



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

(11) PI 0606790-5 B1

(22) Data do Depósito: 02/02/2006

(45) Data de Concessão: 09/10/2018



(54) Título: ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA, KIT, E, USO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO, OU DE UMA COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C12N 15/13; C12N 5/10; C07K 16/10; C07K 14/145; A61K 39/395; A61K 39/205; A61P 31/14; G01N 33/53

(30) Prioridade Unionista: 02/02/2005 US 60/649512

(73) Titular(es): UNIVERSITY OF MASSACHUSETTS E CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

(72) Inventor(es): DONNNA AMBROSINO; SUSAN SCHONHOFF; CHARLES RUPPRECHT; GREGORY J. BARCOCK; WILLIAM D. THOMAS JR.; ROBERT MANDELL

(85) Data do Início da Fase Nacional: 02/08/2007

“ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO, COMPOSIÇÃO, VETOR DE EXPRESSÃO, MICRORGANISMO TRANSGÊNICO, CÉLULA HOSPEDEIRA PROCARIÓTICA, KIT, E, USO DE UM ANTICORPO MONOCLONAL HUMANO ISOLADO OU PORÇÃO DE LIGAÇÃO DE ANTÍGENO DO MESMO, OU DE UMA COMPOSIÇÃO.”

Informação Relacionada

O pedido reivindica prioridade para o pedido de patente provisório US número 60/649.512, depositado em 2 de fevereiro de 2005, os conteúdos inteiros do qual são aqui incorporados por referência.

Os conteúdos de quaisquer patentes, pedidos de patente, e referências citadas por todo este relatório descritivo são aqui incorporados por referência nas suas totalidades.

Fundamentos da Invenção

A raiva é uma encefalite progressiva aguda causada pela infecção com um vírus de RNA da família *Rhabdoviridae* (gênero *lyssavirus*). Embora as fatalidades pela raiva humana sejam raras nas nações desenvolvidas (existem usualmente menos do que 5 mortes nos Estados Unidos a cada ano), números significantes de mortes são relatadas, por exemplo, na Índia, onde 50.000 morrem da doença e mais do que 500.000 são tratados. Mesmo nos Estados Unidos, 15.000 a 40.000 pessoas recebem tratamento anti-raiva a cada ano. Tipicamente, os cães são os maiores reservatórios da doença mas outros mamíferos tais como o racum, jaritataca, morcego, e raposa são reservatórios freqüentes. A transmissão do vírus de um reservatório animal para o ser humano usualmente ocorre por uma mordida ou arranhão que penetre a pele. Visto que a raiva em seres humanos é quase

sempre fatal, mesmo uma suspeita de infecção deve ser tratada com um regime de tratamento pós exposição agressivo.

O tratamento pós exposição da raiva em seres humanos consiste do cuidado do ferimento apropriado, administração local de imunoglobulina sérica anti-raiva infiltrada no e em torno do ferimento, e administração de doses múltiplas de vacina contra a raiva usualmente durante vários dias e semanas (para uma revisão da profilaxia contra a raiva, ver, por exemplo, Rupprecht e Gibbons *et al.*, N Engl J Med 351: 25 (2004)). O cuidado ao ferimento apropriado pode diminuir a quantidade de vírus que sobrevive para entrar no paciente. A infiltração da área com imunoglobulina sérica anti-raiva pode ligar ao vírus da raiva e ajudar a removê-lo diminuindo desse modo a carga viral (pela imunização passiva). A administração de doses múltiplas de vacina contra a raiva (imunização ativa), usualmente na forma de uma primeira dose seguida por doses de reforço subseqüentes, permitem que o paciente produza uma imunidade ativa vigorosa, incluindo respostas humorais e celulares. As fontes correntes de imunoglobulina sérica anti-raiva são obtidas a partir do sangue de doadores humanos vacinados. Outras fontes de imunoglobulina sérica anti-raiva, por exemplo, eqüína ou murina, são consideradas inaceitáveis. As fontes correntes de vacina contra a raiva são produzidas em linhagens de célula e quimicamente inativadas e liofilizadas. Embora estes agentes, quando administrados em tempo, sejam altamente eficazes, certos obstáculos permanecem.

Por exemplo, existem poucos fabricantes destes agentes anti-raiva e estes permanecem relativamente caros, especialmente no mundo em desenvolvimento onde eles são mais necessários. Além disso, a imunoglobulina sérica anti-raiva humana, porque a mesma é colhida do soro de doadores humanos, deve ser altamente purificada para prevenir a transmissão de quaisquer agentes estranhos. Além disso, a vacina anti-raiva requer cultura celular de trabalho intensivo e etapas de inativação e

purificação extensivas. Conseqüentemente, as imunoterapias melhoradas para tratar e prevenir a infecção pela raiva são necessárias.

Sumario da Invenção

A presente invenção soluciona os problemas precedentes pelo fornecimento de um anticorpo monoclonal anti-raiva totalmente humano recombinate que especificamente se liga a uma ampla variedade de isolados do vírus da raiva e inibe a capacidade do vírus para infectar células.

Em uma forma de realização, isto é demonstrado pela capacidade dos anticorpos para neutralizar (isto é, inibir ou bloquear) o vírus da raiva *in vitro* (por exemplo, em um ensaio RFFIT). Em uma outra forma de realização, isto é demonstrado pela capacidade dos anticorpos para inibir a infectividade do vírus da raiva *in vivo* em um paciente, tal como um animal ou um ser humano.

Os anticorpos monoclonais humanos da invenção podem ser fabricados eficientemente, em quantidades virtualmente ilimitadas, na forma altamente purificada. Conseqüentemente, os anticorpos são adequados para prognosticar, diagnosticar, e/ou tratar um indivíduo exposto ou suspeito de ter sido exposto à raiva. Os anticorpos da invenção são particularmente vantajosos para a profilaxia na pós exposição à raiva (PEP) visto que eles eliminam a necessidade quanto a uma fonte doadora de imunoglobulina sérica anti-raiva humana. Os anticorpos podem ser produzidos usando uma variedade de técnicas para fabricar anticorpos humanos conhecidas na técnica. Por exemplo, como aqui exemplificado, os anticorpos podem ser gerados em animais transgênicos que expressem segmentos de gene da imunoglobulina humana, por exemplo, camundongos transgênicos que compreendam um local de Ig humana. Além disso, os anticorpos podem ser administrados sozinhos ou em combinação, por exemplo, com um vacina antivírus da raiva ou outros anticorpos, para aumentar as taxas de sobrevivência de pacientes (por exemplo, animais e seres humanos) infectados com o vírus da raiva.

Conseqüentemente, a invenção fornece diversas vantagens que incluem, mas não são limitadas aos seguintes:

- um anticorpo anti-raiva recombinante totalmente humano para prognosticar, diagnosticar, e/ou tratar o vírus da raiva ou conduzir a profilaxia pós exposição ao vírus da raiva (PEP) em um paciente, por exemplo, proteger da ou inibir a morbidez ou mortalidade mediadas pelo vírus da raiva em um paciente;

- uma composição (por exemplo, farmacêutica) e/ou um kit que compreenda um ou mais anticorpos anti-raiva recombinantes totalmente humanos que possam ser usados sozinhos ou em combinação com vacinas comercialmente disponíveis para tratar a infecção pela raiva e/ou para conduzir a PEP em um paciente; e

- um método melhorado de imunoterapia passiva para tratar um paciente infectado com o vírus da raiva (por exemplo, em necessidade de profilaxia pós exposição ao vírus da raiva (PEP)) que possa ser usado sozinho ou em combinação com a imunoterapia ativa (vacina contra a raiva).

Em uma forma de realização, os anticorpos monoclonais humanos ou porções de ligação de antígeno destes da invenção especificamente se ligam à glicoproteína G do vírus da raiva. Anticorpos particulares ou porções de ligação de antígeno destes especificamente se ligam a um epítipo dentro da metade do terminal N da glicoproteína G do vírus da raiva. Outros anticorpos particulares ou porções de ligação de antígeno destes especificamente se ligam a um epítipo dentro do domínio de terminal C do vírus da raiva. Tais epítipos podem residir, por exemplo, dentro dos aminoácidos 1-50, 50-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-350, 350-400, 400-450, 450-500, 500-524 da glicoproteína G do vírus da raiva ou qualquer intervalo, porção ou faixa destes. Em uma forma de realização, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes especificamente se ligam a um epítipo dentro da metade do terminal N da

glicoproteína G do vírus da raiva, isto é, entre cerca dos resíduos de aminoácido 19-422. Em uma outra forma de realização, o epítipo da glicoproteína G da raiva compreende resíduos de aminoácido 336-442. Em uma forma de realização, a glicoproteína G da raiva compreende o resíduo de aminoácido 336 assim como alterações deste, tais como substituições ou deleções.

Em uma forma de realização relacionada, o epítipo da glicoproteína G da raiva compreende um epítipo linear, epítipo conformacional, epítipo descontínuo ou combinações de tais epítipos.

Em uma outra forma de realização relacionada, o epítipo da glicoproteína G da raiva consiste de sítio antigênico I, sítio antigênico II, sítio antigênico III, sítio antigênico menor A ou combinações de tais sítios antigênicos, por exemplo, sítio antigênico III e sítio menor A.

Em outras formas de realização, os anticorpos monoclonais humanos ou porções de ligação de antígeno destes podem ser caracterizados como ligando especificamente ao vírus da raiva com um K_D de menos do que cerca de 10×10^{-6} M. Em uma forma de realização particular, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno deste especificamente se liga ao vírus da raiva (por exemplo, uma glicoproteína G do vírus da raiva) com um K_D de pelo menos cerca de 10×10^{-7} M, pelo menos cerca de 10×10^{-8} M, pelo menos cerca de 10×10^{-9} M, pelo menos cerca de 10×10^{-10} M, pelo menos cerca de 10×10^{-11} M ou pelo menos cerca de 10×10^{-12} M ou um K_D ainda mais favorável.

Em várias outras formas de realização, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes incluem uma região de cadeia pesada variável que compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácido da região de cadeia pesada variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NO: 1), 6G11 (SEQ ID NO: 15), 5G5, 2B10 ou 1E5.

Em outras formas de realização, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes incluem uma região de cadeia leve variável que compreende uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácido da região de cadeia leve variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NO: 2), 6G11 (SEQ ID NO: 16), 5G5, 2B10 ou 1E5.

Ainda em outras formas de realização, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes incluem tanto uma região de cadeia pesada variável que compreenda uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácido da região de cadeia pesada variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NO: 1), 6G11 (SEQ ID NO: 15), 5G5, 2B10 ou 1E5), e uma região de cadeia leve variável que compreenda uma sequência de aminoácido pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% ou mais idêntica a uma sequência de aminoácido de cadeia leve variável do clone 17C7 (SEQ ID NO: 2), 6G11 (SEQ ID NO: 16), 5G5, 2B10 ou 1E5.

Em certas outras formas de realização, os anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes especificamente se ligam a um epítopo que se sobrepõem com um epítopo ligado por um anticorpo produzido pelo clone 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 ou 1E5 e/ou compete quanto a ligação a um vírus da raiva ou porção deste com um anticorpo produzido pelo clone 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 ou 1E5.

As regiões de cadeia pesada e leve variáveis dos anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes tipicamente incluem uma ou mais regiões determinadoras de complementaridade (CDRs). Estas incluem as regiões de CDR1, CDR2, e CDR3. Em formas de realização particulares, as CDRs de cadeia pesada variáveis são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% ou mais idênticas a uma CDR do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NOs: 3, 4, 5), 6G11 (SEQ ID NOs: 17, 18, 19), 5G5, 2B10 ou 1E5

(também mostrado na Tabela 1). Em outras formas de realização particulares, as CDRs de cadeia leve variáveis são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% ou mais idênticas a uma CDR de uma região de cadeia leve variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NOs: 6, 7, 8), 6G11 (SEQ ID NOs: 20, 21, 22), 5G5, 2B10 ou 1E5 (também mostrado na Tabela 2).

Conseqüentemente, anticorpos particular ou fragmentos da invenção compreendem uma região de cadeia pesada variável que inclui uma ou mais regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% ou mais idênticas a uma CDR de uma região de cadeia pesada variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NOs: 3, 4, 5), 6G11 (SEQ ID NOs: 17, 18, 19), 5G5, 2B10 ou 1E5 e uma região de cadeia leve variável que inclui uma ou mais CDRs que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais idêntica a uma CDR de uma região de cadeia leve variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NOs: 6, 7, 8), 6G11 (SEQ ID NOs: 20, 21, 22), 5G5, 2B10 ou 1E5.

A região de cadeia pesada variável dos anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes também podem incluir todas as três CDRs que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95% ou 99% ou mais idênticas às CDRs da região de cadeia pesada variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NOs: 3, 4, 5), 6G11 (SEQ ID NOs: 17, 18, 19), 5G5, 2B10 ou 1E5 e/ou todas as três CDRs que são pelo menos 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais idênticas às CDRs da região de cadeia leve variável do anticorpo produzido pelo clone 17C7 (SEQ ID NOs: 6, 7, 8), 6G11 (SEQ ID NOs: 20, 21, 22), 5G5, 2B10 ou 1E5.

Em uma outra forma de realização da invenção, os anticorpos humanos ou porções de ligação de antígeno destes (a) incluem uma região variável de cadeia pesada que é codificada por ou derivada de (isto é, é o produto de) um gene VH 3-30-3 ou VH 3-33 humano; e/ou (b) incluem uma região variável de cadeia leve que é codificada por ou derivada de um gene

VK humano selecionado do grupo que consiste de Vκ L6, Vκ L11, Vκ L13, Vκ L15 ou Vκ L19.

Os anticorpos monoclonais humanos da presente invenção incluem anticorpos de plena extensão, por exemplo, que incluem um domínio efetor, (por exemplo, um domínio Fc), assim como porções ou fragmentos de anticorpo, tais como anticorpos de cadeia única e fragmentos Fab. Os anticorpos também podem ser ligados a uma variedade de agentes terapêuticos (por exemplo, agentes antivirais ou toxinas) e/ou um rótulo.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta polipeptídeos isolados que incluem uma porção de ligação de antígeno de um anticorpo produzido pelo clone de hibridoma 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 ou 1E5 (também aqui aludido como "17C7", "6G11", "5G5", "2B10", e "1E5").

Em um outro aspecto, a invenção apresenta ácidos nucleicos isolados incluindo uma seqüência que codifica uma região variável de cadeia pesada de anticorpo que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais idêntica à SEQ ID NO: 13 ou 23. A invenção também apresenta ácidos nucleicos isolados que incluem uma seqüência que codifica um região variável de cadeia leve de anticorpo que é pelo menos 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% ou mais idêntica à SEQ ID NO: 14 ou 24. A invenção também apresenta vetores de expressão que incluem qualquer um dos ácidos nucleicos precedentes sozinhos ou em combinação (por exemplo, expressados a partir de um ou mais vetores), assim como células hospedeiras que compreendem tais vetores de expressão.

As células hospedeiras adequadas para a expressão de anticorpos da invenção incluem uma variedade de células eucarióticas, por exemplo, células de levedura, células de mamífero, por exemplo, Células do ovário do hamster chinês (CHO), células NSO, células de mieloma ou células vegetais.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta composições e kits

que incluem um ou mais anticorpos monoclonais humanos isolados ou porções de ligação de antígeno destes como aqui descritos que especificamente se ligam ao vírus da raiva e inibem a capacidade do vírus para infectar células de mamífero. A composição ou kit podem incluir ainda um ou mais anticorpos (por exemplo, anticorpos monoclonais ou policlonais humanos) ou porções de ligação de antígeno destes que especificamente se ligam ao vírus da raiva. Em uma forma de realização, o anticorpo policlonal ou porção de ligação de antígeno deste especificamente se liga à glicoproteína G do vírus da raiva. Em uma forma de realização particular, a composição ou kit incluem tanto (a) um anticorpo monoclonal humano isolado que especificamente se liga a um primeiro vírus da raiva isolado; quanto (b) um anticorpo monoclonal humano isolado que especificamente se liga a um segundo vírus da raiva isolado.

A invenção também apresenta métodos de tratar doença do vírus da raiva em um paciente pela administração ao paciente de um anticorpo monoclonal humano isolado ou porção de ligação de antígeno deste como aqui descrito (isto é, que especificamente se liga ao vírus da raiva) em um quantidade eficaz para inibir a doença do vírus da raiva, por exemplo, os sintomas ou morbidez mediados pelo vírus da raiva.

Os anticorpos monoclonais humanos ou porções destes (e as composições que compreendem os anticorpos ou porções destes) da invenção podem ser administrados em uma variedade de maneiras adequadas, por exemplo, intravenosa (IV), subcutânea (SC), e de modo preferível, intramuscularmente (IM) ao paciente. O anticorpo ou porção de ligação de antígeno deste pode ser administrado sozinho ou em combinação com um outro agente terapêutico, por exemplo, um segundo anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação de antígeno deste. Em um exemplo, o segundo anticorpo monoclonal humano ou porção de ligação de antígeno deste especificamente se liga a um segundo vírus da raiva isolado que difere do

isolado ligado ao primeiro anticorpo. Em um outro exemplo, o anticorpo é administrado junto com um outro agente, por exemplo, um agente antiviral. Em um outro exemplo, o anticorpo é administrado junto com uma gama-globulina policlonal (por exemplo, gama-globulina humana). Em um outro exemplo, o anticorpo é administrado antes, depois ou contemporaneamente com um vírus da vacina contra a raiva.

Em um outro aspecto, a invenção apresenta métodos para fabricar um anticorpo ou porção de ligação de antígeno deste que especificamente se liga a um vírus da raiva. Em uma forma de realização, o método envolve imunizar um animal não humano transgênico tendo um genoma que compreende um transgene da cadeia pesada humana e um transgene da cadeia leve humana com uma composição que inclui um vírus da raiva, por exemplo, vírus vivo ou inativado e isolando um anticorpo, célula que produz anticorpo ou ácido nucleico que codifica anticorpo do animal. O vírus da raiva pode ser inativado, por exemplo, pelo tratamento químico e/ou liofilização. O método pode incluir ainda avaliar a ligação do anticorpo ao vírus da raiva ou glicoproteína G do vírus da raiva.

A invenção também apresenta métodos para fabricar os anticorpos ou porções de ligação de antígeno destes pela expressão dos ácidos nucleicos que codifica anticorpos humanos em uma célula hospedeira (por exemplo, ácidos nucleicos que codificam a porção da região de ligação de antígeno de um anticorpo). Já em um outro aspecto, a invenção apresenta um hibridoma ou transfectoma incluindo os ácido nucleicos anteriormente mencionados.

A invenção também apresenta um método para fabricar um hibridoma que expresse um anticorpo que especificamente se liga a um vírus da raiva pela imunização de um animal não humano transgênico tendo um genoma que inclua um transgene da cadeia pesada humana e um transgene da cadeia leve humana, com uma composição que inclua o vírus da raiva ou

glicoproteína G do vírus da raiva; isolando esplenócitos do animal; gerando hibridomas a partir dos esplenócitos; e selecionando um hibridoma que produza um anticorpo que especificamente se liga ao vírus da raiva ou proteína do vírus da raiva deste.

