônias selecionadas obtidas das duas transformações foram coletadas e analisadas para sequenciamento. As seqüências de DNA resultantes foram alinhadas e traduzidas em seqüência de proteína gerando um DNA de consenso e seqüência de proteína para VH 26A1 (SEQ ID NO: 4 e SEQ ID NO: 5, respectivamente) e VL 26A1 (SEQ ID NO: 9 e SEQ ID NO: 10, respectivamente). As seqüências de proteína VG26A1 e VL 26A1 foram comparadas e alinhadas com seqüências presentes em base de dados de domínio público (usando base de dados GenomeQuest, GeneSec, e EBI). Os CDRs caracterizando as seqüências de proteína (SEQ ID NO: 5, 7 e 8) de VH 26A1 e (SEQ ID NO: 11, 12 e 13) de VL26A1 foram prognosticados tomando-se a base de dados IMGT (Giudicelli V et al., 2004).

O anticorpo monoclonal 26A1 recombinante humano foi expresso em células eucarióticas por clonagem da seqüências da região variável de cadeia pesada e leve de 26A1 de consenso no mesmo vetor de expressão, já contendo as correspondentes regiões constantes (para cadeia pesada de IgG1 humano e cadeia Lambda de Ig humano) e um vetor promotor duplo permitindo a expressão de ambas as cadeias de anticorpo. a seqüência completa de anticorpo monoclonal 26A1 humano recombinante no vetor foi confirmada pelo sequenciamento de DNA e usada para transfectar, momentaneamente células DG44 CHO (Derouazi M et al. 2006) que foram adaptadas para desenvolver em cultura de suspensão isenta de soro e semeadas a 1×10^6 células por mL em um frasco giratório de 125 mL. A transfecção foi realizada com uma mistura de 300 μ g de vetor de expressão com 900 μ g de polietilenoimina de 25 kDa linear. As células foram incubadas a 37°C em 5% de CO₂ durante 6 dias no frasco giratório antes da coleta do meio. O anticorpo recombinante foi purificado usando uma coluna de Proteína G em uma unidade de cromatografia Akta Prime seguindo o programa padrão do fabricante.

Resultados

Dentre as subculturas contendo células em crescimento e secretando IgG, os sobrenadantes da cultura celular, dentre poucos, continham anticorpos que neutralizam infecção por hCMV, porém não apresentaram uma ligação significativa aos antígenos recombinante específicos gB e gH

testados por ELISA (Figura 1 e 2). Em particular, a subcultura 26A1 que secreta um IgG1, demonstrou a atividade de neutralização a hCMV mais forte e com mais capacidade de reprodução, sendo escolhida para uma caracterização molecular e biológica mais detalhada.

A ligação de IgG presente no sobrenadante da subcultura 26A1 a hCMV foi confirmada usando um ELISA contendo uma mistura de proteínas hCMV (BEIA-CMV). Ao mesmo tempo, este sobrenadante demonstrou uma atividade de neutralização de hCMV significativa conterà diferentes cepas de hCMV em dois sistemas de célula hospedeira humana (como se vê na Tabela 1). Esta atividade não foi observada, quando se usou o sobrenadante em um ensaio de neutralização específica para HSV.

Além disso, a subcultura 26A1 foi expandida e ainda subclonada a 10 células/ poço a fim de confirmar sua capacidade de monoclonagem em termos de expressão de IgG1 humano, de neutralização de hCMV. De fato, dentre os poços que mostraram crescimento celular, todos apresentaram uma atividade de neutralização variando de 50 a 98% no ensaio com base em AD169 original, confirmando os resultados obtidos com a subcultura 26a! original.

As células na subcultura 26A1 original foram usadas para expandir gradualmente, a produção de IgG, gerando progressivamente, culturas maiores, das quais pode-se purificar o IgG e ser submetido a teste em ensaios de hCMV. Culturas

maiores foram geradas por expansão gradual de cultura de 26A1 e eliminar algumas exigências para crescimento em cultura celular (tais como camada introdutória, Soro Bovino Fetal). Com o uso desta abordagem, demonstrou-se que, maiores culturas de

5 célula geradas da subcultura do 26A1 original secretam IgG1 a uma concentração de aproximadamente $16 \mu\text{g/mL}$ 10^6 de células. Essas maiores culturas demonstraram uma duplicação do tempo de 4 dias, mesmo na ausência da camada introdutória, e a atividade de neutralização de hCMV manteve-se na cultura por

10 mais de 2 meses.

Os ensaios de neutralização de hCMV foram repetidos com o anticorpo 26A1, na forma de IgG humano purificada por cromatografia de afinidade da maior cultura de célula. O IgG de 26A1 foi submetido a teste em experimentos

15 dose-resposta para se avaliar a concentração exigida para 50% de inibição (concentração inibidora 50, ou IC50), de infectividade por hCMV, utilizando dois ensaios com diferentes combinações de cepas hCMV e células alvo humanas. Os resultados mostraram que, a potente atividade de neutralização de igG de

20 26A1 natural purificado com Proteína A não é específica para tipo de célula nem para linhagem do vírus, podendo ser avaliada quantitativamente pelo proporcionar valores IC50 de aproximadamente $1 \mu\text{g/mL}$ e um efeito de neutralização aproximando-se de 100% em ambos os ensaios (Figura 3).

25 Quando se compara a atividade de neutralização de IgG de 26A1 natural purificado com Proteína A, com aquela

de uma preparação comercial de IgG hiper-imune (IVIg) contra hCMV (Cytotect, Biotest) contra o isolado clínico em células HUVEC, o IC50 de 26A1 é 25 vezes menor do que o exigido para esta preparação comercial, demonstrando assim, a potente
5 atividade de neutralização do anticorpo 26A1.

De modo a excluir o fato da atividade de neutralização presente no sobrenadante da subcultura 26A1 ser devido à ligação a uma molécula superficial da célula, o sobrenadante foi testado em ensaio de imunofluorescência com
10 células HELF ou HUVEC não infectadas. Este ensaio demonstrou que, o IgG1 produzido pela cultura de 26A1 não se liga a células humanas não infectadas. Quando o mesmo sobrenadante celular é testado em ensaio ELISA contra antígenos hCMV relevantes, o anticorpo não liga essas proteínas (figura 4)
15 indicando que, o anticorpo 26A1 reconhece, do mesmo modo, um outro antígeno não determinado na cápsula viral de hCMV induzindo a produção de anticorpos de neutralização.