5 O tratamento de seres humanos com anticorpos monoclonais humanos oferece diversas vantagens. Por exemplo, os anticorpos são prováveis de serem menos imunogênico em seres humanos do que os anticorpos não humanos. A terapia também é rápida porque a inativação do vírus da raiva pode ocorrer tão logo o anticorpo atinja sítios de infecção e
10 diretamente neutralizam o vírus da raiva que causa a doença. Os anticorpos humanos também se localizam nos sítios apropriados em seres humanos mais eficientemente do que os anticorpos não humanos. Além disso, o tratamento é específico para o vírus da raiva, e é recombinante e altamente purificado e, diferente das terapias tradicionais, evita o potencial de ser contaminado com
15 agentes estranhos.

Outras características e vantagens da invenção estarão evidentes a partir da seguinte descrição detalhada, e das reivindicações.

Descrição Resumida dos Desenhos

20 A Figura 1 mostra a sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada e leve de um anticorpo anti-raiva, recombinante, humano (isto é, o clone 17C7). Estas seqüências correspondem às SEQ ID NOs: 1 e 2, respectivamente. As regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) para cada cadeia são indicadas, correspondendo às SEQ ID NOs: 3, 4, e 5 (da cadeia pesada) e 6, 7, e 8 (da cadeia leve).

25 A Figura 2 mostra a sequência de aminoácido da região variável de cadeia pesada e leve de um anticorpo anti-raiva, recombinante, humano (isto é, o clone 6G11). Estas seqüências correspondem às SEQ ID NOs: 15 e 16, respectivamente. As regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) para cada cadeia são indicadas, correspondendo a

SEQ ID NOs: 17, 18, e 19 (da cadeia pesada) e 20, 21, e 22 (da cadeia leve).

A Figura 3 é uma representação esquemática do vírus da glicoproteína G recombinante da raiva indicando fragmentos que foram analisados para estudos do mapeamento de epítipo. O anticorpo humano 17C7 foi determinado ligar epítipo(s) dentro dos resíduos de aminoácido 19-422 como determinado pela imunoprecipitação e imunomancha.

A Figura 4 mostra que HuMab 17C7 neutraliza o vírus da raiva como determinado por RFFIT quando diluído em série de 1:5 para 1:390625 quando comparado com o soro humano (hRIG).

Figura 5 As glicoproteínas ERA-N e ERA-CO foram expressadas em células 293T e facilmente expressadas quando otimizadas no códon (A) e capazes de serem ligadas por 17C7 (BD) quando expressadas na superfície de células.

A Figura 6 mostra que HuMab 17C7 reconhece o ectodomínio G da raiva (A) e sob condições não redutoras (B) assim como a proteína G da cepa ERA (C).

A Figura 7 mostra que HuMab 17C7 reconhece as glicoproteínas ERA mutantes N336K e N336D (A) pelo ELISA e pela imunomancha (B).

A Figura 8 mostra que HuMab 17C7 neutraliza a infecção do pseudovírus ERA de células (A-B) e as conseqüências de várias mutações para a proteína G de ERA (C-D) com respeito à ligação de 17C7 a esta.

A Figura 9 mostra as conseqüências de várias mutações para a proteína G de ERA (AB) com respeito à ligação de 17C7 a esta.

Descrição Detalhada da Invenção

De modo a fornecer um entendimento claro do relatório descritivo e das reivindicações, as seguintes definições são convenientemente fornecidas abaixo.

Definições

Como aqui usado, o termo “vírus da raiva” refere-se ao virion ou porção deste, por exemplo porção de proteína, tal como a glicoproteína G do vírus da raiva que é codificada pelo RNA do vírus da raiva.

O termo “anticorpo antivírus da raiva” é um anticorpo que interage com (por exemplo, se liga a) um vírus da raiva ou uma proteína, carboidrato, lipídeo ou outro componente produzido pelo ou associado com o vírus da raiva. Uma “glicoproteína G do anticorpo do vírus da raiva” é um anticorpo que liga a uma glicoproteína G do vírus da raiva ou um fragmento destes. Um antivírus da raiva ou anticorpo de glicoproteína G pode ligar-se a um epítopo, por exemplo, um epítopo conformacional ou um linear ou a uma porção ou fragmento do vírus ou componente deste.

O termo “anticorpo humano” é um anticorpo que tem regiões variáveis e constantes derivadas das seqüências de imunoglobulina da linha germinativa humana. Os anticorpos humanos aqui descritos podem incluir resíduos de aminoácido não codificados pelas seqüências de imunoglobulina da linha germinativa humana (por exemplo, mutações introduzidas pela mutagênese aleatória ou específica de sítio *in vitro* ou pela mutação somática *in vivo*).

Um anticorpo antivírus da raiva ou porção de ligação de antígeno deste, pode ser administrado sozinho ou em combinação com um segundo agente. O paciente pode ser um paciente infectado ou suspeito de estar infectado com o vírus da raiva ou tendo um sintoma de doença mediada pelo vírus da raiva (por exemplo, uma neuropatologia, encefalomielite ou título sérico de imunoglobulina anti-raiva). O tratamento pode ser usado para curar, sarar, aliviar, abrandar, alterar, remediar, melhorar, paliar, restabelecer ou afetar a infecção e a doença associada com a infecção, os sintomas da doença ou uma pré disposição para a doença. Para o controle clínico da infecção do vírus da raiva, “tratamento” é freqüentemente entendido significar a profilaxia ou prevenção de uma infecção produtiva antes do início da

enfermidade.

Uma quantidade de um anticorpo antivírus da raiva eficaz para tratar um vírus da infecção pela raiva ou uma "quantidade terapeuticamente eficaz" é uma quantidade do anticorpo que é eficaz, na administração de dose única ou múltipla a um paciente, na inibição da infecção pelo vírus da raiva, doença ou seqüelas desta, em um paciente. Uma quantidade terapeuticamente eficaz do anticorpo ou fragmento de anticorpo pode variar de acordo com fatores tais como o estado de doença, local de ferimento, cepa ou isolado do vírus da raiva, vetor animal do vírus da raiva, idade, sexo, e peso do indivíduo, e a capacidade do anticorpo ou porção do anticorpo para evocar uma resposta desejada no indivíduo. Uma quantidade terapeuticamente eficaz também é uma em que quaisquer efeitos tóxicos ou nocivos do anticorpo ou porção de anticorpo são excedidas pelos efeitos terapeuticamente benéficos. A capacidade de um anticorpo para inibir um parâmetro mensurável pode ser avaliado em um sistema modelo animal preditivo da eficácia em seres humanos. Por exemplo, a capacidade de um anticorpo antivírus da raiva para proteger hamsters da inoculação letal com o vírus da raiva pode prognosticar a eficácia em seres humanos, como descrito nos Exemplos. Alternativamente, esta propriedade de um anticorpo ou composição de anticorpo pode ser avaliada examinando-se a capacidade do composto para modular as interações do vírus da raiva/célula, por exemplo, ligação, infecção, virulência, e outras, *in vitro* pelos ensaios conhecidos pelo técnico habilitado. Os ensaios *in vitro* incluem os ensaios de ligação, tais como ELISA, e ensaios de neutralização.

Uma quantidade de um anticorpo antivírus da raiva eficaz para prevenir um distúrbio ou uma "quantidade profilaticamente eficaz," do anticorpo é uma quantidade que é eficaz, na administração de dose única ou múltipla ao paciente, na prevenção ou retardar a ocorrência do início ou recorrência do vírus da raiva ou inibir um sintoma deste. Entretanto, se intervalos de tempo mais longos de proteção são desejados, doses aumentadas

ou mais freqüentes podem ser administradas.

Os termos “antagonizar”, “induzir”, “inibir”, “potenciar”, “elevar”, “aumentar”, “diminuir” ou coisa parecida, por exemplo, que denotam diferenças quantitativas entre dois estados, referem-se a uma
5 diferença, por exemplo, uma diferença estatisticamente ou clinicamente significativa, entre os dois estados.

O termo “ligação específica” ou “especificamente se liga a” refere-se à capacidade de um anticorpo para ligar-se a um vírus da raiva ou porção deste, com uma afinidade de pelo menos 1×10^{-6} M, e/ou liga-se a um
10 vírus da raiva ou porção deste, com uma afinidade que é pelo menos duas vezes maior do que a sua afinidade quanto a um antígeno não específico.

Um “anticorpo” é uma proteína incluindo pelo menos uma ou duas, regiões variáveis de cadeia pesada (H) (abreviada aqui como VH), e pelo menos uma ou duas regiões variáveis de cadeia leve (L) (abreviada aqui
15 como VL). As regiões VH e VL podem ser ainda subdivididas em regiões de hipervariabilidade, chamada de “regiões determinadoras de complementaridade” (CDRs), intercaladas com regiões que são mais conservadas, chamadas de “regiões de estrutura” (FR). A extensão da região de estrutura e as CDRs foram precisamente definidas (ver, Kabat, E. A., *et al.*
20 *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edição, US Department of Health and Human Services, NM Publication N° 91-3242, 1991, e Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, 1987, que são aqui incorporadas por referência). Preferivelmente, cada VH e VL é composta de três CDRs e quatro FRs, dispostas do término amino para o término carbóxi
25 na seguinte ordem: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

As regiões VH ou VL do anticorpo podem incluir ainda todo ou parte de uma região constante de cadeia pesada ou leve. Em uma forma de realização, o anticorpo é um tetrâmero de duas cadeias de imunoglobulina pesada e duas cadeias de imunoglobulina leve, em que as cadeias de

imunoglobulina pesada e leve são inter-conectadas, por exemplo, pelas ligações de dissulfeto. A região constante de cadeia pesada incluem três domínios, CH1, CH2 e CH3. A região constante de cadeia leve é compreendida de um domínio, CL. A região variável das cadeias pesada e leve contém um domínio de ligação que interage com um antígeno. As regiões constantes dos anticorpos tipicamente medeiam a ligação do anticorpo aos tecidos ou fatores hospedeiros, incluindo várias células do sistema imune (por exemplo, células efectoras) e o primeiro componente (C1q) do sistema de complemento clássicos. O termo “anticorpo” inclui imunoglobulinas intactas dos tipos IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (assim como subtipos destes), em que as cadeias leves da imunoglobulina podem ser de tipos capá ou lambda.

O termo “imunoglobulina” refere-se a uma proteína que consiste de um ou mais polipeptídeos substancialmente codificados pelos genes da imunoglobulina. Os genes da imunoglobulina humana reconhecidos que incluem os genes da região constante capá, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gama (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta (IgD), épsilon (IgE), e mu (IgM), assim como a miríade de genes da região variável da imunoglobulina. As “cadeias leves” da imunoglobulina de tamanho natural (cerca de 25 KD e 214 aminoácidos) são codificadas por um gene da região variável no término NH₂ (cerca de 110 aminoácidos) e um gene da região constante capá ou lambda no término COOH. As “cadeias pesadas” de imunoglobulina de tamanho natural (cerca de 50 KD e 446 aminoácidos), são similarmente codificadas por um gene da região variável (cerca de 116 aminoácidos) e um dos outros genes da região constante anteriormente mencionado, por exemplo, gama (que codifica cerca de 330 aminoácidos). O termo “imunoglobulina” inclui uma imunoglobulina tendo: CDRs de uma fonte humana ou não humana. A estrutura da imunoglobulina pode ser humana, humanizada ou não humana, por exemplo, uma estrutura de murino modificada para diminuir a antigenicidade em seres humanos ou uma estrutura sintética, por exemplo,

uma seqüência de consenso. Uma imunoglobulina madura/ região variável de anticorpo é tipicamente destituída de uma seqüência líder. Imunoglobulinas / anticorpos podem ser ainda distinguidos pelas suas regiões constantes em classes (por exemplo, IgA, IgD, IgE, IgG ou IgM) e subclasses ou isotipos (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4).

O termo “porção de ligação de antígeno” de um anticorpo (ou simplesmente “porção de anticorpo,” ou “porção”), como aqui usado, refere-se a uma porção de um anticorpo que especificamente se liga a um vírus da raiva ou componente deste (por exemplo, glicoproteína G), por exemplo, uma molécula em que uma ou mais cadeias de imunoglobulina não é de tamanho natural, mas que especificamente se liga a um vírus da raiva ou componente deste. Os exemplos de porções de ligação abrangidas dentro do termo “porção de ligação de antígeno” de um anticorpo incluem (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente que consiste dos domínios VL, VH, CL e CH1; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente que compreende dois fragmento Fabs ligados por uma ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd que consiste dos domínios VH e CH1; (iv) um fragmento Fv que consiste dos domínios VL e VH de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341: 544-546, 1989), que consiste de um domínio VH; e (vi) uma região determinadora de complementaridade isolada (CDR) tendo estrutura suficiente para ligar especificamente, por exemplo, uma porção de ligação de antígeno de uma região variável. Uma porção de ligação de antígeno de uma região variável de cadeia leve e uma porção de ligação de antígeno de uma região variável de cadeia pesada, por exemplo, os dois domínios do fragmento Fv, VL e VH, podem ser unidos, usando métodos recombinantes, por um ligador sintético que possibilite que eles sejam fabricados como uma cadeia de proteína única em que as regiões VL e VH unem-se para formar moléculas monovalentes (conhecidas como Fv de cadeia única (scFv); ver por exemplo, Bird *et al.*

(1988) Science 242: 423-426; e Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883). Tais anticorpos de cadeia única também são abrangidos dentro do termo “porção de ligação de antígeno” de um anticorpo. Estas porções de anticorpo são obtidas usando técnicas convencionais conhecidas por aqueles com habilitados na técnica, e as porções são triadas quanto a utilidade na mesma maneira como o são os anticorpos intactos.

O termo “anticorpo monoespecífico” refere-se a um anticorpo que demonstra uma especificidade e afinidade de ligação única para um alvo particular, por exemplo, epítopo. Este termo inclui um “anticorpo monoclonal” ou “composição de anticorpo monoclonal,” que como aqui usado refere-se a uma preparação de anticorpos ou porções destes com uma composição molecular única.

O termo anticorpo “recombinante”, como aqui usado, refere-se aos anticorpos que são preparados, expressados, criados ou isolados por meios recombinantes, tais como anticorpos expressados usando um vetor de expressão recombinante transfectado em uma célula hospedeira, anticorpos isolados de uma biblioteca de anticorpo recombinante, combinatória, anticorpos isolados de um animal (por exemplo, um camundongo) que seja transgênico para os genes da imunoglobulina humana ou anticorpos preparados, expressados, criados ou isolados por qualquer outro meio que envolva união de seqüências de gene da imunoglobulina humana a outras seqüências de DNA. Tais anticorpos recombinantes incluem anticorpos humanizados, enxertados na CDR, quiméricos, gerados *in vitro* (por exemplo, pela demonstração de fago), e podem incluir opcionalmente regiões constantes derivadas de seqüências de imunoglobulina da linha germinativa humana.

O termo “substancialmente idêntica” (ou “substancialmente homóloga”) refere-se a uma primeira seqüência de aminoácido ou nucleotídeo que contenha um número suficiente de resíduos de aminoácido ou

nucleotídeos idênticos ou equivalente (por exemplo, com uma cadeia lateral similar, por exemplo, substituições de aminoácido conservadas) a uma segunda seqüência de aminoácido ou nucleotídeo tal que a primeira e segunda seqüências de aminoácido ou nucleotídeo tenham atividades similares. No caso de anticorpos, o segundo anticorpo tem a mesma especificidade e tem pelo menos 50% da afinidade do primeiro anticorpo.

Os cálculos de "homologia" entre duas seqüências são realizadas como segue. As seqüências são alinhadas quanto a propósitos de comparação ótima (por exemplo, intervalos podem ser introduzidos em uma ou ambas de uma primeira e uma segunda seqüência de aminoácido ou ácido nucleico para o alinhamento ótimo e seqüências não homólogas podem ser desconsideradas quanto a propósitos de comparação). O comprimento de uma seqüência de referência alinhados com propósitos de comparação é de pelo menos 50% do comprimento da seqüência de referência. Os resíduos de aminoácido ou nucleotídeos nas posições de aminoácido ou posições de nucleotídeo correspondentes são depois comparadas. Quando uma posição na primeira seqüência é ocupada pelo mesmo resíduo de aminoácido ou nucleotídeo como a posição correspondente na segunda seqüência, então as moléculas são idêntica naquela posição (como aqui usado "identidade" de aminoácido ou ácido nucleico é equivalente a "homologia" de aminoácido ou ácido nucleico). A identidade percentual entre as duas seqüências é uma função do número de posições idênticas compartilhadas pelas seqüências, levando-se em conta o número de intervalos, e o comprimento de cada intervalo, que necessitam ser introduzidos para o alinhamento ótimo das duas seqüências.

A comparação das seqüências e determinação da homologia percentual entre duas seqüências pode ser realizada usando um algoritmo matemático. A homologia percentual entre duas seqüências de aminoácido é determinada usando o algoritmo de Needleman e Wunsch, J. Mol. Biol. 48:

444-453, 1970, que foi incorporado no programa GAP no pacote de software GCG, usando uma matriz de contagem Blossum 62 com uma penalidade de intervalo de 12, uma penalidade de extensão de intervalo de 4, e uma penalidade de intervalo de mudança de estrutura de 5.

5 Como aqui usado, o termo “hibridiza sob condições de severidade baixa, severidade média, severidade alta ou severidade muito alta” descreve condições para a hibridização e lavagem. A orientação para realizar as reações de hibridização podem ser encontradas em Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. 6.3.16.3.6, 1989, que é aqui
10 incorporada por referência. Os métodos aquosos e não aquosos são descritos nesta referência e podem ser usados. As condições de hibridização específicas aqui aludidas são como segue: 1) severidade baixa condições de hibridização de severidade baixa: 6X cloreto de sódio/citrato de sódio (SSC) a cerca de 45° C, seguido por duas lavagens em 0,2 X SSC, 0,1% de SDS pelo menos a 50°
15 C (a temperatura das lavagens pode ser aumentada para 55° C para as condições de severidade baixa); 2) condições de hibridização de severidade média: 6 X SSC a cerca de 45° C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,2 X SSC, 0,1% de SDS a 60° C; 3) condições de hibridização de severidade alta: 6X SSC a cerca de 45° C, seguido por uma ou mais lavagens em 0,2X
20 SSC, 0,1% de SDS a 65° C; e 4) condições de hibridização de severidade muito alta: 0,5 M de fosfato de sódio, 7% de SDS a 65° C, seguido por uma ou mais lavagens a 0,2X SSC, 1% de SDS a 65° C.