A capacidade de monoclonagem do anticorpo neutralizante de hCMV secretado nas culturas de célula derivadas
20 de 26A1 foi ainda confirmada por sequenciamento de produtos da PCR específicos para IgG obtidos desta cultura celular. Precipitados de célula foram preparados para extração de rRNA e transcrição reversa usando células originadas da subcultura 26A1. O cDNA resultante foi a seguir usado para amplificação de
25 seqüências VH e vL usando iniciadores específicos para as regiões variáveis de cadeias pesada e leve de IgG humana,

respectivamente. Os produtos da PCR foram a seguir clonados em plasmídeos que foram usados para transformar células bacterianas. Os transformantes bacterianos foram aleatoriamente coletados e usados para sequenciamento dos produtos da PCR clonados. Todos os clones demonstraram a mesma seqüência de DNA, salvo pequenas diferenças, possivelmente, devido a erro induzido pela PCR, permitindo a determinação das seqüências de consenso e CDRs para as regiões variáveis de cadeia pesada (Figura 5) e cadeia leve (Figura 6) do anticorpo monoclonal 26A1 humano.

As seqüências codificando as regiões Vh e Vl do anticorpo 26A1 podem ser novamente clonadas em vetores de expressão para a apropriada expressão das regiões variáveis de 26A1 como um fragmento de anticorpo (Fab ou ScFv) ou dentro de um anticorpo recombinante totalmente humano, com um isotipo e subclasse específicos (por exemplo, IgA, IgG1 ou IgG4). Esses anticorpos recombinantes podem então ser analisados para confirmar a atividade de neutralização de hCMV específica nos devidos ensaios.

O anticorpo monoclonal 26A1 recombinante humano foi produzido em células eucarióticas como um IgG1 recombinante humano por clonagem do DNA codificando a cadeia pesada (Figura 7) e cadeia leve (Figura 8) em um vetor de expressão apropriado, que foi usado para transfectar células CHO em experimentos de expressão transitórios. O anticorpo monoclonal 26A1 recombinante humano foi purificado por

afinidade por sobrenadantes de cultura de célula e analisado em diferentes ensaios para neutralização de hCMV. Os testes foram realizados com sistema de células AD169/HELFL em ambos os ensaios de microneutralização e redução de placa. O anticorpo monoclonal 26A1 recombinante humano neutralizou, eficazmente a infectividade por hCMV de um modo comparável com o anticorpo 26A1 natural purificado com Proteína A com um IC50 calculado de aproximadamente 1 µg/mL (Figura 9). Também foram feitos testes em ensaios de neutralização e redução de placa com base nas diferentes combinações de linhagens de hCMV e células alvo, todos confirmando a eficácia comparável do anticorpo monoclonal 26A1 humano, tanto natural como recombinante (Figura 10).

Portanto, o anticorpo 26A1 na forma de anticorpo monoclonal humano, tanto natural como recombinante é um anticorpo que pode ser de utilidade na condução clínica de infecção por hCMV e de uma doença relacionada a hCMV.

Tabela 1

Linhagem hCMV	Linha de célula Humana	Inibição de infecção por hCMV usando sobrenadante de cultura de célula 26A1 ^a
AD169 ^b	HELFL	++++

VR1814 ^c	HELFL	++
AL-1 ^d	HELFL	+++
VR1814 ^c	HUVEC	++++

^a +, ++, +++ e ++++ corresponde a 20 a 40%, 41 a 60%, 61 a 80% e mais do que 80% de inibição de infecção por hCNMV, respectivamente

^b linhagem laboratorial de hCMV (proveniente de ATCC, código VR-538)

^c um derivado trópico de célula endotelial de um isolado clínico recuperado de um esfregaço cervical de uma mulher grávida infectada com hCMV (Revello M et al., 2001)

^d derivado de um isolado clínico recuperado de um fluido de lavagem bronco-alveolar de um receptor de transplante de pulmão infectado com hCMV (Luganini A et al., não publicado)

REFERÊNCIAS

Aldrich T et al, (2003). *Biotechnol Prog.* 19: 1433-8.

Arizono H et al., (1994). *Arzneimittelforschung.* 44: 909-13.

Baldanti F and Gerna G, (2003). *J Antimicrob Chemother.* 52: 324-30.

Barrios Y et al., (2004). *J Mol Recognit.* 17: 332-8.

Barry P et al., (2006). *ILAR J.* 47: 49-64.

- Bayry J et al., (2007). *Nat Clin Pract Neurology*.
3: 120-1.
- Bendtsen J et al., (2004). *J Mol Biol*. 340: 783-
95.
- 5 Bianchi A and McGrew J (2003). *Biotechnol
Bioeng*. 84 : 439-44. Boeckh M et al., (2001). *Biol. Blood
Marrow Transplant*. 7: 343-351.
- Bohm E et al., (2004). *Biotechnol Bioeng*. 88:
699-706.
- 10 Bonaros N et al., (2004). *Transplantation*. 77:
890-7.
- Bond C et al., (2003). *J Mol Biol*. 332: 643-55.
- Brereton H et al., (2005). *Br J Ophthalmol*. 89:
1205-9.
- 15 Britt W and Mach M, (1996). *Intervirology*. 39:
401-12.
- Butler M, (2005). *Appl Microbiol Biotechnol*.
68: 283-91.
- Carton J et al., (2007). *Protein Expr Purif*. 55:
20 279-86.
- Castle P et al., (2002). *J Reprod Immunol*. 56:
61-76.
- Chapman A et al., (1999). *Nat Biotechnol*. 17:
780-3.
- 25 Chatenoud L, (2005). *Methods Mol Med*. 109:
297-328.

Cinatl J et al., (2004). *FEMS Microbiol Rev.* 28: 59-77.

Coaquette A et al., (2004). *Clin Infect Dis.* 39: 155-61.

5 Dar L, (2007). *Indian J Med Res.* 126: 99-100.

De Clercq E, (2003). *J Antimicrob Chemother.* 51 : 1079-83. Derouazi M et al, (2006). *Biochem Biophys Res Commun.* 340: 1069-77.

10 Dinnis D and James D, (2005). *Biotechnol Bioeng.* 91 : 180-9.

Dunman P and Nesin M, (2003). *Curr Opin Pharmacol.* 3: 486-96.

Eggers M et al., (1998). *J Med Virol.* 56: 351-8.

15 Fang J et al., (2005). *Nat Biotechnol.* 23: 584-90.

Forthal D et al., (2001). *Transpl Infect Dis.* 3 (Suppl 2):31-4.

Fridlender Z et al., (2007). *Amer J Med Sci.* 334: 111-4.

20 Furebring C et al., (2002). *Mol Immunol.* 38: 833-40.

Gandhi M and Khanna R, (2004). *Lancet Infect Dis.* 4: 725-38. Gerna G et al., (2002). *J Clin Microbiol.* 40: 233-8.

25 Gerna G and Lilleri D, (2006). *Herpes.* 13: 4-11.

- Gicklhorn D et al., (2003). *J Gen Virol.* 84: 1859-62.
- Gilbert G, (2002). *Med J Aust.* 176: 229-36.
- Gilbert C and Boivin G, (2005). *Antimicrob Agents Chemother.* 5 49: 873-83.
- Gilliland L et al., (1996). *Tissue Antigens.* 47: 1-20.
- Gilpin A et al., (2003). *Control Clin Trials.* 24: 92-8.
- 10 Giudicelli V et al., (2006). *Nucleic Acids Res.* 34: D781-4.
- Goodrum F et al., (2002). *PNAS.* 99: 16255-60.
- Gosselin J et al., (2005). *J Immunol.* 174: 1587-93.
- 15 Greijer A et al., (1999). *J Clin Microbiol.* 37: 179-88.
- Griffiths P, (2004). *Herpes.* 11 (Suppl 2): 95A-104A.
- Griffiths P and Walter S, (2005). *Curr Opin Infect Dis.* 18: 241-5.
- 20 Grote A et al., (2005). *Nucleic Acids Res.* 33 : W526-31.
- Grunberg J et al., (2003). *Biotechniques.* 34 : 968-72.
- 25 Hamrock D, (2006). *Int Immunopharmacology.* 6: 535-42.

- Han X, (2007). *J Clin Microb.* 45: 1 126-32.
- Harris R et al, (2004). *Drug Development Research.* 61 : 137-154.
- Hebart H and Einsele H, (2004). *Hum Immunol.* 65: 432-6.
- 5 Horenstein A et al., (2003). *J Immunol Methods.* 275 : 99-112.
- Huse K et al., (2002). *J Biochem Biophys Methods.* 51 : 217-31.
- Jain M et al., (2007). *Trends Biotechnol.* 25: 10 307-16.
- Jensen L et al., (2004). *J Immunol Methods.* 284: 45-54.
- Kalil A et al., (2005). *Ann Intern Med.* 143: 870-80.
- 15 Keller M and Stiehm E, (2000). *Clin Microbiol Rev.* 13: 602-14.
- Kim S et al., (2005). *MoI Cells.* 20: 17-29.
- Kiss C et al., (2006). *Nucleic Acids Res.* 34: el32.
- 20 Klein M et al., (1999). *J Virol.* 73: 878-86.
- Klenovsek K et al., (2007). *Blood.* 110: 3472-9.
- Knappik A et al., (2000). *J MoI Biol.* 296: 57-86.
- Kocher A et al., (2003). *J Heart Lung Transpl.* 25 22: 250-7.

- Krropff B et al., (1993). *J Med Virol.* 39: 187-95.
- Kruger R et al., (2003). *J Heart Lung Transpl.* 22: 754-63.
- 5 Ladner R, (2007). *Nature Biotechnol.* 25: 875-77.
- Laffly E and Sodoyer R, (2005). *Hum Antibodies.* 14: 33-55.
- Lam V et al., (2006). *Biotechnol Bioeng.* 93 : 10 1029-39.
- Landolfo S et al., (2003). *Pharmacol Ther.* 98: 269-97.
- Laquerre S et al., (1998). *J Virol.* 72 : 6119-6130.
- 15 Lazzarotto T et al., (2007). *J. Clin Vir.* Doi : 10.1016/j.jcv.2007.10.015.
- Levi M et al, (2000). *AIDS Res Hum Retroviruses.* 16: 59-65.
- Lobo E et al., (2004). *J Pharm Sci.* 93: 2645-68.
- 20 Logtenberg T, (2007). *Trends Biotechnol.* 25: 390-4.
- Ma J et al., (2005). *Vaccine.* 23: 1814-8.
- Mantis N et al., (2007). *J Immunol.* 179: 3144-52.
- 25 McLean G et al., (2006). *Mol Immunol.* 43: 2012-22.

- Marasco W and Sui J, (2007). *Nat Biotechnol.* 25: 1421-34.
- Marshall G et al., (2000). *Viral Immunol.* 13: 329-41.
- 5 Matsumoto Y et al., (1986). *Bioch Biophys Res Commun.* 137: 273-280.
- Munger J et al., (2007). *PLoS Pathogens.* 2 : 1165-1175.
- Murray A et al., (2002). *J Chromatogr Sci.* 40: 10 343-9.
- Nilsson J et al., (1997). *Protein Expr Purif.* 11 : 1-16.
- Navarro D et al., (1997). *J Med Virol.* 52: 451-9.
- 15 Nigro G et al., (2005). *N Engl J Med.* 353: 1350-62.
- Nilsson J et al., (1997). *Protein Expr Purif.* 11 : 1-16.
- Nisnevitch M and Firer M, (2001). *J Biochem* 20 *Biophys Methods.* 49: 467-80.
- O'Brien S et al., (2006). *Clin Lymphoma Myeloma.* 7: 125-30.
- Ohlin M et al., (1993). *J Virol.* 67: 703-10.
- Phillips A et al., (2007). *Brain Behav Immun.* 25 Doi : 10.1016/j.bbi.2007.06.012.

- Puius Y and Snyderman D, (2007). *Curr Opin Infect Dis.* 20: 419-24.
- Qadri I et al., (1992). *J Gen Virol.* 73: 2913-21.
- Rasmussen L et al., (1991). *J Infect Dis.* 164:
5 835-42.
- Reinhardt B et al., (2003). *J Virol Methods.*
109: 1-9.
- Revello M et al., (2001). *J Infect Dis.* 184:
1078-81.
- 10 Rojas G et al., (2004). *J Immunol Methods.* 293
: 71-83.
- Roque A et al., (2004). *Biotechnol Prog.* 20 :
639-5.
- Rothe M et al., (2001). *J Med Virol.* 65: 719-29.
- 15 Sandherr M et al., (2006). *Ann Oncol.* 17: 1051-
9.
- Scheinberg P et al., (2007) *Blood.* 109: 3219-24.
- Schlatter S et al., (2005). *Biotechnol Prog.* 21 :
122-33.
- 20 Schleiss M, (2003). *Herpes.* 10: 4-1 1.
- Schleiss M, (2005). *Herpes.* 12: 66-75.
- Schoppel K et al., (1996). *Virology.* 216: 133-45.
- Schrader J and McLean G, (2007). *Immunol
Lett.* 112: 58-60.
- 25 Shimamura M et al., (2006). *J Virol.* 80: 4591-
600.