 É entendido que os anticorpos e porções de ligação de antígeno destes aqui descritos podem ter substituições de aminoácido
25 conservativas ou não essenciais, adicionais, que não têm um efeito substancial sobre as funções de polipeptídeo. Se uma substituição particular será ou não tolerada, isto é, não afetará adversamente as propriedades biológicas, tais como a atividade de ligação, pode ser determinado como descrito em Bowie *et al.*, Science, 247: 1306-1310, 1990. Uma “substituição de aminoácido

conservativa” é uma em que um resíduo de aminoácido é substituído com um resíduo de aminoácido tendo uma cadeia lateral similar. Famílias de resíduos de aminoácido tendo cadeias laterais similares foram definidas na técnica. Estas famílias incluem aminoácidos com cadeias laterais básicas (por exemplo, lisina, arginina, histidina), cadeias laterais ácidas (por exemplo, ácido aspártico, ácido glutâmico), cadeias laterais polares não carregadas (por exemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadeias laterais não polares (por exemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptofano), cadeias laterais beta-ramificadas (por exemplo, treonina, valina, isoleucina) e cadeias laterais aromáticas (por exemplo, tirosina, fenilalanina, triptofano, histidina).

Um resíduo de aminoácido “não essencial” é um resíduo que pode ser alterado a partir da seqüência do tipo selvagem de um polipeptídeo, tal como um agente de ligação, por exemplo, um anticorpo, sem alterar substancialmente uma atividade biológica, ao passo que um resíduo de aminoácido “essencial” resulta em uma tal mudança.

A menos que de outro modo definido, todos os termos técnicos e científicos aqui usados têm os mesmos significados como habitualmente entendido por uma pessoa de habilidade comum na técnica à qual esta invenção pertence. Embora os métodos e materiais similares ou equivalentes àqueles aqui descritos possam ser usados na prática ou teste da presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. No caso de conflito, o presente relatório descritivo, incluindo as definições, controlarão. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são apenas ilustrativos e não intencionados a serem limitantes.

Vista Geral

O vírus da raiva é um vírus de RNA que causa encefalite fatal em seres humanos. São aqui fornecidos métodos e composições para o tratamento e prevenção de animais infectados pelo vírus da raiva, em

particular, pacientes humanos, mais particularmente, seres humanos em necessidade de tratamento de pós exposição à raiva ou profilaxia de pós exposição (PEP). As composições incluem anticorpos que reconhecem proteínas e outros componentes moleculares (por exemplo, lipídeos, carboidratos, ácido nucleicos) do vírus da raiva, incluindo anticorpos que reconhecem a glicoproteína G do vírus da raiva ou porção desta. Em particular, anticorpos monoclonais totalmente humanos recombinantes são fornecidos. Em certas formas de realização, estes anticorpos monoclonais humanos são produzidos em camundongos que expressem segmentos de gene da imunoglobulina humana (descritos abaixo). As combinações de anticorpos antivírus da raiva também são fornecidas.

Os novos métodos incluem administrar anticorpos (e porções de ligação de antígeno destes) que se liguem ao vírus da raiva em um paciente para inibir a doença mediada pelo vírus da raiva no paciente. Por exemplo, anticorpos antivírus da raiva monoclonais humanos aqui descritos podem neutralizar o vírus da raiva e inibir a infecção pela raiva e encefalite de estágio final. Em outros exemplos, combinações de anticorpos antivírus da raiva (por exemplo, anticorpos monoclonais de glicoproteína G antivírus da raiva) podem ser administradas para inibir a doença mediada pelo vírus da raiva. Os anticorpos monoclonais humanos podem ser localmente administrados (infiltrados) no local de ferimento de infecção pela raiva e, opcionalmente, seguido pela administração de uma vacina anti-raiva.

I. Geração de Anticorpos

Imunogene

No geral, os animais são imunizados com o vírus e/ou antígenos expressados pelo vírus da raiva para produzir anticorpos. Para produzir anticorpos antivírus da raiva, os animais são tipicamente imunizados com vírus da raiva inativado. O vírus da raiva pode ser inativado, por exemplo, pelo tratamento químico e/ou liofilização e diversas vacinas contra

o vírus da raiva são comercialmente disponíveis.

Os anticorpos antivírus da raiva que se ligam e neutralizam o vírus da raiva podem interagir com epítomos específicos do vírus da raiva, por exemplo, glicoproteína G do vírus da raiva. Por exemplo, uma glicoproteína G antivírus da raiva pode ligar-se a um epítomo dentro de uma região de terminal N da glicoproteína G do vírus da raiva ou uma região de terminal C ou uma região interna da proteína ou fragmento destes (ver o Exemplo 4 e a Fig. 5) ou uma combinação destes. Em um exemplo, um anticorpo que liga e neutraliza o vírus da raiva liga-se a um epítomo, por exemplo, um epítomo linear, dentro dos aminoácidos 19-422 da glicoproteína G do vírus da raiva. Em um outro exemplo, um anticorpo é identificado que liga um epítomo linear e/ou epítomo conformacional dentro dos aminoácidos 19-422 da glicoproteína G do vírus da raiva. Como debatido aqui, tais epítomos também podem ser usados para identificar outros anticorpos que se ligam à raiva.

15 **Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos em Camundongos HuMAb**

Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos em uma maneira não possível com anticorpos policlonais. Os anti-soros policlonais variam de animal para animal, ao passo que as preparações monoclonais exibem uma especificidade antigênica uniforme. Os sistemas de animal de murino são úteis para gerar anticorpos monoclonais, e protocolos de imunização, técnicas para isolar e fundir esplenócitos, e métodos e reagentes para produzir hibridomas são bem conhecidos. Os anticorpos monoclonais podem ser produzidos por uma variedade de técnicas, incluindo metodologia de anticorpo monoclonal convencional, por exemplo, a técnica de hibridização de célula somática padrão de Kohler e Milstein, Nature, 256: 495, 1975. Ver no geral, Harlow, E. e Lane, D. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1988.

Embora estas técnicas padrão sejam conhecidas, é desejável usar anticorpos humanizados ou humanos ao invés de anticorpos de murino para tratar pacientes humanos, porque os seres humanos montam uma resposta imune aos anticorpos de camundongos e outras espécies. A resposta imune aos anticorpos de murino é chamada de um anticorpo humano anti-camundongo ou resposta HAMA (Schroff, R. *et al*, Cancer Res., 45, 879-885, 1985) e é uma condição que causa a doença sérica em seres humanos e resulta na depuração rápida dos anticorpos de murino de uma circulação do indivíduo. A resposta imune em seres humanos tem mostrado ser contra as regiões tanto variáveis quanto constantes de imunoglobulinas de murino. Os anticorpos monoclonais humanos são mais seguros para a administração aos seres humanos do que os anticorpos derivados de outros animais e anticorpos policlonais humanos.

Um tipo útil de animal para gerar anticorpos monoclonais humanos é um camundongo transgênico que expressa genes da imunoglobulina humana ao invés dos seus próprios genes da imunoglobulina de camundongo. Tais camundongos transgênicos, por exemplo, camundongos "HuMAb[®]", contêm minilocais do gene da imunoglobulina humana que codificam seqüências de imunoglobulina pesada (μ e γ) e de cadeia leve κ não rearranjadas humanas, junto com mutações alvegadas que inativam os locais de cadeia μ e κ endógenos (ver por exemplo, Lonberg, N. *et al.*, Nature 368(6474): 856-859, 1994, e Pat. US 5.770.429). Conseqüentemente, os camundongos exibem expressão reduzida de IgM ou κ de camundongo, e em resposta à imunização, os transgenes de cadeia pesada e leve humana introduzidos sofrem mudança de classe e mutação somática para gerar anticorpos monoclonais IgGk de alta afinidade humanos (Lonberg, N. *et al.*, supra; revisado em Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101, 1994; Lonberg, N. e Huszar, D., Intern. Rev. Immunol., 13: 65-93, 1995, e Harding, F. e Lonberg, N., Ann. N.Y. Acad. Sci., 764: 536-546,

1995).

A preparação de tais camundongos transgênicos está descrita em mais detalhes em Taylor, L. *et al.*, Nucleic Acids Research, 20: 6287-6295, 1992; Chen, J. *et al.*, International Immunology 5: 647-656, 1993; 5 Tuailleon *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 90: 3720-3724, 1993; Choi *et al.*, Nature Genetics, 4: 117-123, 1993; Chen, J. *et al.*, EMBO J., 12: 821-830, 1993; Tuailleon *et al.*, J. Immunol., 152: 2912-2920, 1994; Taylor, L. *et al.*, International Immunology, 6: 579-591, 1994; e Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851, 1996. Ver ainda, a Pat. US 5.545.806; Pat. US 5.569.825, Pat. US 5.625.126, Pat. US 5.633.425, Pat. US 5.661.016, Pat. US 5.770.429, Pat. US 5.789.650, Pat. US 5.814.318, Pat. US 5.874.299 e Pat. US 5.877.397, todos por Lonberg e Kay, e Publicação PCT N^{os} WO 01/14424, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, e WO 92/03918.

Para gerar anticorpos monoclonais totalmente humanos para 15 um antígeno, camundongos HuMAb podem ser imunizados com um imunogene, como descritos por Lonberg, N. *et al.* Nature, 368(6474): 856-859, 1994; Fishwild, D. *et al.*, Nature Biotechnology, 14: 845-851, 1996 e WO 98/24884. Preferivelmente, os camundongos são de 6 a 16 semanas de idade na primeira imunização. Por exemplo, uma preparação purificada de 20 vírus da raiva inativado pode ser usada para imunizar os camundongos HuMAb intraperitonealmente. Para gerar anticorpos contra as proteínas, lipídeos, e/ou moléculas de carboidrato do vírus da raiva, os camundongos podem ser imunizados com vírus da raiva vivos, mortos ou inativados não viáveis e/ou liofilizados. Em uma outra forma de realização, uma 25 glicoproteína G do vírus da raiva ou um ou mais fragmentos desta, podem ser usadas como um imunogene.

Os camundongos transgênicos HuMAb respondem melhor quando inicialmente imunizados intraperitonealmente (IP) com antígeno em adjuvante de Freund completo, seguido por imunizações IP a cada segunda

semana (até um total de 6) com o antígeno em adjuvante de Freund incompleto. A resposta imune pode ser monitorada no curso do protocolo de imunização com amostras de plasma sendo obtidas pelas sangrias retroorbitais. O plasma pode ser triado, por exemplo pelo ELISA ou citometria de fluxo, e camundongos com títulos suficientes de imunoglobulina antivírus da raiva humana podem ser usados para as fusões. Os camundongos podem ser reforçados intravenosamente com antígeno 3 dias antes do sacrifício e remoção do baço. É esperado que as fusões múltiplas para cada antígeno possam precisar ser realizadas. Vários camundongos são tipicamente imunizados para cada antígeno.

Os esplenócitos de camundongo podem ser isolados e fundidos com PEG a uma linhagem de célula de mieloma de camundongo com base em protocolos padrão. Os hibridomas resultantes são depois triados quanto a produção de anticorpos específicos de antígeno. Por exemplo, suspensões de célula única de linfócitos esplênicos de camundongos imunizados são fundidos a um sexto do número de células de mieloma de camundongo não secretoras P3X63-Ag8.653 (ATCC, CRL 1580) com 50% de PEG. As células são plaqueadas em aproximadamente 2×10^5 em placa microtituladora de fundo chato, seguido por uma incubação de duas semanas em meio seletivo contendo 20% de Soro de Clone fetal, 18% de meio condicionado "653", 5% de *origen* (IGEN), 4 mM de L-glutamina, 1 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sódio, 5 mM de HEPES, 0.055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 unidades/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomicina, 50 mg/ml de gentamicina e 1x HAT (Sigma; o HAT é adicionado 24 horas depois da fusão). Depois de duas semanas, as células são cultivadas em meio em que o HAT é substituído com HT. Os sobrenadantes de reservatórios individuais são depois triados pelo ELISA quanto a anticorpos IgM e IgG antivírus da raiva monoclonal humano. Os hibridomas que secretam anticorpo são recolocados em placa, mais uma vez triados, e se ainda positivos quanto a IgG humana, os

anticorpos antivírus da raiva monoclonais, podem ser subclonados pelo menos duas vezes pela diluição limitante. Os subclones estáveis são depois cultivados *in vitro* para gerar quantidades pequenas de anticorpo em meio de cultura de tecido para caracterização.

5 Em uma forma de realização, o animal transgênico usado para gerar anticorpos humanos para o vírus da raiva contém pelo menos um, tipicamente de 2 a 10, e algumas vezes de 25 a 50 ou mais cópias do transgene descrito no Exemplo 12 da WO 98/24884 (por exemplo, pHCl ou pHCl2) cruzado com um animal que contenha uma cópia única de um
10 transgene de cadeia leve descrito nos Exemplos 5, 6, 8 ou 14 da WO 98/24884, e a descendência cruzada com o animal deletado em JH descrito no Exemplo 10 da WO 98/24884, os conteúdos das quais são aqui expressamente incorporadas por referência. Os animais são cruzados até a homozigosidade para cada um destes três traços. Tais animais têm os seguintes genótipos: uma
15 cópia única (por conjunto haplóide de cromossomas) de um mini-local não rearranjado de cadeia pesada (descrito no Exemplo 12 da WO 98/24884), uma cópia única (por conjunto de haplóide de cromossomas) de uma construção de cadeia κ humana rearranjada (descrita no Exemplo 14 da WO 98/24884), e uma deleção em cada local de cadeia pesada de camundongo endógeno que
20 remove todos os segmentos JR funcionais (descritos no Exemplo 10 da WO 98/24884). Tais animais são cruzados com camundongos que são homozigotos para a deleção dos segmentos JH (Exemplo 10 da WO 98/24884) para produzir descendentes que sejam homozigotos para a deleção JH e hemizigotos para as construções de cadeia pesada e leve humanas. Os
25 animais resultantes são injetados com antígenos e usados para a produção de anticorpos monoclonais humanos contra estes antígenos.

As células B isoladas de um tal animal são monoespecíficas com respeito às cadeias pesada e leve humanas porque eles contêm apenas uma cópia única de cada gene. Além disso, estes serão monoespecíficos com

respeito às cadeias pesadas de ser humano ou de camundongo porque ambas as cópias de gene de cadeia pesada de camundongo endógeno são não funcionais em virtude da deleção que transpõem a região JH introduzida como descrito nos Exemplos 9 e 12 da WO 98/24884. Além disso, uma fração

5 substancial das células B será monoespecífica com respeito às cadeias leves de ser humano ou camundongo, porque a expressão da cópia única do gene da cadeia leve capa humana rearranjada excluirá alélica e isotipicamente o rearranjo dos genes das cadeias capa e lambda de camundongo endógenos em uma fração significativa de células B.

10 Em uma forma de realização, o camundongo transgênico exibirá produção de imunoglobulina com um repertório significativo, de modo idealmente substancial similar àquele de um camundongo nativo. Assim, por exemplo, em formas de realização onde os genes Ig endógenos foram inativados, os níveis de imunoglobulina total variarão de cerca de 0,1 a 10

15 mg/ml de soro, por exemplo, de 0,5 a 5 mg/ml ou pelo menos de cerca de 1,0 mg/ml. Quando um transgene capaz de efetuar uma mudança para IgG a partir de IgM foi introduzido no camundongo transgênico, a razão de camundongo adulto de soro IgG para IgM é preferivelmente de cerca de 10:1. A razão de IgG para IgM será muito mais baixa no camundongo imaturo. No geral, mais

20 do que cerca de 10%, por exemplo, cerca de 40 a 80% das células do baço e linfonodo B expressará exclusivamente proteína IgG humana.

O repertório no camundongo transgênico idealmente aproximar-se-á daquele mostrado em um camundongo não transgênico, usualmente pelo menos cerca de 10% tão alto, preferivelmente de 25 a 50%

25 ou mais tão alto. No geral, pelo menos cerca de mil imunoglobulinas diferentes (idealmente IgG), preferivelmente de 10^4 a 10^6 ou mais, serão produzidas, dependendo primariamente no número de regiões V, J, e D diferentes introduzidas no genoma de camundongo. Tipicamente, as imunoglobulinas exibirão uma afinidade quanto a antígenos pré selecionados

de pelo menos cerca de 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M, 10^{-14} M ou maior, por exemplo, até 10^{-15} M ou mais.

Os camundongos HuMAb podem produzir células B que sofrem mudança de classe por intermédio da recombinação de mudança intra-transgene (mudança cis) e expressam imunoglobulinas reativas com o vírus da raiva. As imunoglobulinas podem ser anticorpos da seqüência humana, em que os polipeptídeos das cadeias pesada e leve são codificados pelas seqüências de transgene humano, que podem incluir seqüências derivadas pela mutação somática e junções recombinatórias da região V, assim como seqüências codificadas pela linha germinativa. Estas imunoglobulinas de seqüência humana podem ser aludidas como sendo substancialmente idênticas a uma seqüência de polipeptídeo codificada por um segmento de gene de VL ou VH humanos e um segmento de JL ou JH humano, embora outras seqüências que não da linha germinativa possam estar presentes como um resultado da mutação somática e junções de recombinação V-J e V-D-J diferenciais. Com respeito a tais anticorpos da seqüência humana, as regiões variáveis de cada cadeia são tipicamente pelo menos 80 por cento codificadas pelos segmentos de gene da linha germinativa V, J, e, no caso de cadeias pesadas, D, humanos. Frequentemente, pelo menos 85 por cento das regiões variáveis são codificadas pelas seqüências da linha germinativa humana presentes no transgene. Frequentemente 90 ou 95 por cento ou mais das seqüências da região variável são codificadas pelas seqüências da linha germinativa humana presentes no transgene. Entretanto, visto que seqüências que não da linha germinativa são introduzidas pela mutação somática e a junção VJ e VDJ, os anticorpos de seqüência humana frequentemente terão algumas seqüências de região variável (e menos frequentemente seqüências de região constante) que não são codificadas pelos segmentos de gene V, D ou J humanos como encontrado no(s) transgene(s) humano(s) na linha germinativa dos camundongos. Tipicamente, tais seqüências que não da linha

germinativa (ou posições de nucleotídeo individuais) formarão grupos nas ou próximo das CDRs ou em regiões onde as mutações somáticas são conhecidos por formar grupos.

Os anticorpos da seqüência humana que se ligam ao vírus da raiva podem resultar da mudança de isótipo, tal que os anticorpos humanos que compreendem uma cadeia gama da seqüência humana (tal como gama 1, gama 2 ou gama 3) e uma cadeia leve da seqüência humana (tal como K) são produzidos. Tais anticorpos mudados em isótipo da seqüência humana freqüentemente contém uma ou mais mutação(ões) somática(s), tipicamente na região variável e freqüentemente em ou dentro de cerca de 10 resíduos de uma CDR) como um resultado da maturação de afinidade e seleção de B células pelo antígeno, particularmente subsequente à inoculação de antígeno secundária (ou subsequente). Estes anticorpos de alta afinidade da seqüência humana têm afinidades de ligação de pelo menos cerca de 1×10^{-9} M, tipicamente pelo menos 5×10^{-9} M, freqüentemente mais do que 1×10^{-10} M, e algumas vezes 5×10^{-10} M a 1×10^{-11} M ou maior.

Os anticorpos antivírus da raiva também podem ser incitados em outros mamíferos, incluindo camundongos não transgênicos, seres humanos, coelhos, e cabras.

20 **Anticorpos antivírus da raiva**

Anticorpos monoclonais humanos que especificamente se ligam ao vírus da raiva incluem anticorpos produzidos pelos clones 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e 1E5 aqui descritos (aludidos como, respectivamente, clones de anticorpo 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e 1E5). Os anticorpos com cadeia pesada variável e regiões de cadeia leve variáveis que são pelo menos 80% idênticas às regiões de cadeia pesada e leve variáveis de 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 ou 1E5 também podem se ligar ao vírus da raiva. Em formas de realização variáveis, anticorpos antivírus da raiva incluem, por exemplo, regiões determinadoras de complementaridade (CDRs) que são pelo menos

80% idênticas às CDRs das cadeias pesadas variáveis e/ou cadeias leves variáveis de 17C7, 6G11, 5G5, 2B10 ou 1E5. As CDRs das regiões de cadeia pesada variáveis destes clones de anticorpo são mostradas na Tabela 1, abaixo.

5 **Tabela 1. Sequências de Aminoácido de CDR variável de Cadeia Pesada**

Clone Ab	Cadeia	CDR	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO:
17C7	H	CDR1	TYAMH	3
17C7	H	CDR2	WSYDGRTKDYADSVKG	4
17C7	H	CDR3	ERFSGAYFDY	5

Clone Ab	Cadeia	CDR	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO:
6G11	H	CDR1	GFTFSSYG	17
6G11	H	CDR2	VAVIL	18
6G11	H	CDR3	ARIAPAGSAFDY	19

As CDRs das regiões de cadeia leve variáveis destes clones são mostradas na Tabela 2, abaixo.

Tabela 2. Sequências de Aminoácido da CDR de Cadeia Leve Variável

Clone	Cadeia	CDR	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO:
17C7	L	CDR1	RASQSVSSYLA	6
17C7	L	CDR2	DASNRAT	7
17C7	L	CDR3	QQRNNWP	8

Clone	Cadeia	CDR	Sequência de Aminoácido	SEQ ID NO:
6G11	L	CDR1	QGISSV	20
6G11	L	CDR2	DAS	21
6G11	L	CDR3	QQFNSYPPT	22

10 As CDRs são as porções de imunoglobulinas que determinam especificidade a um antígeno particular. Em certas formas de realização, as CDRs que correspondem às CDRs nas Tabelas 1 e 2 tendo variações de sequência (por exemplo, substituições conservativas) podem se ligar ao vírus da raiva. Por exemplo, CDRs, em que 1, 2, 3, 4 ou 5 resíduos ou menos do que 20% dos resíduos totais na CDR, são substituídos ou deletados podem
15 estar presentes em um anticorpo (ou porção de ligação de antígeno deste) que liga o vírus da raiva.

Similarmente, anticorpos antivírus da raiva podem ter CDRs

contendo uma seqüência de consenso, visto que os motivos de seqüência conservadas entre anticorpos múltiplos podem ser importantes para a atividade de ligação.

Por exemplo, a invenção fornece quanto ao uso de uma ou mais regiões de CDR ou derivados das CDRs divulgadas. Tais CDRs derivadas são derivadas de uma CDR divulgada ou porção desta e, opcionalmente, alterada em uma ou mais posições de aminoácido. As alterações incluindo uma ou mais adições, deleções ou substituições de aminoácido como aqui descritas. As posições de resíduo exemplares para alterar incluem aquelas posições de aminoácido identificadas como submetidas a mais variação do que outras posições de aminoácido, por exemplo, posições submetidas às mutações somáticas como conhecido na técnica. Alternativamente, tais posições podem ser identificadas comparando-se duas ou mais seqüências conhecidas por terem uma atividade de ligação desejada e identificando resíduos de CDR que variam e resíduos de CDR que são constantes. Por exemplo, uma comparação das regiões variáveis de cadeias pesada e leve 17C7 e 6G11 é apresentada abaixo (Tabelas 3-4) e as derivados de CDR ou seqüências de consenso que podem ser determinadas a partir destas são mostradas (Tabelas 5-6).

Tabela 3. Comparação de Regiões Variáveis de cadeia pesada

Comparação de:

17c7H 126 aa

6G11H 125 aa

usando depósito de matriz: BLOSUM50, penalidades de intervalo: -14/-4

87,2% de identidade em sobreposição de 125 aa; contagem: 731

```

      10      20      30      40      50      60
-  QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSTYAMHWVRQAPGKLEWVAVVSVDGRITDY
-  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-  QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKLEWVAVILYDGSNKYH
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100     110     120
-  ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRTEDTAVYFCARERFEGAYFDYWGQGLTVTVSSA
-  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-  ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRTEDTAVYFCARERFEGAYFDYWGQGLTVTVSSA
      70      80      90     100     110     120

-  STKGP SEQ ID NO: ____
-  : : : :
-  STKGP SEQ ID NO: ____

```

Tabela 4. Comparação de Regiões Variáveis de Cadeia Leve

Comparação de:

17C7I - 107 aa

6G11L - 106 aa

usando depósito de matriz: BLOSUM50, penalidades de intervalo: -14/-4 -

71,7% de identidade em sobreposição de 106 aa; contagem: 527

```

      10      20      30      40      50      60
-  IVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPAR
-  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-  IQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISVSLAWYQQKSGKAPKFLIYDASSLESQVPSR
      10      20      30      40      50      60

      70      80      90     100
-  FSGSGSGTDFTLTISSLPEPDAFVYSCQORNWPTFGGGTKVEIK SEQ ID NO: ____
-  : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
-  FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCOQFNSTPPTFGGGTKLEIK SEQ ID NO: ____

```

As seqüências derivadas de CDRs ou de consenso exemplares são apresentadas abaixo.

Tabela 5. Derivados de CDR de Cadeia Pesada

CDR	Fórmula	Modificações
CDR1	GFTFSX1YX2MH SEQ ID NO: 29	X pode ser qualquer aminoácido ou X1 = T/S; X2 = A/G
CDR2	VAVX1X2YDGX3X4KX5X6ADSVKG SEQ ID NO: 30	X pode ser qualquer aminoácido ou X1 = V/I; X2 = S/L; X3 = R/S; X4 = I/N; X5 = D/Y; X6 = Y/H
CDR3	ARX1X2X3GX4X5FDY SEQ ID NO: 31	X pode ser qualquer aminoácido ou X1 = E/I; X2 = R/A; X3 = F/P; X4 = A/S; X5 = Y/S

Tabela 6. Derivados de CDRs de Cadeia Leve

CDR	Fórmula	Modificações
CDR1	RASQX1X2SSX3L SEQ ID NO: 32	X pode ser qualquer aminoácido ou X1 = S/G; X2 = V/I; X3 = Y/V
CDR2	DASX1X2X3X4 SEQ ID NO: 33	X pode ser qualquer aminoácido ou X1 = N/S1; X2 = R/L; X3 = A/E; X4 = T/S
CDR3	CQQX1NX2X3P SEQ ID NO: 34	X pode ser qualquer aminoácido ou X1 = R/F; X2 = N/S; X3 = W/Y

Também é entendido que uma ou mais das CDRs aqui divulgadas (incluindo derivados de CDR ou seqüências de consenso) pode ser usado para identificar CDRs que ocorrem naturalmente que sejam adequadas para a ligação a um epítipo do vírus da raiva. As CDRs também podem ser combinadas ou clonadas cruzadas entre as regiões variáveis, por exemplo, as CDRs de cadeia leve podem ser introduzidas em Regiões Variáveis de Cadeia Pesada e as CDRs de cadeia pesada podem ser introduzidas nas regiões variáveis de cadeia leve e triadas para garantir que a ligação específica seja retida.

Os anticorpos antivírus da raiva humanos podem incluir regiões variáveis que são o produto de ou derivados de, genes da imunoglobulina humana específicos. Por exemplo, os anticorpos podem incluir uma região de cadeia pesada variável que é o produto de ou derivada de, um gene VH 3-30-3 ou VH3-33 humano (ver, por exemplo, Ac. N^o: AJ555951, GI N^o: 29836865; Ac. N^o: AJ556080, GI N^o: 29837087; Ac. N^o: AJ556038, GI N^o: 29837012, e outros segmentos de gene rearranjados VH3-33 humanos fornecidos no GenBank®). Os anticorpos também podem ou alternativamente, incluir uma região variável de cadeia leve que seja o produto de ou derivada de um gene Vic L6, Vic L11, Vic L13, Vic L15 ou Vic L19 humano (ver, por exemplo, GenBank® Ac. N^o: AJ556049, GI N^o: 29837033 para uma seqüência parcial de um segmento de gene Vic L19 humano rearranjado). Como conhecido na técnica, e descrito nesta seção, acima, as regiões de imunoglobulina variáveis de anticorpos recombinados são derivadas por um processo de recombinação *in vivo* em que a

variabilidade é introduzida aos segmentos genômicos que codificam as regiões. Conseqüentemente, as regiões variáveis derivadas de um gene VII ou VL humano podem incluir nucleotídeos que são diferentes daqueles no gene encontrado em tecidos não linfóides. Estas diferenças de nucleotídeo são tipicamente concentradas nas CDRs.

Além disso, os anticorpos acima exibem atividade de ligação a um vírus da raiva e, em particular, a um ou mais epítopos da glicoproteína G da raiva. Tais anticorpos exibem ainda atividade de neutralização do vírus da raiva e eficácia protetora *in vivo* contra as seqüelas da raiva como ainda descrito abaixo e nos exemplos.

2. Produção e Modificação de Anticorpos

Muitas formas diferentes de anticorpos antivírus da raiva podem ser úteis na inibição de doença mediada pelo vírus da raiva. Os anticorpos podem ser dos vários isótipos, incluindo: IgG (por exemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), IgM, IgA1, IgA2, IgD ou IgE. Preferivelmente, o anticorpo é um isótipo IgG, por exemplo, IgG1. As moléculas de anticorpo podem ser de tamanho natural (por exemplo, um anticorpo IgG1, IgG2, IgG3 ou IgG4) ou podem incluir apenas um fragmento de ligação de antígeno (por exemplo, um Fab, F(ab')₂, Fv ou um fragmento Fv de cadeia única). Estas incluem anticorpos monoclonais (por exemplo, anticorpos monoclonais humanos), anticorpos recombinantes, anticorpos quiméricos, e anticorpos humanizados, assim como porções de ligação de antígeno destes dos precedentes.

Os anticorpos antivírus da raiva ou porções destes úteis na presente invenção também podem ser anticorpos recombinantes produzidos pelas células hospedeiras transformadas com cadeias leves e pesadas de imunoglobulina que codifica DNA de um anticorpo desejado. Os anticorpos recombinantes podem ser produzidos pelas técnicas de engendramento genético conhecidas. Por exemplo, anticorpos recombinantes podem ser

produzidos pela clonagem de uma seqüência de nucleotídeo, por exemplo, um cDNA ou DNA genômico, que codifica as cadeias leves e pesadas de imunoglobulina do anticorpo desejado. A seqüência de nucleotídeo que codifica aqueles polipeptídeos é depois inserida em um vetor de expressão de modo que ambos os genes sejam operativamente ligados às suas próprias seqüências de controle de expressão transcricional e traducional. O vetor de expressão e as seqüências de controle de expressão são escolhidas de modo a serem compatíveis com a célula hospedeira de expressão usada. Tipicamente, ambos os genes são inseridos no mesmo vetor de expressão. As células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas podem ser usadas.

A expressão em células hospedeiras eucarióticas é preferida porque tais células são mais prováveis do que as células procarióticas para montar e secretar um anticorpo apropriadamente dobrado e imunologicamente ativo. Entretanto, qualquer anticorpo produzido que seja inativo devido à dobra inapropriada pode ser renaturado de acordo com métodos bem conhecidos (Kim e Baldwin, Ann. Rev. Biochem., 51: 459-89, 1982). É possível que as células hospedeiras produzirão porções de anticorpos intactos, tais como dímeros de cadeia leve ou dímeros de cadeia pesada, que também são homólogos de anticorpo de acordo com a presente invenção.

Os anticorpos aqui descritos também pode ser produzidos em um transfectoma de célula hospedeira usando, por exemplo, uma combinação de técnicas de DNA recombinante e métodos de transfecção de gene como é bem conhecido na técnica (Morrison, S., Science, 229: 1202, 1985). Por exemplo, em uma forma de realização, o(s) gene(s) de interesse, por exemplo, genes de anticorpo humano, podem ser ligados em um vetor de expressão tal como um plasmídeo de expressão eucariótico tal como usado em um sistema de expressão de gene GS divulgado na WO 87/04462, WO 89/01036 e EP 338 841 ou em outros sistemas de expressão bem conhecidos na técnica. O plasmídeo purificado com os genes de anticorpo clonados podem ser

introduzidos em células hospedeiras eucarióticas tais como células CHO ou células NSO ou alternativamente outras células eucarióticas como uma célula derivada de planta, fungos ou levedura. O método usado para introduzir estes genes pode ser qualquer método descrito na técnica, tal como eletroporação, lipofectina, Lipofectamina, transfecção (por exemplo, mediada por cloreto de cálcio) ou transfecção balística, em que as células são bombardeadas com micropartículas que carregam o DNA de interesse (Rodin, *et al.* Immunol. Lett., 74(3): 197-200, 2000). Depois de introduzir estes genes de anticorpo nas células hospedeiras, células que expressam o anticorpo podem ser identificadas e selecionadas. Estas células representam os transfectomas que podem ser depois amplificados quanto ao seu nível de expressão e supragraduado para produzir anticorpos. Os anticorpos recombinantes podem ser isolados e purificados a partir destes sobrenadantes de cultura e/ou células usando técnicas padrão.

Deve ser entendido que variações nos procedimentos acima são úteis na presente invenção. Por exemplo, pode ser desejado transformar uma célula hospedeira com DNA que codifica a cadeia leve ou a cadeia pesada (mas não ambas) de um anticorpo. A tecnologia de DNA recombinante também pode ser usada para remover alguns ou todos do DNA codificador de cada uma ou de ambas as cadeias leve e pesada que não sejam necessárias para ligação, por exemplo, a região constante pode ser modificada, por exemplo, pela deleção de aminoácidos específicos. As moléculas expressadas de tais moléculas de DNA truncadas são úteis nos métodos aqui descritos. Além disso, anticorpos bifuncionais podem ser produzidos em que uma cadeia pesada e uma leve se ligam a um vírus da raiva, e as outras cadeias pesadas e leves são específicas para um antígeno outro que não o vírus da raiva ou um outro epítipo do vírus da raiva.

Também dentro do escopo da invenção estão anticorpos em que os aminoácidos específicos foram substituídos, deletados ou adicionados.

Em particular, os anticorpos preferidos têm substituições de aminoácido na região de estrutura, tal como para restabelecer a ligação ao antígeno. Por exemplo, um número selecionado, pequeno de resíduos estruturais aceitadores da cadeia de imunoglobulina pode ser substituído pelos aminoácidos doadores correspondentes. As localizações preferidas das substituições incluem resíduos de aminoácido adjacentes à CDR ou que são capazes de interagir com um CDR (ver por exemplo, a Pat. US 5.585.089). Os critérios para selecionar aminoácidos a partir dos doadores são descritos na Pat. US 5.585.089 (por exemplo, as colunas 12-16), os conteúdos dos quais são aqui incorporados por referência. A estrutura do aceitador pode ser uma sequência de estrutura do anticorpo humano maduro ou uma sequência de consenso. Como desejado, a região Fc de anticorpos da invenção pode ser alterada para modular a(s) função(ões) efectoras tais como, por exemplo, ligação de complemento e/ou ligação de receptor de Fc. Os critérios e subconjuntos de alterações de estrutura e/ou regiões constantes adequadas para a alteração (por exemplo, pela substituição, deleção ou inserção) são descritos nas Patentes US Nº 6.548.640, 5.859.205, 6.632.927, 6.407.213, 6.054.297, 6.639.055, 6.737.056 e 6.673.580.

Uma “sequência de consenso” é uma sequência formada a partir dos aminoácidos (ou nucleotídeos) que ocorrem mais freqüentemente em uma família de sequências relacionadas (Ver por exemplo, Winnaker, From Genes to Clones (Verlagsgesellschaft, Weinheim, Alemanha 1987). Em uma família de proteínas, cada posição na sequência de consenso é ocupada pelo aminoácido que ocorre mais freqüentemente naquela posição na família. Se dois aminoácidos ocorrem de modo igualmente freqüente, pode ser incluído na sequência de consenso. Uma “estrutura de consenso” de uma imunoglobulina refere-se a uma região de estrutura na sequência de imunoglobulina de consenso.

Um anticorpo antivírus da raiva ou porção de ligação de

antígeno deste, pode ser derivatizado ou ligado a uma outra molécula funcional (por exemplo, um outro peptídeo ou proteína). Por exemplo, um anticorpo pode ser funcionalmente ligado (pela ligação química, fusão genética, associação não covalente ou de outro modo) a uma ou mais outras entidades moleculares, tais como um outro anticorpo, um agente detectável, um agente citotóxico, um agente farmacêutico, e/ou uma proteína ou peptídeo que possa mediar a associação com uma outra molécula (tal como uma região de núcleo de estreptavidina ou um rótulo de poliistidina).

10 Um tipo de anticorpo derivatizado (ou fragmento deste) é produzido pela reticulação de duas ou mais de tais proteínas (do mesmo tipo ou de tipos diferentes). Os reticuladores adequados incluem aqueles que são heterobifuncional, tendo dois grupos reativos distintos separados por um espaçador apropriado (por exemplo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxissuccinimida) ou homobifuncional (por exemplo, suberato de dissuccinimidila). Tais ligadores são disponíveis da Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

20 Os agentes detectáveis úteis com que um anticorpo (ou fragmento destes) pode ser derivatizado (ou rotulado) incluem compostos fluorescentes, várias enzimas, grupos protético, materiais luminescentes, materiais bioluminescentes, e materiais radioativos. Os agentes detectáveis fluorescentes exemplares incluem fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, e ficoeritrina. Uma proteína ou anticorpo também podem ser derivatizados com enzimas detectáveis, tais como fosfatase alcalina, rábano peroxidase, galactosidase, acetilcolinesterase, glicose oxidase e outros.

25 Quando uma proteína é derivatizada com uma enzima detectável, a mesma é detectada pela adição de reagentes adicionais que a enzima usa para produzir um produto de reação detectável. Por exemplo, quando o agente detectável rábano peroxidase está presente, a adição de peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina leva a um produto de reação colorido, que é detectável.

Uma proteína também pode ser derivatizada com um grupo protético (por exemplo, estreptavidina/biotina e avidina/biotina). Por exemplo, um anticorpo pode ser derivatizado com biotina, e detectado através de medições indiretas da ligação de avidina ou estreptavidina.