- Simpson J et al., (1993). *J Virol.* 67: 489-96.
- Smith J et al., (1995). *J Biol Chem.* 270: 30486-30490.
- 5 Snyderman D, (2006). *Rev Med Virol.* 16: 289-95.
- Soderberg-Naucler C, (2006a). *Crit Rev Immunol.* 26: 231-64.
- Soderberg-Naucler C, (2006b). *J Intern Med.* 259: 219-46.
- 10 Sorensen H and Mortensen K, (2005). *Microb Cell Fact.* 4: 1.
- Streit M et al., (2006). *Int Wound J.* 3: 171-9.
- Tabrizi M and Riskos L, (2007). *Drug Disc Today.* 12: 540-7.
- 15 Thomsen M et al., (2005). *Tissue Antigens.* 66: 73-82.
- Urban M et al, (1992). *J Virol.* 66: 1303-11.
- Venturi M et al., (2002). *J MoI Biol.* 315 : 1-8.
- Verdoliva A et al., (2002). *J Immunol Methods.* 271 : 77-8.
- 20 Xu J and Davis M, (2000). *Immunity.* 13 : 37-45.
- Wang D and Shenk T, (2005). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102: 18153-8.
- Wang X et al, (2005). *Nature Med.* 11 : 515-25 521.

Watkins N et al., (2004). *Tissue Antigens*. 63:
345-54.

Weber B et al., (1993). *Clin Investig*. 71 : 270-
6.

5 Wiegand T and Young L, (2006). *Int*
Ophthalmol Clin. 46: 91-110. Wijkhuisen A et al., (2003). *Eur J*
Pharmacol. 468: 175-82. Yamashita M et al., (2006). *Clin Exp*
Rheumatol. 24: 649-55.

10 Yoda Y et al., (2006). *Mod Rheumatol*. 16: 137-
42.

 Yoon S et al., (2004). *Biotechnol Prog*. 20:
1683-8.

REIVINDICAÇÕES

1. Proteína, caracterizada por compreender uma seqüência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 8.

5 2. Proteína, de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pela dita proteína compreender ainda, SEQ ID NO: 6 e/ou SEQ ID NO: 7.

10 3. Proteína, de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pela dita proteína compreender uma seqüência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 5.

4. Proteína, de acordo com quaisquer reivindicações precedentes, caracterizada pela dita proteína compreender ainda, uma ou mais seqüências selecionadas dentre o grupo que consiste d:

15 SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 e SEQ ID NO: 13.

5. Proteína, de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pela dita proteína compreender uma seqüência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 10.

20 6. Proteína, de acordo com quaisquer reivindicações precedentes, caracterizada pela dita proteína ser um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um peptídeo bioativo, ou uma proteína de fusão.

25 7. Proteína, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo dito anticorpo ser um anticorpo recombinante humano.

8. Proteína, de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo dito anticorpo compreender uma cadeia pesada com uma seqüência de proteína pelo menos 90% idêntica com a SEQ ID NO: 15, e uma cadeia leve com uma seqüência de proteína pelo menos 90% idêntica com a SEQ ID NO: 17.

9. Proteína, de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fragmento de anticorpo ser uma variável de heterodímero de cadeia pesada/leve, ou uma variável de fragmento de cadeia simples.

10. Proteína, de acordo com quaisquer reivindicações precedentes, caracterizada pelo fato da dita proteína ligar-se e neutralizar Citomegalovírus humano (hCMV).

11. Anticorpo IgG1 humano caracterizado por ser secretado pela subcultura 26A1.

12. Proteína, caracterizada por competir com o anticorpo IgG1 de acordo com a reivindicação 11, para ligação e neutralização de hCMV.

13. Proteína, de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pela dita proteína ser uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 9.

14. Ácido nucléico, caracterizada por codificar uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações precedentes.

15. Ácido nucléico, de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo dito ácido nucléico

compreender uma seqüência que tem pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 4.

16. Ácido nucléico de acordo com a reivindicação 15, caracterizado por compreender adicionalmente
5 uma seqüência com pelo menos 90% de identidade com a SEQ ID NO: 9.

17. Vetor, caracterizado por compreender um ácido nucléico de acordo com quaisquer reivindicações 14 a 16.

18. Célula hospedeira procariótica ou
10 eucariótica, caracterizada por compreender um ácido nucléico de acordo com quaisquer reivindicações 14 a 17.

19. Célula hospedeira, de acordo com a reivindicação 18, caracterizada pelas ditas células secretarem uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 12.

20. Uso de um ácido nucléico de acordo com quaisquer reivindicações 14 a 17, ou uma célula hospedeira de acordo com a reivindicação 18 ou 19, caracterizado por ser para a produção de uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 12.

21. Uso de uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 12, caracterizado por ser para a preparação de uma composição, para detectar, tratar, inibir, prevenir e/ou melhorar a infecção por hCMV ou uma doença relacionada a hCMV.

22. Composição terapêutica, profilática ou de diagnóstico, para infecção por hCMV ou para uma doença

relacionada a hCMV, caracterizada por compreender uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 12, ou um ácido nucléico de acordo com quaisquer reivindicações 14 a 17.

23. Composição, de acordo com a reivindicação 5 22, caracterizada pela composição destinar-se a administração ocular ou tópica.

24. Composição, de acordo com a reivindicação 10 22 ou 23, caracterizada por compreender ainda, um anticorpo de neutralização de hCMV diferente, uma preparação de imunoglobulina intravenosa e/ou um composto antiviral.

25. Método para tratamento, profilaxia, ou 15 diagnose de infecção por hCMV, ou de uma doença relacionada a hCMV, caracterizado por compreender a administração de uma proteína de acordo com quaisquer reivindicações 1 a 13, ou um ácido nucléico de acordo com quaisquer reivindicações 14 a 17.

26. Método, de acordo com a reivindicação 25, caracterizado por compreender ainda, a administração de um anticorpo de neutralização de hCMV diferente, preparação de imunoglobulinas intravenosas e/ou um composto antiviral.