5 As proteínas e anticorpos rotulados podem ser usados, por exemplo, diagnóstica e/ou experimentalmente em vários contextos, incluindo (i) para isolar um antígeno predeterminado pelas técnicas padrão, tais como cromatografia de afinidade ou imunoprecipitação; e (ii) para detectar um antígeno predeterminado (por exemplo, um vírus da raiva ou proteína, 10 carboidrato ou lipídeo do vírus da raiva ou combinação destes, por exemplo, em um lisado celular ou uma amostra de paciente) de modo a monitorar os níveis virais e/ou protéicos no tecido como parte de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para determinar a eficácia de um dado regime de tratamento.

15 Qualquer uma das técnicas de derivatização/rotulação de proteína acima também podem ser utilizadas em um alvo viral, por exemplo, uma proteína da raiva, tal como uma glicoproteína G ou fragmento(s) desta.

3. Métodos de triagem

20 Os anticorpos antivírus da raiva podem ser caracterizados quanto a ligação ao vírus da raiva por uma variedade de técnicas conhecidas. Os anticorpos são tipicamente caracterizados primeiro pelo ELISA. Em resumo, placas de microtítulo pode ser revestidas com o antígeno alvo em PBS, por exemplo, o vírus da raiva ou glicoproteína G ou porção destes, e depois bloqueadas com proteínas irrelevantes tais como albumina sérica 25 bovina (BSA) diluída em PBS. As diluições de plasma de camundongos imunizados com o antígeno alvo, por exemplo, uma vacina contra a raiva, são adicionadas a cada reservatório e incubados por 1 a 2 horas a 37° C. As placas são lavadas com PBS/Tween 20 e depois incubados com um reagente policlonal específico de Fc de IgG de cabra anti-ser humano conjugado à

fosfatase alcalina por 1 hora a 37° C. Depois da lavagem, as placas são desenvolvidas com substrato de ABTS, e analisado na OD de 405. Preferivelmente, camundongos que desenvolvem os títulos mais altos serão usados para fusões.

5 Um ensaio de ELISA como descrito acima pode ser usado para triar quanto a anticorpos e, assim, hibridomas que produzem anticorpos que mostram reatividade positiva com o vírus da raiva. Os hibridomas que produzem anticorpos que se ligam, preferivelmente com alta afinidade, ao vírus da raiva podem ser então subclonados e ainda caracterizados. Um clone
10 de cada hibridoma, que retenha a reatividade das células precursoras (por ELISA), pode ser depois escolhido para fabricar um banco de célula, e para a purificação de anticorpo.

Para purificar os anticorpos antivírus da raiva, hibridomas selecionados podem ser cultivados em garrafas rolantes, frascos giratórios de
15 dois litros ou outros sistemas de cultura. Os sobrenadantes podem ser filtrados e concentrados antes da cromatografia de afinidade com proteína A-Sefarose (Pharmacia, Piscataway, N.J.) para purificar a proteína. Depois da troca de tampão para PBS, a concentração pode ser determinada pelos métodos espectrofotométricos.

20 Para determinar se os anticorpos monoclonais selecionados se ligam a epítomos únicos, cada anticorpo pode ser biotinilado usando reagentes comercialmente disponíveis (Pierce, Rockford, Ill.). a ligação de MAb biotinilado pode ser detectada com uma sonda rotulada com estreptavidina. Os anticorpos antivírus da raiva podem ser ainda testados quanto a reatividade
25 com o vírus da raiva ou proteína do vírus da raiva pela imunoprecipitação ou imunomancha.

Os anticorpos particulares da invenção são caracterizados conforme se ligam a um ou mais epítomos de uma glicoproteína G da raiva. Por exemplo, o epítomo da glicoproteína G da raiva pode ser um epítomo

linear, epítopo conformacional, epítopo descontínuo ou combinações de tais epítopos.

Em uma forma de realização, o epítopo da glicoproteína G da raiva consiste de sítio antigênico I, sítio antigênico II, sítio antigênico III, sítio antigênico menor A ou combinações de tais sítios antigênicos, por exemplo, sítio antigênico III e sítio menor A.

Em uma outra forma de realização, o epítopo da glicoproteína G da raiva compreende resíduos de aminoácido 336-442. Em uma forma de realização particular, a glicoproteína G da raiva compreende o resíduo de aminoácido 336 e, opcionalmente, alterações deste tais como substituições ou deleções (por exemplo, ver a Tabela 9).

Outros ensaios para medir a atividade dos anticorpos antivírus da raiva incluem os ensaios de neutralização. Os ensaios de neutralização *in vitro* podem medir a capacidade de um anticorpo para inibir um efeito citopático, a infectividade ou presença de um vírus sobre ou nas células em cultura (ver o Exemplo 3, abaixo). Os ensaios de neutralização *in vivo* ou sobrevivência podem ser usados para medir a neutralização do vírus da raiva como uma função da morbidez e/ou mortalidade reduzidas em um modelo de animal apropriado (ver os Exemplos 5, abaixo).

4. Composições Farmacêuticas e Kits

Em um outro aspecto, a presente invenção fornece composições, por exemplo, composições farmacêuticamente aceitáveis, que incluem uma molécula de anticorpo aqui descrita ou porção de ligação de antígeno deste, formulados juntos com um carregador farmacêuticamente aceitável.

Os “carregadores farmacêuticamente aceitáveis” incluem qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, agentes isotônicos e retardadores de absorção, e outros que sejam fisiologicamente compatíveis. Os carregadores podem ser adequados para a administração intravenosa,

intramuscular, subcutânea, parenteral, retal, espinhal ou epidérmica (por exemplo, pela injeção ou infusão).

As composições desta invenção podem estar em uma variedade de formas. Estas incluem, por exemplo, as formas de dosagem líquida, semi-sólida e sólida, tais como soluções líquidas (por exemplo, soluções injetáveis e infusíveis), dispersões ou suspensões, lipossomas e supositórios. A forma preferida depende do modo pretendido de administração e aplicação terapêutica. As composições úteis estão na forma de soluções injetáveis ou infusíveis. Um modo útil de administração é a parenteral (por exemplo, intravenosa, subcutânea, intraperitoneal, intramuscular). Por exemplo, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno deste podem ser administrados pela infusão ou injeção intravenosas. Em uma outra forma de realização, o anticorpo ou porção de ligação de antígeno deste são administrados pela injeção intramuscular ou subcutânea.

A composição da invenção pode ser co-administrada com a) um ou mais outros anticorpos, por exemplo, anticorpos anti-raiva, b) proteína da raiva, por exemplo, uma vacina contra a raiva, c) toxina(s) d) outro(s) agente(s) terapêutico(s) (por exemplo, antivirais), e/ou e) rótulo(s).

As frases "administração parenteral" e "parenteralmente administrado" como aqui usado significa modos de administração outros que não a administração enteral e tópica, usualmente pela injeção, e incluindo, sem limitação, injeção e infusão intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intracraniana, intraperitoneal, transtraqueal, subcutânea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnóide, intraespinhal, epidural e intraesternal.

As composições terapêuticas tipicamente devem ser estéreis e estáveis sob as condições de fabricação e armazenagem. A composição pode ser formulada como uma solução, microemulsão, dispersão, lipossoma ou

outra estrutura ordenada adequada para a concentração de anticorpo alta. As soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas pela incorporação do composto ativo (isto é, anticorpo ou porção de anticorpo) na quantidade requerida em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, como requerido, seguido pela esterilização por filtração. No geral, as dispersões são preparadas pela incorporação do composto ativo em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros ingredientes requeridos daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, os métodos úteis de preparação são secagem a vácuo e secagem por congelamento que produz um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado de uma solução deste previamente filtrada estéril. A fluidez apropriada de uma solução pode ser mantida, por exemplo, pelo uso de um revestimento tal como lecitina, pela manutenção do tamanho de partícula requerido no caso de dispersão e pelo uso de tensoativos. A absorção prolongada de composições injetáveis pode ser realizada pela inclusão na composição de um agente que retarde a absorção, por exemplo, sais de monoestearato e gelatina.

Os anticorpos e porções de anticorpo aqui descritos podem ser administrados por uma variedade de métodos conhecidos na técnica, e para muitas aplicações terapêuticas. Como será avaliado pelo técnico habilitado, a via e/ou modo de administração variará dependendo dos resultados desejados.

Em certas formas de realização, um anticorpo ou porção de anticorpo deste podem ser oralmente administrados, por exemplo, com um diluente inerte ou um carregador comestível assimilável. O composto (e outros ingredientes, se desejado) também podem ser incluídos em uma cápsula de gelatina dura ou mole, comprimidos em tabletes ou incorporados diretamente na dieta do paciente. Para a administração terapêutica oral, os compostos podem ser incorporados com excipientes e usados na forma de

tabletes ingeríveis, tabletes bucais, comprimidos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias, e outros. Para administrar um composto da invenção por outra administração que não a parenteral, pode ser necessário revestir o composto com ou co-administrar o composto com, um material para prevenir a sua inativação. As composições terapêuticas podem ser administradas com dispositivos médicos conhecidos na técnica.

Os regimes de dosagem são ajustados para fornecer a resposta ótima desejada (por exemplo, uma resposta terapêutica). Por exemplo, um bolo único pode ser administrado, diversas doses divididas podem ser administradas com o tempo ou a dose pode ser proporcionalmente reduzida ou aumentada como indicado pelas exigências da situação terapêutica. É especialmente vantajoso formular composições parenterais na forma unitárias de dosagem para facilidade de administração e uniformidade de dosagem. As formas unitárias de dosagem como aqui usadas referem-se às unidades fisicamente separadas adaptadas como dosagens unitárias para os pacientes a serem tratados; cada unidade contém uma quantidade predeterminada de composto ativo calculada para produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o carregador farmacêutico requerido. A especificação para as formas unitárias de dosagem da invenção são ditadas e diretamente dependentes (a) das características únicas do composto ativo e do efeito terapêutico particular a ser obtido, e (b) das limitações inerentes na técnica de combinar um tal composto ativo para o tratamento da sensibilidade em indivíduos.

Uma faixa exemplar, não limitante para uma quantidade terapêutica ou profilaticamente eficaz de um anticorpo ou porção de ligação de antígeno da invenção é de 0,1 a 60 mg/kg, por exemplo, 0,5 a 25 mg/kg, 1 a 2 mg/kg ou 0,75 a 10 mg/kg. Em uma forma de realização, a quantidade de anticorpo antivírus da raiva (ou porção de ligação de antígeno deste) administrada, está em ou cerca de 0,125 mg/kg, 0,25 mg/kg, 0,5 mg/kg ou em

um intervalo ou faixa desta. Deve ser ainda entendido que para qualquer paciente particular, os regimes de dosagem específicos devem ser ajustados com o tempo de acordo com a necessidade do indivíduo e o julgamento profissional da pessoa que administra ou supervisiona a administração das composições, e que as faixas de dosagem aqui apresentadas são apenas exemplares e não são intencionadas a limitar o escopo ou a prática da composição reivindicada.

Também dentro do escopo da invenção estão kits que incluem um anticorpo antivírus da raiva ou porção de ligação de antígeno deste. Os kits podem incluir um ou mais outros elementos incluindo: instruções para o uso; outros reagentes, por exemplo, um rótulo, um agente terapêutico ou um agente útil para quelar ou de outro modo ligar, um anticorpo a um rótulo ou agente terapêutico ou outros materiais para preparar o anticorpo para administração; carregadores farmacêuticamente aceitáveis; e dispositivos ou outros materiais para a administração a um paciente.

Várias combinações de anticorpos podem ser embaladas juntas. Por exemplo, um kit pode incluir anticorpos que se ligam ao vírus da raiva (por exemplo, anticorpos que incluem as regiões de cadeia pesada e/ou leve variável de 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, ES ou uma combinação destas. Os anticorpos podem ser misturados juntos ou embalados separadamente dentro do kit.

As instruções para o uso podem incluir instruções para a aplicação terapêutica incluindo dosagens e/ou modos de administração, por exemplo, em um paciente com um sintoma ou indicação de exposição de vírus da raiva ou suspeita de exposição de vírus da raiva. Outras instruções podem incluir instruções na ligação do anticorpo a um quelador, um rótulo ou um agente terapêutico ou para a purificação de um anticorpo conjugado, por exemplo, de componentes de conjugação não reagidos.

O kit pode incluir um rótulo detectável, um agente terapêutico,

e/ou um reagente útil para quelar ou de outro modo ligar um rótulo ou agente terapêutico ao anticorpo. Os agentes de ligação incluem agentes tais como N-hidroxissuccinimida (NHS). Em tais casos o kit pode incluir um ou mais de um vaso de reação para realizar a reação ou um dispositivo de separação, por exemplo, uma coluna cromatográfica, para o uso na separação do produto acabado de materiais de partida ou intermediários de reação.

O kit pode conter ainda pelo menos um reagente adicional, tal como um agente de diagnóstico ou terapêutico, por exemplo, um agente de diagnóstico ou terapêutico como aqui descrito, e/ou um ou mais anticorpos antivírus da raiva (ou porções deste) adicionais, formulados como apropriado, em uma ou mais preparações farmacêuticas separadas.

Outros kits podem incluir ácidos nucleicos otimizados que codificam anticorpos antivírus da raiva, para o uso como imunoterapia passiva, e/ou proteína(s) do vírus da raiva ou fragmentos deste(s), para o uso como, por exemplo, vacinas (imunoterapia ativa), e instruções para a expressão dos ácidos nucleicos.

5. Métodos Terapêuticos e Composições

Os anticorpos e fragmentos de ligação de anticorpo da presente invenção têm utilidades terapêutica, profilática e de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por exemplo, estes anticorpos podem ser administrados às células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo* ou *in vivo*, a um animal, preferivelmente um paciente humano, para tratar, inibir, prevenir recaída e/ou diagnóstico do vírus da raiva e doença associada com a raiva.

Como aqui usado, o termo “paciente” é intencionado a incluir animais humanos e não humanos. O termo “animais não humanos” incluem todos os vertebrados, por exemplo, mamíferos e não mamíferos, tais como primatas não humanos, camundongos, cães, gatos, porcos, vacas, e cavalos.

As proteínas e anticorpos podem ser usados nas células em cultura, por exemplo, *in vitro* ou *ex vivo*. Por exemplo, as células podem ser

cultivadas *in vitro* em meio de cultura e a etapa de contatar pode ser efetuada pela adição do anticorpo antivírus da raiva ou fragmento destes, ao meio de cultura. Os métodos podem ser realizados em virions ou células presentes em um paciente, como parte de um protocolo *in vivo* (por exemplo, terapêutico ou profilático). Para as formas de realização *in vivo*, a etapa de contatar é efetuada em um paciente e inclui administrar um anticorpo antivírus da raiva ou porção deste ao paciente sob condições eficazes para permitir a ligação do anticorpo ou porção, a um vírus da raiva ou qualquer porção deste presentes no paciente, por exemplo, em ou em torno de um ferimento ou em ou próximo às células de origem neuronal.

Métodos de administrar moléculas de anticorpo são aqui descritos. As dosagens adequadas das moléculas usadas dependerá da idade e peso do paciente e do medicamento particular usado. As moléculas de anticorpo podem ser usadas como agentes competitivos para a ligação de ligando para inibir ou reduzir uma interação indesejável, por exemplo, para inibir a ligação e/ou infecção do vírus da raiva de células, por exemplo, células neuronais.

Os anticorpos antivírus da raiva (ou porções de ligação de antígeno destes) podem ser administrados em combinação com outros anticorpos antivírus da raiva (por exemplo, outros anticorpos monoclonais, gama-globulina policlonal, por exemplo, soro humano que compreende imunoglobulinas anti-raiva). As combinações de anticorpos que podem ser usadas incluem um anticorpo antivírus da raiva ou porção de ligação de antígeno deste e/ou um anticorpo de proteína G antivírus da raiva ou porção de ligação de antígeno deste. O anticorpo ou proteína G antivírus da raiva podem ser os clones de anticorpo 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e/ou E5 que incluem as regiões variáveis de um tal anticorpo ou anticorpos ou um anticorpo com regiões variáveis pelo menos 90% idênticas às regiões variáveis de um tal anticorpo ou anticorpos. Em uma forma de realização, o

anticorpo antivírus da raiva pode ser 17C7 ou porção deste ou um anticorpo com regiões variáveis pelo menos 90% idênticas às regiões variáveis dos precedentes, por exemplo, 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e/ou E5. Combinações de anticorpos antivírus da raiva (por exemplo, 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e/ou E5) 5 podem fornecer inibição potente da raiva, especialmente, por exemplo, isolado da raiva particular (ver Tabelas 11 a 13). Os isolados do vírus da raiva característicos para os quais os anticorpos da invenção são adequados para tratar, detectar, diagnosticar e outros incluem, por exemplo, isolado CVS-11, isolado ERA, isolado do vírus Pasteur, isolado da raposa cinza (Texas), 10 isolado da raposa cinza (Arizona), isolado de raposa do ártico (Arkansas), isolado de jaritaca (Central Norte), isolado de jaritaca (Central Sul), isolado de racum, isolado de coite (Texas), isolado de cão (Texas), isolado de morcego (*Lasiurus borealis*; Tennessee), isolado de morcego (*Eptesicus fuscus*-*Myotis* spp.; Colorado), isolado de morcego (*Myotis* spp.; 15 Washington), isolado de morcego (*Lasiurus cinereus*; Arizona), isolado de morcego (*Pipistrellus subflavus*; Alabama), isolado de morcego (*Tadarida brasiliensis*; Alabama), isolado de morcego (*Lasionyctris noctivagans*; Washington), isolado de morcego (*Eptesicus fuscus*; Pensilvânia), isolado de fuinha (Nova Iorque/Puerto Rico), isolado de cão (Argentina), isolado de cão 20 (Sonora), isolado de cão (Gabon), isolado de cão (Thai), e combinações destes.

É entendido que qualquer um dos agentes da invenção, por exemplo, anticorpos antivírus da raiva ou fragmentos destes, pode ser combinado, por exemplo em razões ou quantidades diferentes, para efeito 25 terapêutico melhorado. De fato, os agentes da invenção podem ser formulados como uma mistura ou química ou geneticamente ligados usando técnicas reconhecidas no ramo resultando deste modo em anticorpos covalentemente ligados (ou fragmentos de anticorpo covalentemente ligados), tendo propriedades de ligação anti-raiva, por exemplo, propriedades de ligação

epítopo múltiplo, por exemplo, à glicoproteína G do vírus da raiva. A formulação combinada pode ser guiada por uma determinação de um ou mais parâmetros tais como a afinidade, avidéz ou eficácia biológica dos agentes sozinhos ou em combinação com um outro agente. Os agentes da invenção também podem ser administrados em combinação com outros agentes que realçam o acesso, meia vida ou estabilidade do agente terapêutico no alvejamento, depuração, e/ou seqüestro do vírus da raiva ou um antígeno deste.

Tais terapias de combinação são preferivelmente aditivos e ainda sinérgicos em sua atividade terapêutica, por exemplo, na inibição, prevenção, infecção, e/ou tratamento de doenças ou distúrbios relacionados com o vírus da raiva. A administração de tais terapias de combinação podem diminuir a dosagem do agente terapêutico (por exemplo, mistura de anticorpo ou fragmento de anticorpo ou anticorpo ou fragmento de anticorpo reticulados ou geneticamente fundidos biespecíficos) necessários para se obter o efeito desejado.

As composições imunogênicas que contêm uma quantidade imunogenicamente eficaz de um componente do vírus da raiva, por exemplo, glicoproteína G do vírus da raiva ou fragmentos desta, também fornecida pela presente invenção, e podem ser usadas na geração de anticorpos antivírus da raiva. Os epítomos imunogênicos em uma seqüência de proteína do vírus da raiva podem ser identificados como aqui descritos (ver por exemplo, o Exemplo 4) ou de acordo com métodos conhecidos na técnica, e proteínas ou fragmentos contendo estes epítomos podem ser liberados por vários meios, em uma composição de vacina. As composições adequadas podem incluir, por exemplo, lipopeptídeos (por exemplo, Vitiello *et al.*, J. Clin. Invest. 95: 341 (1995)), composições peptídicas encapsuladas em microesferas de poli (DL-lactídeo-co-glicolídeo) ("PLG") (ver, por exemplo, Eldridge *et al.*, Molec. Immunol. 28: 287-94 (1991); Alonso *et al.*, Vaccine 12: 299-306 (1994);

Jones *et al.*, Vaccine 13: 675-81 (1995)), composições peptídicas contidas em complexos imuno estimuladores (ISCOMS) (ver, por exemplo, Takahashi *et al.*, Nature 344: 873-75 (1990); Hu *et al.*, Clin. Exp. Immunol. 113: 235-43 (1998)), e sistemas de peptídeo de antígeno múltiplo (MAPs) (ver, por exemplo, Tam, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 5409-13 (1988); Tam, J. Immunol. Methods 196: 17-32 (1996)).

Os carregadores úteis que podem ser usados com as composições imunogênicas da invenção são bem conhecidos, e incluem, por exemplo, tiroglobulina, albuminas tais como albumina sérica humana, toxóide do tétano, poliaminoácidos tais como poli L-lisina, poli L-ácido glutâmico, influenza, proteína de núcleo do vírus da hepatite B, e outros. As composições podem conter um diluente fisiologicamente tolerável (isto é, aceitável) tal como água ou solução salina, tipicamente solução salina tamponada com fosfato. As composições e vacinas também tipicamente incluem um adjuvante. Os adjuvantes tais como adjuvante de Freund incompleto, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio ou alúmen são exemplos de materiais bem conhecidos na técnica. Adicionalmente, as respostas de CTL podem ser imprimadas pelos antígenos alvo conjugados, por exemplo uma proteína(s) do vírus da raiva (ou fragmentos, derivados inativos ou análogos destes) aos lipídeos, tais como tripalmitoil-S-glicerilcisteinil-seril-serina (P3CSS).

Os anticorpos anti-raiva podem ser administrados em combinação com outros agentes, tais como composições para tratar doença mediada pelo vírus da raiva. Por exemplo, produtos terapêuticos que podem ser administrados em combinação com anticorpos anti-raiva incluem agentes antivirais, imunoglobulina sérica, e/ou vacinas para tratar, prevenir ou inibir a raiva (por exemplo, vacinas tais como RabAvert® (Chiron), Vacina contra a Raiva adsorvidas (Bioport), e Imovax™ Rabies (Aventis) e/ou imunoglobulinas, tais como BayRab® (Bayer) e Imogam® Rabies-HT (Aventis). O anticorpo pode ser administrado antes, depois ou

contemporaneamente com uma vacina contra o vírus da raiva.

6. Outros Métodos

Um anticorpo anti-raiva (por exemplo, anticorpo monoclonal) pode ser usado para isolar o vírus da raiva pelas técnicas padrão, tais como cromatografia de afinidade ou imunoprecipitação. Além disso, um anticorpo anti-raiva pode ser usado para detectar o vírus (por exemplo, em uma amostra de soro), por exemplo, para triar amostras quanto a presença/exposição do/ao vírus da raiva. Anticorpos anti-raiva podem ser usados diagnosticamente para monitorar os níveis do vírus em tecido como parte de um procedimento de teste clínico, por exemplo, para, por exemplo, determinar a eficácia de um dado regime de tratamento. Além disso, os epítomos do vírus da raiva, por exemplo, epítomos de glicoproteína G (linear, conformacional ou combinações destes) podem ser usados como imunogene ou como alvos para identificar moléculas de ligação anti-raiva neutralizantes, incluindo, por exemplo, soro humano, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais ou fragmentos destes.

Exemplificação

Por todos os exemplos, os seguintes materiais e métodos foram usados a menos que de outro modo estabelecido.

20 Materiais e Métodos

No geral, a prática da presente invenção utiliza, a menos que de outro modo indicado, técnicas convencionais da química, biologia molecular, tecnologia de DNA recombinante, imunologia (especialmente, por exemplo, tecnologia de anticorpo), e técnicas padrão na preparação de polipeptídeo. Ver, por exemplo, Sambrook, Fritsch e Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology), 510, Paul, S., Humana Pr (1996); Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169), McCafferty, Ed., Irl Pr (1996); Antibodies: A Laboratory Manual,

Harlow *et al.*, C.S.H.L. Press, Pub. (1999); e Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992). Ver também, por exemplo, Smith *et al.*, A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody, páginas 181-189 e Capítulo 15 em Laboratory Techniques in Rabies, 4ª ed., editada por Meslin *et al.*, Geneva: World Health Organization (1996)).

Imunização de Camundongo e Isolação de Híbridomas

Camundongos HuMab (Medarex) são camundongos transgênicos contendo genes da imunoglobulina humana e genes da cadeia pesada e genes da cadeia leve capa de camundongo inativados. Os camundongos HuMab foram tipicamente injetados com ~1/10 de uma dose humana de uma vacina contra a raiva comercialmente disponível usando adjuvante de Freund completo na primeira semana, e adjuvante RIBI nas semanas subsequentes para um total de 6 a 8 semanas. Um ELISA da glicoproteína de envelope da raiva foi usado para medir as respostas séricas e os animais foram sacrificados quando as respostas séricas foram consideradas máximas. Híbridomas foram gerados pela fusão de esplenócitos e células parceiras (células de mieloma de camundongo P3X63Ag8.653) e os sobrenadantes resultantes foram triados quanto a reatividade em um ELISA de glicoproteína da raiva. Os anticorpos positivos foram purificados a partir de culturas de híbrido pela cromatografia em proteína A Sefarose (Amersham).

RFFIT

O ensaio RFFIT foi realizado como descrito na técnica. As cepas do vírus da raiva, isolados de vírus das ruas, e células de neuroblastoma de camundongo (MNA) usados foram todos da Center from Disease Control and Prevention, Atlanta, USA.

Células e Cultura Celular

Células HEK-293T/17, obtidas da ATCC, foram cultivadas em

meio de Eagles modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 100 IU de penicilina-estreptomicina (meio completo) a 37° C com 5% de CO₂. As células foram colhidas em solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 5 mM de EDTA.

5 Clonagem de Glicoproteínas da Raiva

A sequência de aminoácido da proteína G da raiva (cepa ERA, Genbank: AF406693) foi usada para planejar uma versão otimizada no códon do gene da glicoproteína da raiva que transpõem a glicoproteína de tamanho natural do aminoácido de 1 a 524. O gene sintético foi clonado em pcDNA3.1Myc/His (Invitrogen) na estrutura com os rótulos c-Myc e 6-histidina (His). Estes imunorrótulos possibilitaram a purificação e detecção fáceis. As versões truncadas dos genes que codificam a glicoproteína rotulada foram construídas que contiveram o ectodomínio inteiro (20 a 439 a.a.). As truncagens foram feitas pela amplificação de PCR dos fragmentos desejados dos clones de glicoproteína de tamanho natural seguida pela digestão de restrição e ligação no pcDNA3.1Myc/His (Invitrogen) e verificado pela análise de sequência de DNA.

Para a isolamento de genes nativos que codificam várias cepas das glicoproteínas G da raiva, células MNA foram infectadas com o CVS-11, Jaritataka-CA, *Lasirus borealis*, *Lasirus cinereus*, e vírus da raiva ERA (Center for Disease Control and Prevention, USA). O RNA foi extraído a partir de células infectadas ou de virions usando reagente Trizol. A RTPCR foi realizada em 2 etapas. Primeiro, o cDNA foi sintetizado usando o Kit Ambion Retroscript, e os genes que codificam a glicoproteína da raiva foram depois amplificados usando Turbo Pfu (Stratagene) e preparadores específicos do vírus da raiva. Os genes que codificam a glicoproteína da raiva foram clonados no vetor de expressão mamífero pCDNA3.1MycHis (Invitrogen) nos sítios HindIII/Xba I na estrutura com os rótulos de epítipo c-Myc e His. Os genes recombinantes que codificam a glicoproteína da raiva mutada nos

resíduos classificados como sítios antigênicos I, II, III e sítio menor a foram sintetizados usando a mutagênese direcionada ao sítio. Os iniciadores de sobreposição contendo as mutações pontuais desejadas foram usadas para amplificar genes da glicoproteína mutante de tamanho natural e o vetor pcDNA3.1Myc/His da glicoproteína ERA otimizado no códon, previamente clonado. O DNA amplificado pela PCR foi digerido com DpnI para remover o padrão de partida não amplificado do tipo selvagem, transformado em bactéria e triado quanto a mutação pretendida pelo seqüenciamento. A seqüência codificadora completa de cada mutante foi confirmada, e as construções resultantes foram clonadas em vetores de expressão pcDNA3.1Myc/His.

Expressão da Glicoproteína Recombinante

Todas as construções foram transfectadas em células HEK-293T/17 usando Lipofectamina 2000 (Invitrogen) como descrito pelo fabricante. As células foram cultivadas a 85% de confluência em 150 mm de placas de cultura de tecido em 15 ml de DMEM-10% de soro de bezerro fetal (FCS). Quantidades de 30 µg de DNA misturado com 75 µl de Lipofectamina foram adicionados às células, e as placas foram incubadas durante a noite a 37° C. O meio foi removido e armazenado por 24, 48 e 72 horas após a transfecção para proteínas solúveis secretadas ou descartado para proteínas ligadas à membrana.

Purificação de Proteína Recombinante, Imunoprecipitação e Western Blot

As glicoproteínas ERA20-439 e CVS-1120-439 da raiva, ambas contendo rótulos de epítipo Myc e His, foram purificadas a partir do sobrenadante de cultura celular pela incubação com pérolas de níquel-ácido nitrilotriacético (Ni-NTA) (Invitrogen), seguido pela filtração em coluna e eluição de proteína usando 250 mM de imidazol. Para a imunoprecipitação de glicoproteínas ligadas à membrana de tamanho natural, as células transfectadas foram destacadas da placa com PBS/5mM de EDTA e

solubilizadas em PBS, 1% de CHAPS, 1X inibidor de proteinase completa. Os lisados celulares foram depurados pela centrifugação e incubados com HuMab 17C7 ou um HuMab que não da raiva de controle e Proteína A Sefarose. As proteínas imunoprecipitadas foram resolvidas pela SDS-PAGE para a análise subsequente.

Para a análise de imunomancha, as proteínas foram fervidas em 2X tampão de amostra de Laemmli (+/-BME) por 5 minutos e resolvidas usando 10 ou 12% de géis Novex (Invitrogen). Os géis foram transferidos para Immobilon P (Millipore) como descrito pelo fabricante, e a análise de imunomancha foi realizada. As proteínas foram detectadas usando o anticorpo anti-Myc de camundongo 9E10 (0,2 µg/ml) (BD Pharmingen) ou HuMab 17C7 (2 µg/ml) seguido pela IgG anti-camundongo ou anti-ser humano conjugada a rábano peroxidase (1:5000 Jackson Immuoresearch). As membranas foram incubadas com reagente de quimioluminescência realçada (Amersham) por 1 minuto e exposta à película X-Omat-AR por vários períodos de tempo.

Tingimento da Superfície Celular

As células transfectadas com c s que codificam a proteína G da raiva de tamanho natural for as 48 horas após a transfecção e incubadas com concentração va Mabs. A ligação das HuMabs foi detectada pela IgG anti-ser h da com ficoeritrina (Jackson) e a citometria de fluxo foi realizada usando FACScan com software CellQuest (Becton Dickinson).

ELISAs

Um ELISA de captura foi realizado em todos os hibridomas para identificar aqueles que fabricam IgG humano. As placas de ELISA foram revestidas com 3 µg/ml de anticorpos de cadeia leve capa anti-ser humano de cabra (Southern Biotech). As placas foram lavadas com tampão de lavagem (PBS, 0,05% de Tween), bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS, 1% de

BSA, 0,05% de Tween), lavadas, e depois as amostras foram adicionadas à placa (diluída 1:2 - 1:400 em tampão de bloqueio). A ligação foi detectada com anticorpo secundário IgG-AP anti-ser humano de cabra (Jackson ImmunoResearch), e as placas foram lavadas e desenvolvidas com sal
5 dissódico de p-Nitrofenil fosfato a 1 mg/ml em dietanolamina 1 M por 20 minutos. As placas foram lidas a 405 nm.

Um ELISA de glicoproteína de capture foi usado para testar a interação de HuMab 17C7 com CVS-1120-439 e ERA20-439 otimizada no códon. As placas foram revestidas com 7,5 µg/ml de anticorpo 9E10 anti-c-
10 Myc de camundongo (BD Pharmingen) ou anticorpo anti-c-Myc de galinha (Molecular Probes). As placas foram incubadas com glicoproteínas purificadas ou lisados celulares solubilizados com detergente, e depois incubados com anticorpos primários (HuMab 1707 e glicoproteína R0012 anti-raiva de camundongo (US Biological)) a 5 µg/ml. A ligação foi detectada
15 com secundário anti-humano de cabra conjugado com fosfatase alcalina (Jackson ImmunoResearch), e depois desenvolvida como descrito acima.

Produção de Vírus Resistentes à HuMab 17C7

As células de neuroblastoma de camundongo foram plaqueadas a $1,5 \times 10^5$ células/ml de reservatório no Dia 1. No Dia 2 1×10^1 a
20 108 FFU/ml de vírus da raiva CVS-11 foi incubados com IU/ml de HuMab 17C7 (133 µg/ml) a 37° C por 1 hora. A mistura de vírus/ anticorpo foi adicionada às células e incubados por 3 a 12 horas a 37° C. A mistura de vírus/anticorpo foi removida das células e as células foram lavadas uma vez com meio, seguido pela adição de meio fresco contendo IU/ml de HuMab
25 17C7 por um adicional de 60 horas. No Dia 5 o meio, contendo vírus resistente a HuMab 17C7 potencial, foi removido das lâminas, rotulado e armazenado a 4° C. as lâminas foram depois tingidas quanto a presença de células infectadas pela raiva pela incubação com diluição 1:40 de IgG anti-Raiva Centicor FITC (Fujirebio Diagnostics) por 30 minutos a 36° C / 0,5%

de CO₂. As lâminas foram depois lavadas e examinadas sob um microscópio fluorescente (filtro FITC) a 200x de ampliação. Os vírus tirados dos reservatórios contendo 1 a 5 focos fluorescentes foram amplificados em células MNA por 3 dias na presença de HuMab 17C7. O vírus amplificado foi testado quanto a capacidade para infectar células de MNA equivalentemente na presença e ausência de HuMab 17C7. As placas de 6 reservatórios de células MNA foram infectadas com o vírus resistente a HuMab 1707. O RNA foi extraído de células infectadas com vírus, transcritos de modo reverso, e a sequência que codifica a glicoproteína foi amplificada por PCR com iniciadores específicos da glicoproteína CVS-11. As mutações nos genes que codificam a glicoproteína foram analisadas pelo seqüenciamento da sequência codificadora inteira.

Pseudovírus da Raiva

Uma cadeia principal Env-, Vpr- HIV defeituosa em replicação contendo o gene da luciferase de vagalume inserida no gene nef, pNL4-3.Luc.R-E-, foi co-transfectada com a glicoproteína da raiva que codifica plasmídeos em células 293T. O reagente pNL4-3.Luc.R-E foi obtido através da NIH AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, e NIH. As partículas pseudovirais foram colhidas 48 a 72 horas após a transfecção, concentrados 30 vezes usando um concentrador centricon (Millipore) e congelado a -80° C. As contagens de luciferase por segundo das preparações de pseudovírus foram determinadas pela diluição em série do vírus seguido pela infecção e detecção (ver abaixo). Para os ensaios de neutralização aproximadamente 50.000 contagens por segundo de pseudovírus foram incubadas com e sem anticorpo por 1 hora na temperatura ambiente. A mistura de anticorpo/vírus foi depois aplicada às células HOS (ATCC# CRL-1543), na presença de 2 µg/ml de polibreno e espinoculada por 2 horas a 800G e 4° C, seguido pela incubação a 37° C/5% de CO₂. A atividade de luciferase foi depois ensaiada 72 horas após a infecção usando o

reagente Bright-Glo (Promega), de acordo com o protocolo do fabricante.

EXEMPLOS

A invenção é ainda descrita nos seguintes exemplos, que não limitam o escopo da invenção descrito nas reivindicações.

5 Exemplo 1. Geração de Anticorpos Monoclonais Anti-Vírus da Raiva

Camundongos transgênicos que compreendem genes da imunoglobulina humana gerados como descrito acima na seção intitulada “Geração de Anticorpos Monoclonais Humanos em Camundongos HuMAb” e fornecidos pela Medarex, Milpitas, CA, foram imunizados com 6 doses de
10 uma vacina contra a raiva comercial. A vacina foi administrada em combinação com adjuvante completo de Freund e depois reforçada com vacina contra a raiva adicional e adjuvante de Freund incompleto. A vacina contra a raiva consiste de vírus da raiva integral que foi inativado e liofilizado. As células B esplênicas foram isoladas do animal imunizado e
15 fundidas às células de mieloma de camundongo (P3X). Os hibridomas clonais foram gerados e triados pelo ELISA. Os hibridomas resultantes foram cultivados e o ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) para a detecção de cadeias de anticorpo capa/gama humanas foi usado para detectar anticorpos IgG humanos candidatos para outra análise. Os clones designados
20 54.17C7; 108.6G11; 35.5G5.1E12.149; 35.2B10.1G11.3FG; e 35.1E51G1.4CB aqui aludidos, respectivamente, como clones 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e 1E5 foram ainda determinados ligar especificamente glicoproteína G do vírus da raiva por um ensaio de ELISA específico de antígeno. Além disso, estes cinco clones de hibridoma foram selecionados e
25 determinados neutralizar a infecção pela raiva de células neuronais de camundongo em um ensaio RFFIT contra vários isolados da raiva diferentes (ver o Exemplo 3).