Fig. 1

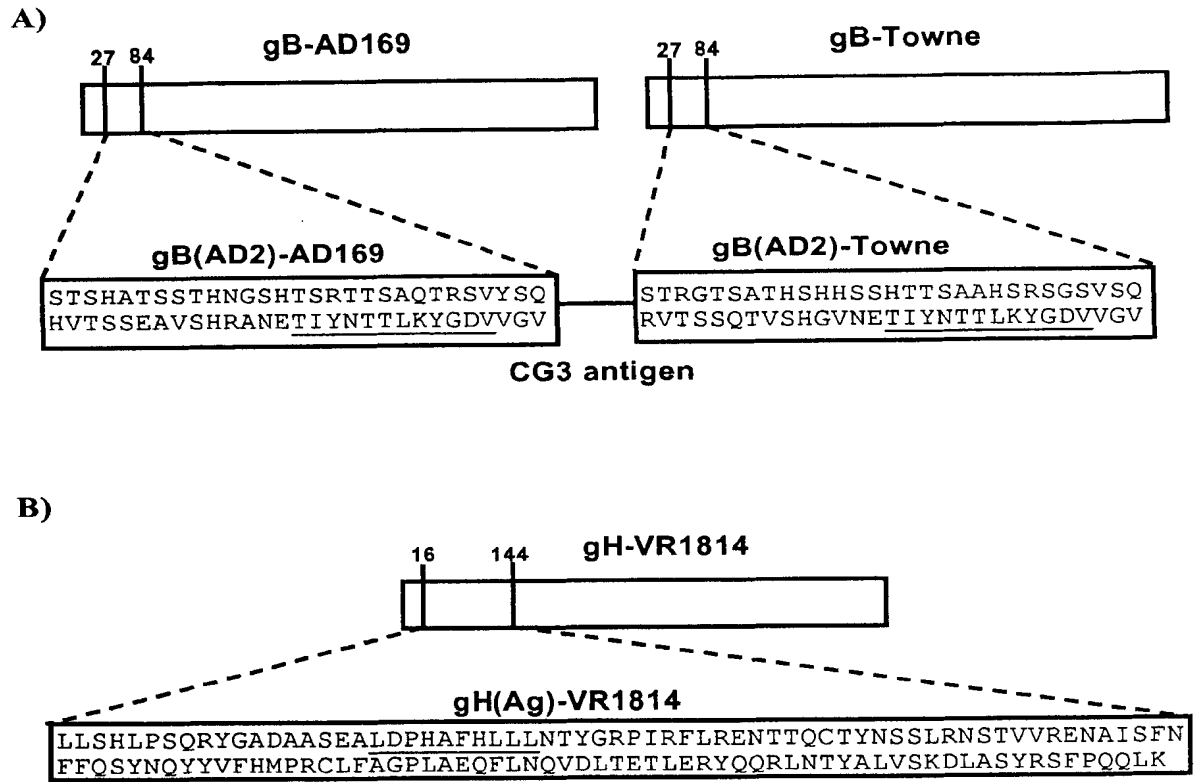


Fig. 2

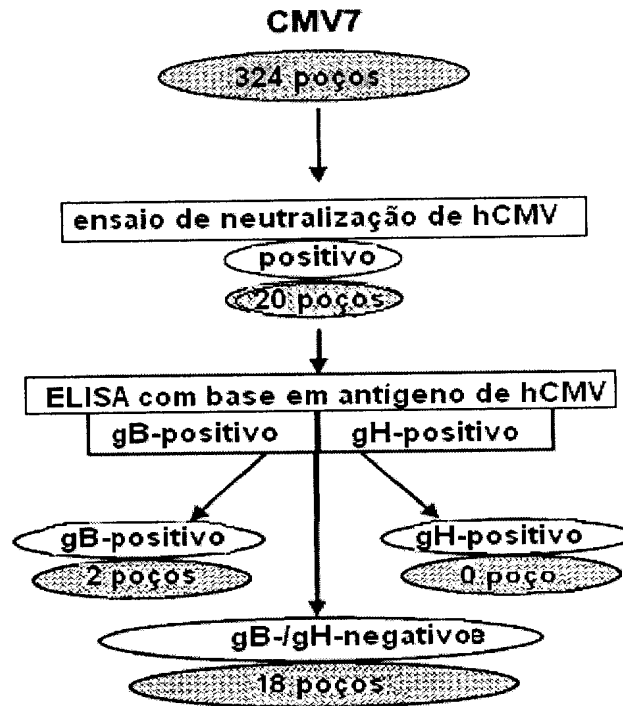
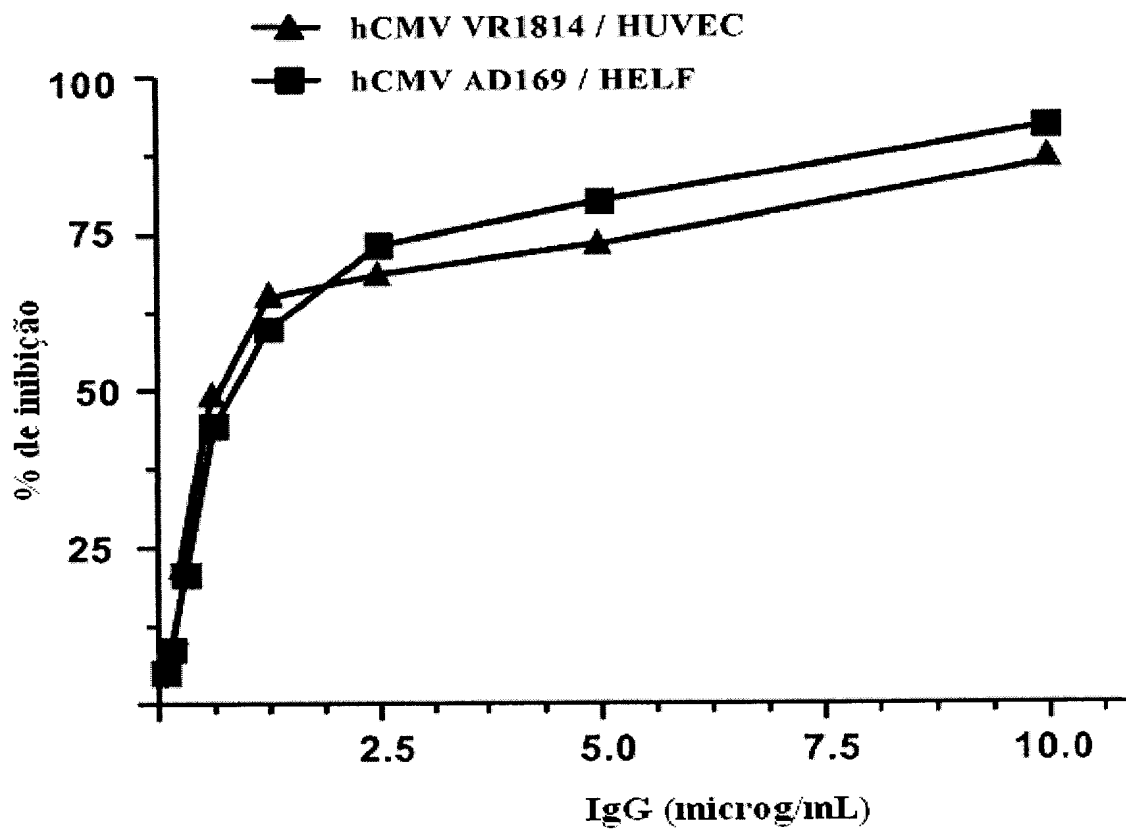