Conseqüentemente, os cDNAs de clones exemplares foram amplificados pela RT-PCR a partir do mRNA, clonados, e seqüenciados. Uma

seqüência de consenso da região V de cadeia pesada foi descoberta para cada clone (Tabela 7). Todos os cinco clones utilizaram uma região VH derivada de um de dois genes da região V da linha germinativa, mas utilizaram seqüências J diferentes. As seqüências de aminoácido das regiões VH e VL dos clones 17C7 e 6G11 exemplares são mostrados nas Figs. 1-2 (SEQ ID NOs: 1, 2, 15, e 16). As regiões determinadoras de complementaridade (isto é, CDR1, CDR2, e CDR3) são indicadas para as regiões de cadeias pesada e leve variáveis de anticorpo (SEQ ID NOs: 3-8; 17-22). O DNA que codifica a porção de ligação de antígeno de cada clone foi clonado em um vetor a ser expressado como um anticorpo humano para a administração aos seres humanos. As seqüências de ácido nucleico e aminoácido para as cadeias leve e pesada de clones de anticorpo 17C7 e 6G11 são fornecidas na listagem de seqüência (respectivamente, SEQ ID NOs: 9 a 12 e SEQ ID NOs: 23 a 26).

Tabela 7. Clones de Anticorpo e Composição de Gene

HuMab	Designação de Clone	Genótipo de camundongo HuMab
54.17C7	17C7	Hco12 Fêmea
108.6G11	6G11	Hco7 Macho
35.5G5	5G5	Hco7 Macho
35.1E5	1E5	Hco7 Macho
35.2B10	2B10	Hco7 Macho

HuMab	Cadeia leve da região variável		Cadeia pesada da região variável		
54.1707	VK: IGKV3-11*01	JK: IGKJ4*01	VH: IGHV3-30-3*01	D: IGHD3-3*01	JH: IGHJ4*02
108.6G11	VK: IGKV1-13*02	JK: IGKJ2*02	VH: IGHV3-33*05	D: IGHD6-13*01	JH: IGHJ4*02

(* Nomenclatura IMGT usada para a tabela acima)

Exemplo 2. Atividade de Ligação de Anticorpos Anti-Vírus da Raiva

A ligação de cada anticorpo ao vírus da raiva, em particular, à glicoproteína G do vírus da raiva foi determinada pelo ELISA usando técnicas padrão. A afinidade dos anticorpos antivírus da raiva quanto à glicoproteína G do vírus da raiva também pode ser medida com um instrumento Biacore®, que detecta as interações da ligação biomolecular com a tecnologia da

ressonância de plasma em superfície. Cada anticorpo é adicionado a chips sensores revestidos com proteína A, e a glicoproteína G do vírus da raiva é deixada fluir sobre o chip para medir a ligação. As constantes de ligação variando de um K_D de 1×10^{-6} M, K_D de 1×10^{-7} M, K_D de 1×10^{-8} M, K_D de 1×10^{-9} M, K_D de 1×10^{-10} M, K_D de 1×10^{-11} M, K_D de 1×10^{-12} M, e mais alto (ou internos ou faixas destes), podem ser determinadas. Os anticorpos antivírus da raiva com constantes de ligação favoráveis indicam que os anticorpos têm afinidades adequadas para o uso na terapia humana.

10 O anticorpo 17C7, quando testado na região de ectodomínio de uma glicoproteína G da raiva (otimizado no códon), foi determinado pela análise de Biacore como tendo uma afinidade de ligação de pelo menos $1,36 \times 10^{-8}$ M.

Exemplo 3. Neutralização do Vírus da Raiva pelos Anticorpos Anti-Vírus da Raiva

15 Os anticorpos expressados pelos hibridomas 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e 1E5 foram testados quanto a atividade de neutralização do vírus da raiva *in vitro* em uma série de experimentos (ver as Tabelas 8 a 11, abaixo).

20 Especificamente, a atividade neutralizadora da raiva foi determinada usando o Teste de Inibição de Foco Fluorescente Rápido (RFFIT), que detecta a infecção pelo vírus da raiva de células de neuroblastoma de camundongo usando anticorpos fluorescentemente rotulados. O ensaio de RFFIT é um ensaio padronizado que é usado pelos especialistas médicos e de saúde pública para determinar a potência de uma
25 dada preparação de anticorpo para neutralizar os vírus da raiva (isto é, inibir a sua capacidade para infectar células). O ensaio é tipicamente realizado usando um vírus fixo (CVS 11) mas também pode ser feito usando isolados de animais infectados. O ensaio é feito pela adição de uma quantidade padrão de vírus com e sem diluições de anticorpo às monocamadas de células de

neuroblastoma de camundongo. As monocamadas são incubadas depois focos de células de neuroblastoma infectadas são detectadas usando um anticorpo monoclonal de nucleoproteína anti-raiva fluorescentemente rotulado. Os focos são visualizados e contados usando microscópio fluorescente. Os resultados

5 subseqüentes são relatados como a concentração de anticorpo (diluição) onde o número de campos de microscópio sem focos fluorescentes é de 50%. Todos os ensaios incluíram uma preparação de imuno globulina da raiva padrão (SRIG) para comparação. Os anticorpos monoclonais anti-raiva humanos 17C7, 6G11, 5G5, 2B10, e 1E5 foram testados contra um painel de

10 isolados do vírus da raiva de significância na saúde pública de vários animais vertebrados da América do Norte.

A Tabela 8 mostra os resultados de ensaios de neutralização *in vitro* de anticorpos selecionados, quando comparados com terapias correntes (isto é, soro anti-raiva humano; "SRIG"), contra um painel de isolados do

15 vírus da raiva. Os números indicam as vezes de diluição pela qual um anticorpo pode ser diluído e ainda exibir uma atividade de neutralização de 50%, isto é, a capacidade para bloquear a infecção pelo vírus da raiva de células de neuroblastoma de murino *in vitro*. Os resultados para 17C7 em uma concentração mais alta contra isolados selecionados e são mostrados no painel

20 inferior.

Tabela 8. Resultados de Neutralização de Cepa

Vírus da raiva	SRIG	Sobrenadante de 17C7 ou 2 mg/ml*	6G11 1mg/ml	5G5 2 IU/ml ou 1 mg/ml*	1E5 2 IU/ml ou 1 mg/ml*	21310 2 IU/ml ou 1 mg/ml*
CVS-11	145	1100	230	21400*	21400*	21400*
ERA	85	>1400	21400	230	250	230
vírus Pasteur	17	>1400	1100	95	145	65
Racum, SE US	110	>1400	1300	21400*	21400*	21400*
Raposa cinza, TX	54	>1400	1100	95	95	110
Raposa cinza, AZ	50	>1400	1300	480	480	230
Raposa do ártico, AK	54	>1400	1200	1000*	800*	21400*
Coiole, TX	95	>1400	1200	60	60	60
Cão/Coiole, TX	50	>1400	1100	60	60	75
Jaritataca, Central norte	170	200	210	230	250	270
Jaritataca, Central sul	54	>1400	21400	1300*	21400*	21400*
Jaritataca, CA	29	>1400	800	1300*	1200*	21400*
Morcego, <i>Lasiurus</i>	42	320*	<5	<5*	<5*	7*

<i>Borealis</i> , TN						
Morcego, <i>Eptesicus fuscus-Myotis</i> spp., CO	95	625	200	70	95	60
Morcego, <i>Myotis</i> spp., WA	50	>1400	100	21400*	21400*	21400*
Morcego, <i>Lasiurus cinereus</i> , AZ	25	270*	< 5	< 5*	< 5*	85*
Morcego, <i>Pipistrellus subflavus</i> , AL	29	390	13	36	45	36
Morcego, <i>Tadarida brasiliensis</i> , AL	50	21400	125	180	210	125
Morcego, <i>Lasionycteris noctivagans</i> , WA	42	21300	36	40	25	50
Morcego, <i>Eptesicus fuscus</i> , PA	11	21400	< 5	11	16	29
Fuinha, NY/Puerto Rico	230	21400	21400	320	390	250
Cão, Argentina	54	21400	21400	1300*	1200*	1300*
Cão, Sonora	56	21400	21400	19	33	56
Cão, Gabon	54	21400	21400	45	19	50
Cão, Thai	56	21400	21400	17	14	40
lyssavírus que não da raiva						
Lagos	< 5	< 5 *	nd	nd	nd	nd
Mokola	< 5	< 5 *	nd	nd	nd	nd
Duvenhage	13	< 5*	nd	nd	nd	nd
Morcego europeu vírus 1	42	< 5 *	nd	nd	nd	nd
Morcego europeu vírus 2	40	< 5 *	nd	nd	nd	nd
Morcego australiano vírus	54	>1400 *	nd	nd	nd	nd

Inicialmente, cada um dos HuMabs foi triado quanto a capacidade para neutralizar a cepa CVS-11 do vírus da raiva. HuMabs neutralizantes foram depois testados mais extensivamente contra um amplo painel de isolados de significância de saúde pública das Américas do Norte e Sul, Europa, África e Ásia. Impressionantemente, HuMab 17C7 neutralizou a maioria dos isolados do vírus da raiva ao contrário dos HuMabs 2B10 e 5G5 (Tabela 8). O título de neutralização em ponto final de 50% foi determinado por um dos vírus das ruas da raiva, isolados de uma Jaritataca na Califórnia, USA (Jaritataca-CA). O título calculado para HuMab17C7 (a concentração testada foi de 0,03 mg/ml) contra Jaritataca da Califórnia foi de 1:12,898, o que demonstra que o HuMab 17C7 potencialmente neutraliza este vírus das ruas.

Para entender melhor como a potência de um único anticorpo

monoclonal humano compara com hRIG policlonal, HuMab 17C7 e hRIG foram testados em concentrações de anticorpo idênticas em um ensaio RFFIT usando o vírus da raiva CVS-11. O título de ponto final de 50% para hRIG foi 1:224, enquanto o mesmo foi de 1:7029 para HuMab 17C7 (Figura 4).

5 Portanto, HuMab 17C7 inibiu a infecção pelo CVS-11 mais potentemente do que o hRIG em concentrações de anticorpo equivalentes. Estes experimentos iniciais revelaram que HuMab 17C7 foi capaz de neutralizar muitos isolados do vírus da raiva, e que o grau de neutralização variou da neutralização potente do isolado da Jaritaca, CA em uma dose de anticorpo baixa (0,03
10 $\mu\text{g/ml}$; 1:12,898) quando comparada com a neutralização menos potente do CVS-11 na dose de anticorpo mais alta (2 mg/ml; 1:7029).

O teste repetido foi feito usando 17C7 purificado em concentrações variáveis contra os isolados da raiva que inicialmente não mostraram neutralização no teste de RFFIT em sobrenadantes de hibridoma
15 (*Lasiurus borealis*, TN e *Lasiurus cinereus*, AZ) e demonstraram ser capazes de neutralizar ambos os vírus no ensaio de repetição. Estes dados implicam que HuMab 17C7 interage com um epítipo neutralizador sobre a glicoproteína da raiva dos isolados de *L. borealis*-TN e *L. cinereus*-AZ (Tabela 9).

20 Tabela 9.

Neutralização de Ponto Final de 50% (Título Recíproco) de HuMabs 2B10, 17C7 e 5G5 em RFFITs Contra os Isolados do Vírus da Raiva de Morcegos da América do Norte (*Lasirus borealis* e *cinereus*)

Isolado da Raiva	HRIG (2IU/ml)	17C7 (2 mg/ml)	2B10 (1,5 mg/ml)	5G5 (1 mg/ml)
Morcego, <i>Lasiurus borealis</i> , TN	42	320	7	< 5
Morcego, <i>Lasiurus cinereus</i> , AZ 25	25	270	85	<5

O clone HuMab 17C7 foi também testado quanto a sua
25 capacidade para neutralizar *Lyssavirus* que não os da raiva. Os *Lyssavirus* não são um problema de saúde pública mundial significativa, mas têm causado doença fatal em um pequeno número de casos humanos. Estas ocorrências,

assim como a prevalência de alguns *Lyssavirus* em reservatórios mundiais, tem levado a um interesse recente em se produzirem produtos biológicos contra a raiva que protegem contra *Lyssavirus* que não da raiva. HuMab 17C7 foi capaz de neutralizar potentemente o *Lyssavirus* de morcego australiano quando testado em um ensaio de RFFIT modificado. O título calculado para HuMab17C7 (a concentração testada foi de 2 mg/ml) contra *Lyssavirus* do morcego australiano foi maior do que 1:1400 o que demonstra que HuMab 1707 neutraliza o *Lyssavirus* do morcego australiano (Tabela 10).

Tabela 10.

Neutralização de Ponto Final a 50% (Título Recíproco) de HuMab 17C7 em RFFITs Contra *Lyssavirus*.

<i>Lyssavirus</i>	HRIG (2 IU/ml)	HuMab 17C7 (2 mg/ml)
Raiva (CVS-11)	270	> 1400
Lagos	< 5	< 5
Mokola	< 5	< 5
Duvenhage	13	< 5
Morcego europeu <i>Lyssavirus</i> 1	42	< 5
Morcego europeu <i>Lyssavirus</i> 2	40	< 5
Morcego australiano <i>Lyssavirus</i>	54	> 1400

Estes dados mostram que os anticorpos monoclonais anti-raiva foram capazes de neutralizar isolados do vírus da raiva a partir de uma variedade de animais vertebrados Norte Americanos de significância para a saúde pública no ensaio de RFFIT.

Exemplo 4. Mapeamento de Epítipo de Anticorpos de Glicoproteína G Anti-Vírus da Raiva

O epítipo da glicoproteína G do vírus da raiva ligado por cada anticorpo monoclonal foi determinado pelos ensaios de imuno-manchamento e imunoprecipitação (ver a Fig. 3).

Um gene da glicoproteína G do vírus da raiva otimizado no códon de tamanho natural sintético humano do isolado do vírus da raiva ERA foi construído usando a reação da cadeia da polimerase (PCR) e engendramento genético. O gene e derivados de deleção foram clonados em

pCDNA3.1A (Invitrogen) para a expressão em células 293T humanas. Os experimentos de imunomancha e imunoprecipitação foram realizados usando técnicas padrão. Os resultados usando glicoproteína G do vírus da raiva recombinantemente expressada mostrou que o anticorpo monoclonal humano 17C7 mapeou a um epítipo dentro do terminal NH₃ de 19 a 422 AA do ectodomínio da glicoproteína G da raiva. Os clones monoclonais humanos 5G5, 2B10, 1E5, não reagiram em imunomanchas com fragmentos de glicoproteína G solúvel.

Para outro teste a interação de HuMab 17C7 com as glicoproteínas da raiva *in vitro*, as glicoproteínas do vírus da raiva de uma variedade de cepas e isolados do vírus da raiva foram clonados e expressados. A glicoproteína de CVS-11 do tipo selvagem foi inicialmente clonada e expressada a partir do vetor de expressão mamífero pcDNA3.1 Myc/His (Invitrogen) e mas em níveis baixos em células humanas transfectadas. Para superar este nível baixo de expressão, uma versão otimizada no códon do gene que codifica a glicoproteína da raiva ERA (era-co) foi engendrado usando técnicas reconhecidas no ramo. Outras proteínas G também foram clonadas (ERA (era-n), um isolado de Jaritataca da Califórnia, USA (jaritataca-ca), e os isolados de morcego *I. borealis*-tn e *I. cinereus*-az). A otimização no códon do gene que codifica a glicoproteína ERA levou a um aumento acentuado no nível de expressão quando comparado com a glicoproteína ERA do tipo selvagem (Figura 5A), e serviu como um reagente útil para muitos experimentos subseqüentes.

HuMab 17C7 foi determinado imunoprecipitar as glicoproteínas de células solubilizadas transfectadas com isolados era-co (não mostrado), era-n, jaritataca-ca, *I. borealis*-tn e *I. cinereus*-az (Figura 5B). Usando a citometria de fluxo foi ainda mostrado que HuMab 17C7 também ligou-se dependentemente da dose às células que expressam as glicoproteínas ERA-CO, ERA-N, *L. borealis*-TN e *L. cinereus*-AZ na sua superfície celular

(Figura 5C e D). Estes dados mostram que HuMab 17C7 liga-se especificamente às glicoproteínas do vírus da raiva de cepas e isolados múltiplos.

Para caracterizar melhor o epítopo que HuMab 17C7 reconhece, 17C7 foi testado e determinado reconhecer uma versão solúvel da glicoproteína da raiva (aminoácidos 20 a 439) que não possui os domínios citoplasmáticos ou de transmembrana da glicoproteína. HuMab 17C7 também foi determinado reconhecer uma forma secretada, solúvel da glicoproteína de ERA (ERA-CO20-439) e a glicoproteína CVS-11 (CVS-1120-439) que transpõem os aminoácidos 20 a 439 no ELISA (Figura 6A). Surpreendentemente, HuMab 17C7 reconheceu ERA-CO20-439 e ERACO desnaturados em um gel de SDS-PAGE depois da incubação em tampão de amostra contendo agentes redutores e SDS. Entretanto, a robustez do sinal foi enormemente realçada quando as amostras foram preparadas sem a adição de agentes redutores (Figura 6B).

Este reconhecimento no SDS-PAGE não foi observado para a glicoproteína CVS-1120-439 sem agentes redutores (Figura 6C). Estes dados indicam que HuMab 17C7 reconhece um epítopo descontínuo na glicoproteína da raiva ERA. HuMab 17C7 reconhece o site menor a e o sítio antigênico III da glicoproteína do vírus da raiva.

Para entender melhor quais regiões na glicoproteína da raiva são reconhecidos pelo HuMab 17C7, os vírus da raiva capazes de crescer na presença de HuMab 17C7 foram engendrados. De modo a criar vírus resistentes a HuMab 17C7 uma cepa CVS-11 e o isolado de Jaritaca-CA foram adaptados da cultura celular. Os vírus resistentes a HuMab 17C7 dos estoques virais de CVS-11 foram isolados. A análise das seqüências que codificam glicoproteína destes vírus derivados de CVS-11 revelou 3 mutações pontuais nos 8 vírus analisados (CVS1 até 8). DE maneira interessante, em dois casos as mudanças de aminoácido na Asparagina 336, foram

identificados. Um vírus conteve uma mudança de Asn para Lys, e vírus múltiplos contiveram uma mudança de Asn para Asp. Dois dos vírus contiveram uma mudança de Asn para Asp em 336, assim como uma mudança de Gln para Lys em 426. A asparagina 336 está dentro de uma região previamente identificada como parte do sítio antigênico III (Tabela 11).