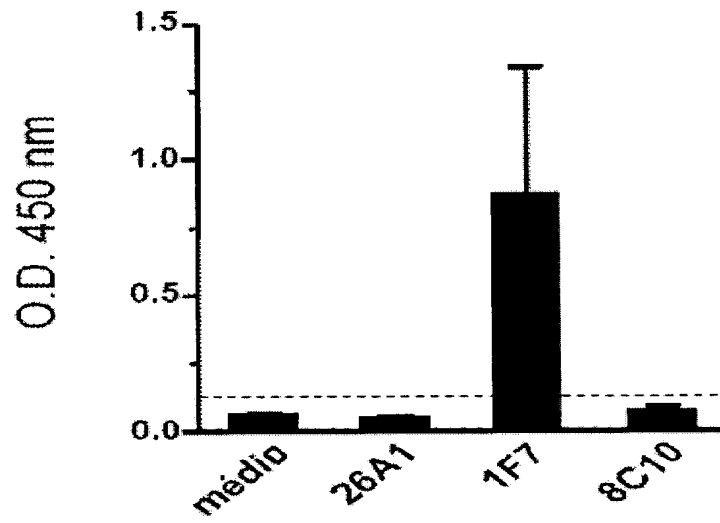
Fig. 3



4 / 10

Fig. 4

A)



B)

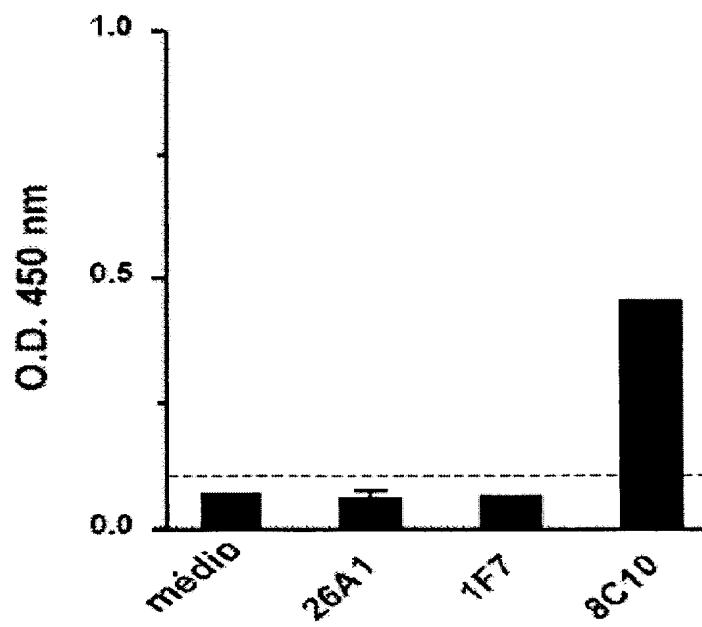


Fig. 6

A)

```

      10                               20
      . . . . .
      S Y V L T Q P P S V S V A P G Q T A R I
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      tcctatgtgctgactcagccaccctcgggtgtcagtgggcccaggacagacggccaggatt

      30                               40
      . . . . .
      P C G G N E I G S K S V H W Y Q Q K P G
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      gccctgcgggggaacgagattggaagtaagagtgtccactggtaccagcagaagccaggc

      50                               60
      . . . . .
      Q A P V L V V H D D S D R P S G I P D R
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      caggccccctgtgctggtcgtccatgatgacagcgaccggccctcagggatccctgaccga

      70                               80
      . . . . .
      F S G S N S G N T A T L T I S R V E A G
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      ttctctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggtcgaagccggg

      90                               100
      . . . . .
      D E A D Y Y C Q V W D S G S D H H V V F
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      gatgaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtggttagtgatcatcatgtggtattc

      110
      . . . . .
      G G G T K L T V L G
      | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
      ggcggagggaccaagctgaccgtcctaggt
  
```

B)

```

      10      20      30      40      50      60
      .....|.....|.....|.....|.....|.....|
      VL 26A1 SYVLTQPPSVSVAPGQTARIPCGGNEIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVHDDSDRPSGIPDR
              |-----|-----|
              LCDR1                LCDR2

      70      80      90      100     110
      .....|.....|.....|.....|.....|
      VL 26A1 FSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSGSDHHVVFSGGTKLTVLG
              |-----|-----|
              LCDR3
  
```

Fig. 7

atgaacatactgtggagcatgctcctgctggtggcagctcccagatgggtcctgtcccag 20
 M N I L W S M L L L V A A P R W V L S Q
 gtgcagctgcaggagtcgggcccaggactggtgaagccttcacagaccctgtccctcata 40
 V Q L Q E S G P G L V K P S Q T L S L I
 tgcactgtctctggtggctccgtcagcagtggtggtgactactggacctggatccgccaq 60
 C T V S G G S V S S G G D Y W T W I R Q
 caccaggggaagggcctggagtggttggttacatccattccagtggaatatcttctac 80
 H P G K G L E W L G Y I H S S G N I F Y
 aaccgctccctcaagagtcgactgaccttatcaatggacacgtctaagaaccaattcttc 100
 N P S L K S R L T L S M D T S K N Q F F
 ctgaagttgacctctgtgactgccgaggacacggccgtatattactgtgagagatctat 120
 L K L T S V T A A D T A V Y Y C A R V Y
 cataaggattttgtagtagtaccaggtgctttcccctttgaattctggttcgaccctgg 140
 H K D F V V V P G A F P F E F W F D P W
 ggccagggaaccctggtcaccgtctcctcaggatccgcctccaccaagggcccctggtc 160
 G Q G T L V T V S S G S A S T K G P S V
 ttcccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggacacagcggccctgggctgctg 180
 F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L
 gtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcggcctgaccagc 200
 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S
 ggcgtagcacaccttccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtg 220
 G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V
 gtgacctgtgcccagcagcttgggacccagactacatctgcaacgtgaatcacaag 240
 V T G T P S S L L G T Q T Y I C N V N H K
 cccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacaca 260
 P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T
 tgcccaccgtgcccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtcttcttcccccca 280
 C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
 aaacccaaggacaccctcatgatctcccggaccctgaggtcacatgctggtggtggac 300
 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D
 gtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgat 320
 V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H
 aatgccaagacaaagccgaggaggagcagtaacaacagcacgtaccgggtggtcagcgtc 340
 N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V
 ctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaac 360
 L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N
 aaagccctcccagccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaa 380
 K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
 ccacaggtgtacaccctgccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctg 400
 P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L
 acctgcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatggg 420
 T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G
 cagccggagacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttc 440
 Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F
 ctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgc 460
 L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C
 tccgtgatgatgaggtctctgcacaaccactacagcagaagagcctctccctgtctccg 480
 S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
 ggtaaatga
 G K stop 482

Fig. 8

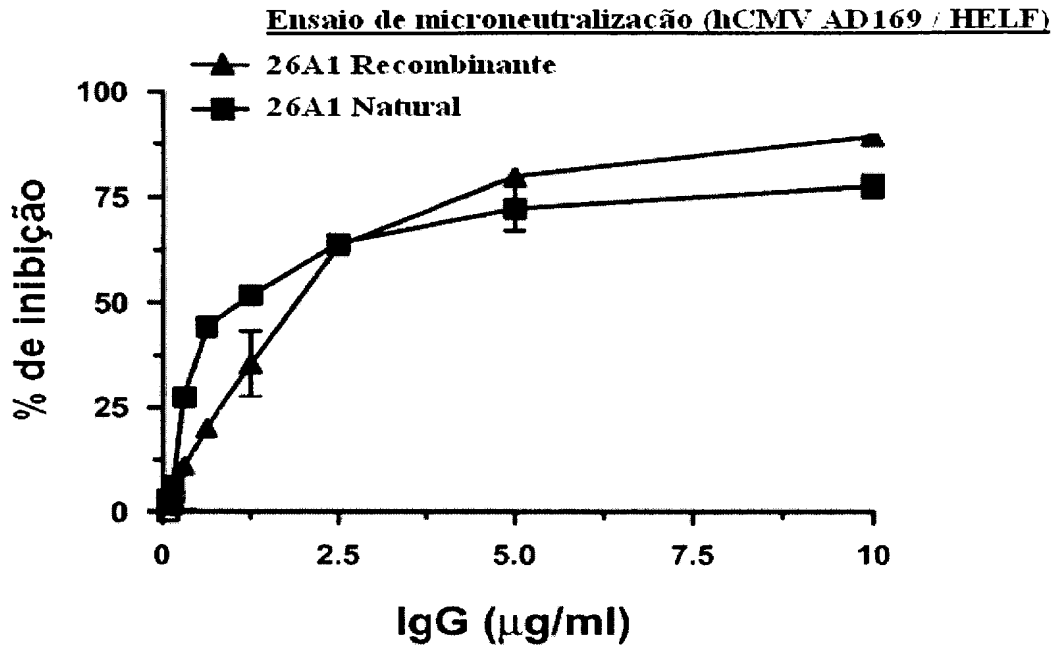
```

atggcctggaccggttctcctcctcggcctcctctctcactgcacaggttctgtgacctcc 20
M A W T V L L L G L L S H C T G S V T S
tatgtgctgactcagccaccctcgggtgcagtggccccaggacagacggccaggattccc 40
Y V L T Q P P S V S V A P G Q T A R I P
tgtggggggaacgagattggaagtaagagtgtccactggtaccagcagaagccaggccag 60
C G G N E I G S K S V H W Y Q Q K P G Q
gccctgtgctggtcgtccatgatgacagcgaccggccctcagggatccctgaccgattc 80
A P V L V V H D D S D R P S G I P D R F
tctggctccaactctgggaacacggccaccctgaccatcagcagggtcgaagccgggat 100
S G S N S G N T A T L T I S R V E A G D
gaggccgactattactgtcaggtgtgggatagtggtagtgatcatcatgtggtattcggc 120
E A D Y Y C Q V W D S G S D H H V V F G
ggagggaccaagctgaccgtcctaggtcagcccaaggctgccccctcggtcactctgttc 140
G G T K L T V L G Q P K A A P S V T L F
ccgcccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtgtctcataagtgac 160
P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D
ttctaccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcggga 180
F Y P G A V T V A W K A D S S P V K A G
gtggagaccaccacaccctccaacaagaagcaacaacaagtacgcggccagcagctatctg 200
V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L
agcctgacgcctgagcagtggaagtcccacagaagctacagctgccagggtcacgcatgaa 220
S L T P E Q W K S H R S Y S C Q V T H E
gggagcaccggtggagaagacagtgggcccctacagaatgttcatag 234
G S T V E K T V A P T E C S stop

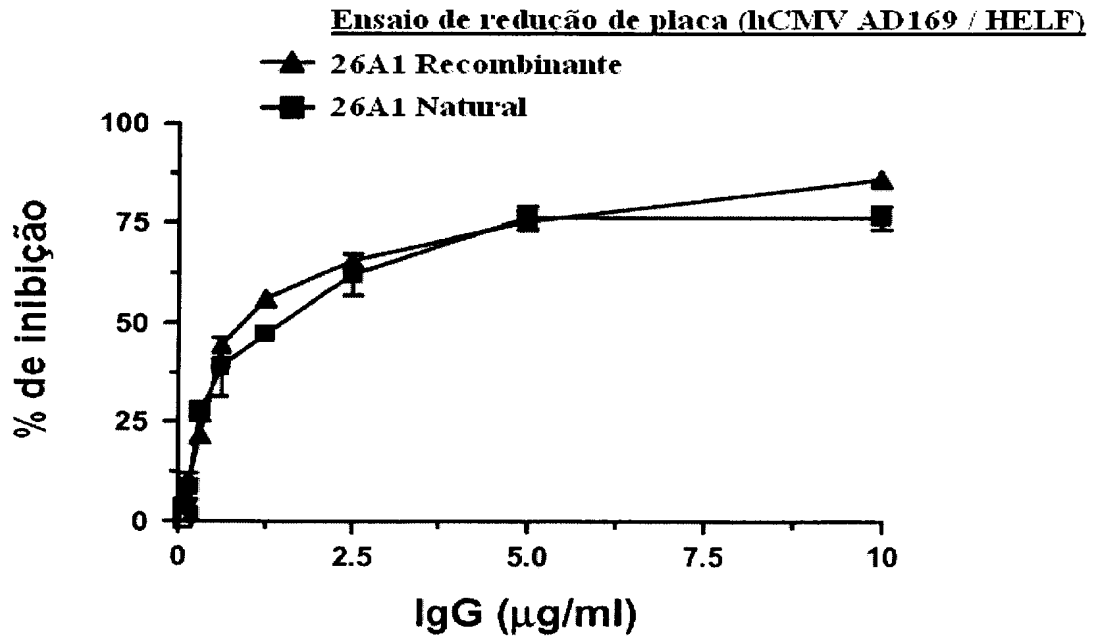
```

Fig. 9

A)



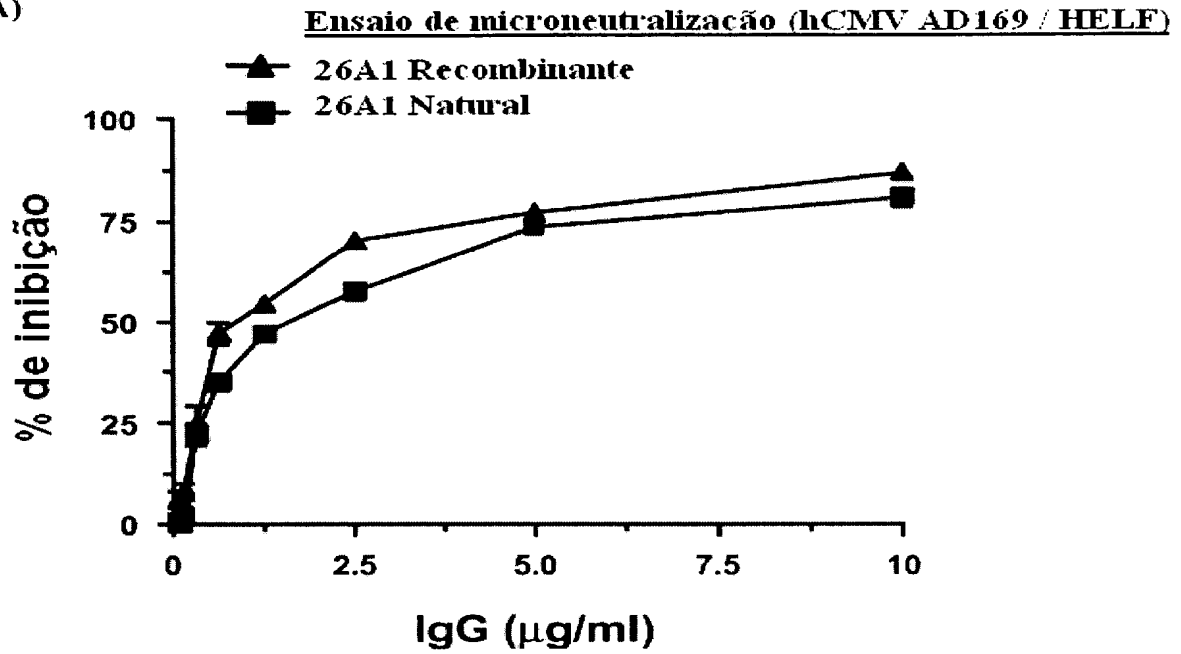
B)



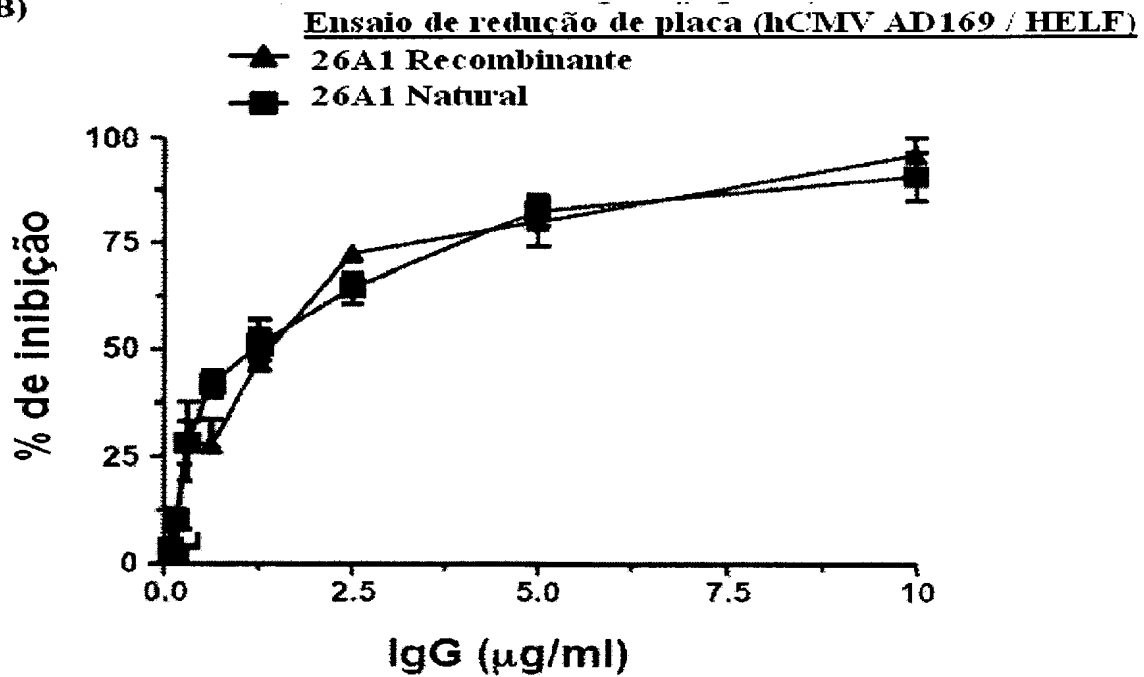
10 / 10

Fig. 10

A)



B)



RESUMO

Patente de Invenção “ANTICORPOS CONTRA CITOMEGALOVÍRUS HUMANO (HCMV)”.

Trata-se de novas sequências de anticorpo que se ligam a citomegalovírus humanos (hCMV) e neutralizam a infecção por hCMV. As novas seqüências podem ser empregadas no controle médico de infecções por hCMV, em particular para preparar composições farmacêuticas empregadas no tratamento profilático ou terapêutico de infecções por hCMV.