De modo a enfocar se a Asparagina 336 foi um resíduo crítico para a ligação de HuMab 17C7, um resíduo de Asparagina 336 na construção de ERA-co em relação àquelas observadas nos vírus resistentes derivados de CVS-11 foi mutado. A glicoproteína ERA, como descrito nas Figuras 5 e 6, é robustamente reconhecida pelo HuMab 17C7; e o vírus ERA, que é altamente similar na seqüência de glicoproteína à Jaritataka-CA também é potentemente neutralizada pelo HuMab 17C7 quando comparado ao CVS-11. Portanto, neste conjunto de experimentos o resíduo Asp 336 foi mostrado ser importante para a neutralização pelo HuMab 17C7 do vírus CVS-11 e também importante para manter o epítipo HuMab 17C7 dentro da glicoproteína ERA. As glicoproteínas mutadas ERA-CO N336K e ERA-CO N336D foram expressadas e ensaiadas quanto ao reconhecimento por HuMab 17C7. As glicoproteínas mutantes foram reconhecidos pelo HuMab 17C7 em um ELISA, entretanto a ligação de HuMab 17C7 à glicoproteína ERA-CO N336K foi enormemente reduzida comparada com o tipo selvagem (Figura 7A). Os níveis de glicoproteína tipo selvagem e mutante capturados no ensaio de ELISA foram similares, como mostrado pela ligação comparável de um anticorpo monoclonal de glicoproteína anti-raiva de camundongo (Figura 7A). As glicoproteínas mutantes foram todas nos pesos moleculares apropriados, como mostrado pela imunoprecipitação usando o rótulo His, seguido pela análise de imunomancha com um anticorpo de rótulo Myc (Figura 7B). O HuMab 17C7 imunoprecipitou as glicoproteínas ERA-CO e ERA-CO N336D mais facilmente do que a glicoproteína ERA-CO N336K

(Figura 7B), o que é compatível com a ligação diminuída de ERA-CO N336K observada no ELISA. Ao contrário do ERA-CO tipo selvagem, as proteínas mutantes não foram reconhecidas no Western blot sob condições não redutoras (Figura 7B). Nós também criamos ERA-CO N336D Q426K e ERA Q426K, e os resultados de ELISA e imunomancha foram similares àqueles para ERA-CO N336D, e ERA-CO Q426K respectivamente, revelando que a mutação Q426K não afeta a ligação de HuMab 17C7.

De modo a enfocar se o reconhecimento pelo HuMab 17C7 correlacionou com a atividade de neutralização, um pseudovírus do HIV-1 pseudotipado na glicoproteína da raiva (10, 20), usando a glicoproteína ERA-CO foi criado. Foi observado que estas partículas de pseudovírus infectaram células humanas (Figura 8A), e que HuMab 17C7 potentemente inibiu a infecção pelo pseudovírus ERA-CO do tipo selvagem, mostrando inibição significativa abaixo de 100 pM (Figura 8B). HuMabs que não da raiva não relacionados foram testados a 1000 nM e não neutraliza o pseudovírus da raiva. De maneira interessante, HuMab 17C7 também inibiu a infecção dos pseudovírus ERA-CO N336K e ERA-CO N336D (Figura 8C), compatível com a observação de que HuMab 17C7 reconhece as glicoproteínas de ERA-CO N336K e ERA-CO N336D.

Similar ao HuMab 17C7, hRIG também inibiu todos os pseudovírus da raiva em uma maneira dependente da dose (Figura 8D). Estes dados demonstram que as mutações que tornam o vírus CVS-11 imune à neutralização com HuMab 17C7 diminui, mas não é anulada, o reconhecimento de HuMab 17C7 da glicoproteína ERA e a neutralização de pseudovírus ERA.

De modo a testar se outros sítios antigênicos bem caracterizados foram reconhecidos pelo HuMab 17C7 um painel de glicoproteínas mutantes contendo mudanças de aminoácido previamente relatadas para vírus resistentes a mAb alterado nos resíduos que afetam sítios

antigênicos I, II, III e site menor a foram criados (Tabela 11). HuMab 17C7 facilmente imunoprecipitou todas as glicoproteínas mutantes dos lisados celulares com a exceção da glicoproteína R333I, K342T, G343E, que foi mutada em uma porção de sítio antigênico III (a.a. 333) e sítio menor a (a.a. 342 e 343). Foi ainda caracterizado que o determinante importante para a ligação de HuMab 17C7 pela criação de um mutante de sítio III R333I separado e mutante de sítio menor a K342T, G343E. O mutante de sítio III R333I foi reconhecido pelo HuMab 17C7 em ELISA e imunomancha, enquanto os sítios menores a K342T, G343E e os mutantes de sítio III/menor a R333I, K342T, G343E foram menos bem reconhecidos (Figura 9A e B). Os mutantes K342T, G343E e os R333I, K342T, G343E foram reconhecidos por um anticorpo monoclonal da raiva comercial (Figura 9A), e foram do peso molecular apropriado (Figura 9B), indicando que as glicoproteínas foram expressadas em níveis comparáveis. Portanto, foi determinado que a falta de ligação HuMab 17C7 aos mutantes do sítio menor a foi devido às mutações nos aminoácidos 342 e 343 da glicoproteína, demonstrando que estes aminoácidos são importantes para o reconhecimento de HuMab 17C7 da glicoproteína da raiva (Tabela 12).

Além disso, as seqüências de glicoproteína de isolados do vírus da raiva e *Lyssavirus* que não da raiva nos aminoácidos 336, 342 e 343 foram comparadas. Os resíduos importantes para HuMab 1707 são conservados entre as cepas divergentes do vírus da raiva e *Lyssavirus* de morcego australiano, mas não outros *Lyssavirus* (Tabela 13). As seqüências de glicoproteína de 154 vírus da raiva foram comparadas de isolados de ser humano, morcego e carnívoros de todo o mundo, incluindo as Américas do Norte e Sul, China e Índia. A comparação de seqüência revelou que a Asparagina 336 foi 93% conservada, a Lisina 342 foi 98% conservada e a Glicina 343 foi 99% conservada. Estes dados indicam que os resíduos importantes para o reconhecimento pelo HuMab 17C7 de glicoproteína do

vírus da raiva são altamente conservados.

Tabelas 11.

Vírus Resistentes a HuMab 17C7

Vírus	Número de Aminoácido	Mudança de Aminoácido	Mudança de Códon	Proximidade ao sítio antigênico
CVS1	336	Asn para Lys	AAT para AAG	III
CVS2-6	336	Asn para Asp	AAT para GAT	III
CVS7-8	336	Asn para Asp	AAT para GAT	III
CVS7-8	426	Glu para Asp	CAG para AAG	N/A

Tabela 12.

5 HuMab 17C7 Reconhece Glicoproteínas Mutadas de Sítio I e Sítio II

Mutações na glicoproteína recombinante	ligação de HuMab 17C7	Sítios Antigênicos
R3331	+	III
K342T, G343E	-	Menor a
R3331, K342T, G343E	-	Menor a e III
K226E, L231P	+	I
G34E	+	II
G40V, S42P, M44I	+	II
K198E	+	II

- Menor a - Menor a e III

Tabela 13.

Aminoácidos 330 a 345 dos Vírus da raiva e Outros *Lyssavirus*

Vírus	Genbank ID	Aminoácidos 330-345
CVS-11	AF085333	KSVRTWNEIIPSKGCL
ERA-CO	AF406693	KSVRTWNEILPSKGCL
Skunk-CA	N/A	KSVRTWNEILPSKGCL
<i>L. borealis</i> -TN	N/A	KSVKTWNEVIPS KGCL
<i>L. cinereus</i> -AZ	N/A	KSVKTWNEVIPS KGCL
ERA nativa	N/A	KSVRTWNEIIPSKGCL
ABLV	AF406693	KSVRTWNEIIPSKGCL
EBLV-1	AF298143	KSVREWTEVIPS KGCL
EBLV-2	AF298145	KSIREWTDVIPS KGCL
Lagos	AF429312	LKVDNWSEILPSKGCL
Mokola	MFU17064	KRYDRWADILPSRGCL

- 10 HuMab 17C7 reconhece um epítipo descontínuo devido à sua capacidade para ligar com reatividade maior com proteína não reduzida. A interação de HuMab 17C7 com a glicoproteína da raiva também é única porque a mesma é capaz de imunoprecipitar glicoproteínas ligadas à
- 15 membrana de uma variedade de isolados da raiva, e neutralizar todos estes isolados, mas é apenas capaz de interagir com um subconjunto de glicoproteínas solúveis secretadas no ELISA e imunomanchas.

O reconhecimento de proteína não reduzida pelo HuMab 17C7 indica que o sítio antigênico II, sítio menor a ou um determinante conformacional não conhecido da glicoproteína da raiva é importante para o reconhecimento pelo HuMab 17C7. A análise de glicoproteínas mutantes
5 revelou que 2 mudanças de aminoácido no sítio menor a dramaticamente diminuiu o reconhecimento de HuMab 17C7 da glicoproteína da raiva. Estas duas mudanças de aminoácido romperam o sítio de ligação do HuMab 17C7 na glicoproteína da raiva e/ou resultam em uma modificação da estrutura terciária da glicoproteína da raiva crítica para a ligação de HuMab 17C7.

10 Estes dados mostram que os vírus resistentes ao HuMab 17C7 indicam que a Asparagina 336 é importante para a neutralização pelo HuMab 17C7. A mudança de aminoácido no resíduo 336 rompe o sítio de ligação do HuMab 17C7 na glicoproteína da raiva e/ou resulta em uma modificação da estrutura da glicoproteína da raiva crítica para a ligação de HuMab 17C7.

15 A análise de glicoproteínas mutantes criadas com mutagênese direcionada ao sítio também revelou que HuMab 1707 reconhece tanto o sítio menor a quanto parte do sítio antigênico III.

Quando juntos estes resultados indicam que HuMab 17C7 reconhece um epítipo que é amplamente conservado. A reatividade cruzada
20 ampla de HuMab 17C7 indica que o mesmo pode ser usado no lugar de RIG para a profilaxia de pós exposição.

Exemplo 5. Proteção de Hamsters da Inoculação do Vírus da Raiva Letal pela Administração de Anticorpos Anti-Vírus da Raiva

Os anticorpos foram testados quanto a capacidade para
25 proteger hamsters da inoculação com uma dose letal de vírus da raiva (ver as Tabelas 14 e 15).

O anticorpo monoclonal humano 17C7 também foi testado em um modelo de hamster de profilaxia de pós exposição (PEP) para determinar o seu potencial como uma profilaxia para a infecção pelo vírus da raiva em

seres humanos. Hamsters foram inoculados no músculo da panturrilha da pata traseira com uma dose fatal de vírus da raiva. O vírus inoculado foi originalmente isolado de um coioote do Texas. Neste modelo, os animais não tratados morrem de infecção pelo vírus da raiva em menos do que duas

5 semanas.

Em resumo, os animais foram inoculados no músculo da panturrilha com 50 μ l de vírus da raiva e administrados com anticorpos antivírus da raiva no mesmo local 24 horas mais tarde. Os animais ($n = 9$) foram tratados com uma dose única de 19 mg/kg de imunoglobulina derivada do soro da raiva humana comercialmente disponíveis (HRIG, Imogam, Aventis) ou anticorpo monoclonal humano 17C7 em várias doses (5, 0,5 ou 0,25 mg/kg). Todos os animais em um grupo inoculado não tratado morreram de raiva dentro de 2 semanas de inoculação. A sobrevivência percentual a 63 dias depois da inoculação mostrou melhor proteção pelo anticorpo monoclonal em uma dose de 0,25 mg/kg do que a imunoglobulina humana comercialmente disponível (Tabela 14).

10
15

Um experimento similar foi conduzido onde os animais foram tratados com anticorpo após a exposição á raiva e, além disso, tratados com vacina contra a raiva. A vacina humana comercial foi administrada no músculo da panturrilha oposto do sítio de inoculação em um volume de injeção de 50 μ l 1, 3, 7, 14 e 28 dias depois da inoculação da raiva. Os anticorpos foram administrados como previamente descrito. Mais uma vez, a porcentagem de sobrevivência em 53 dias depois da inoculação mostrou melhor proteção pelo anticorpo monoclonal em uma dose de 0,125 mg/kg do que a imunoglobulina humana comercialmente disponível (Tabela 15).

20
25

O anticorpo foi administrado sozinho e com vacina e os resultados mostrados nas Tabelas 14 e 15 demonstram que os hamsters inoculados com uma dose letal de vírus da raiva podem ser protegidos com os anticorpos da invenção dados depois da exposição ao vírus sozinhos (ver a

Tabela 14) ou em conjunção com a administração de uma vacina contra a raiva (Tabela 15).

Para demonstrar que 17C7 não interfere com a resposta da vacina, os hamsters foram administrados com 17C7 e vacina contra a raiva.

- 5 Como mostrado na Tabela 16, os animais responderam à vacina mesmo quando administrados com 17C7, demonstrando deste modo que o anticorpo 17C7 não interfere com a resposta de vacina.

Tabela 14.

Proteção na pós exposição da raiva com um anticorpo monoclonal humano^a

Amostra	IU/kg	mg/kg	Sobrevivência
A imunoglobulina da raiva humana	15	8,0	5/9
B " "	6	4,0	4/9
C " "	1	0,4	0/9
D " "	0,05	0,0	0/9
E hu MoAb 17C7	26	1,7	9/9
F " "	7	0,9	9/9
G " "	1	0,1	6/9
H " "	0,05	0,0	1/9
I Controle	-	-	0/9

a

Em 24 horas depois da inoculação de um isolado de vírus da raiva de coiole do Texas (#323), a profilaxia foi iniciada em oito grupos de tratamento de 9 animais cada com anticorpo monoclonal humano 17C7 (26 IU/kg; 7 IU/kg, 1 IU/kg ou 0,05 IU/kg) ou imunoglobulina da raiva humana comercial (15 IU/kg, 6 IU/kg, 1 IU/kg ou 0,05 IU/kg), administrado no sítio de inoculação do vírus. O grupo de controle não tratado consistiu de 9 animais.

Tabela 15.

Profilaxia na Pós Exposição à Raiva incluindo vacina: comparação de um anticorpo monoclonal humano com imunoglobulina da raiva humana^a

Amostra	IU/kg	mg/kg	Sobrevivência em 90 dias
A imunoglobulina da raiva humana	20	21	17/18
B anticorpo monoclonal humano	20	1	17/18
C " "	10	0,5	16/18
D " "	2	0,1	16/18
E controles	-	-	0/18

a

- 5 Em 24 horas depois da inoculação do vírus da raiva (50 µl de um 1:1000 (10^{6,8} MICLD₅₀/ml) de homogenado de glândula salivar de um coioote naturalmente infectado (isolado do vírus da raiva de coioote do Texas #323)), a profilaxia foi iniciada em quatro grupos de tratamento (A a D) de 18 hamsters cada um com anticorpo monoclonal humano 17C7 (20 IU/kg; 10 IU/kg ou 2
- 10 IU/kg) ou imunoglobulina da raiva humana comercial (20 IU/kg), administrados no local de inoculação do vírus. Um volume de 50 µl de vacina contra a raiva comercial foram administrados no músculo da panturrilha esquerda. Doses adicionais de vacina foram administradas nos dias 3, 7, 14 e 28. O grupo de controle não tratado consistiu de 18 animais.

15 **Tabela 16.**

Títulos Médios Geométricos de Anticorpos Neutralizadores do Vírus da Raiva a Seguir das Combinações de Vacina e Anticorpo contra a Raiva

	Dia				
Grupos	3	7	14	28	42
Ig+vacina contra a raiva humana	15	26-	1.315	10.013	5.878
± Desvio padrão	9-26	13-50	1241-1393	3730-26873	4293-8049
B hu MoAb + vacina	12	22	339	4,442	6,704
+/- Desvio Padrão	8-17	11-45	129-8889	2754-7158	6257-7189
C hu MoAb + vacina	10	17	404	9,304	5,812
+/- Desvio Padrão	9-11	9-31	181-900	1186-21378	4708-7161

a

Três grupos de tratamento (A-C) de animais receberam anticorpo monoclonal

humano 17C7 (25 IU/kg (grupo B) ou 15 IU/kg (grupo C)) ou imunoglobulina da raiva humana comercial (25 IU/kg) administrados intramuscularmente no músculo da panturrilha esquerdo. Um volume de 50 µl de vacina contra a raiva comercial foi administrado no músculo da panturrilha direita. As doses adicionais de vacina foram administradas nos dias 3, 7, 14 e 28. Nos dias 3, 7, 14, 28, e 42, seis animais por grupo foram sedados, o sangue foi coletado, e os animais foram eutanizados.

Quando juntos, estes dados indicam que HuMab 17C7 compativelmente fornece proteção *in vivo* contra a raiva e pode ser usado no lugar de RIG para a profilaxia de pós exposição.

Exemplo 6. Produção de Anticorpos Anti-Vírus da Raiva para a Administração em Seres Humanos

Os anticorpos humanos da presente invenção podem ser clonados e recombinantemente expressados para facilitar ou aumentar a sua produção usando técnicas conhecidas.

As seqüências de ácido nucleico que codificam a cadeia pesada e as cadeias leves de um clone de anticorpo da invenção podem ser clonadas em um vetor pIE-Ugama1F usando a metodologia de DNA recombinante padrão. O vetor é amplificado na *E. coli*, purificada, e transfectada em células CHO. As células transfectadas são plaqueadas a 4×10^5 células por reservatório em uma placa de 96 reservatórios e selecionadas quanto a transfecção de vetor com G418. Os clones resistentes selecionados pela resistência a G418, são depois ensaiados junto com outros transfectomas para a produção de IgG. A expressão de um anticorpo pode ser amplificado pelo crescimento na presença de concentrações crescentes de metotrexato. Uma cultura capaz de crescer em 175 nM de metotrexato é escolhida para a clonagem de células únicas para desenvolvimento adicional. O plaqueamento da cultura em placas de 96 reservatórios em densidade baixa possibilitou a geração de culturas que surgem de uma única célula ou clones. As culturas

são triadas quanto a produção de IgG humano, e a célula que produz o nível mais alto de IgG é tipicamente selecionado para outro uso. O clone amplificado em metotrexato é expandido para produzir um banco de célula incluindo frascos de congelamento múltiplos de células. Alternativamente, vetores da glutamina sintetase (GS) podem ser usados com a seleção de célula obtida usando, por exemplo, metionina sulfoximina (ver, por exemplo, as Patentes US N^{os} 5.827.739, 5.122.464, 5.879.936, e 5.891.693).

Para preparar anticorpos a partir de células transfectadas, as células de um clone isolado nas etapas anteriores são cultivados e expandidos como inóculo para um biorreator. O biorreator tipicamente encerra um volume de 500 litros de meio de cultura. As células são cultivadas no biorreator até que a viabilidade celular caia, o que indica que uma concentração de anticorpo máxima foi produzida na cultura. As células são removidas pela filtração. O filtrado é aplicado a uma coluna de proteína α . Os anticorpos se ligam à coluna, e são eluídos com uma lavagem em pH baixo. Em seguida, os anticorpos são aplicados a uma coluna de Q-Sefarose para remover contaminantes residuais, tais como proteínas de célula CHO, DNA, e outros contaminantes (por exemplo, contaminantes virais, se presentes). Os anticorpos são eluídos da coluna de Q-Sefarose, nano-filtrados, concentrados, e lavados em um tampão tal como PBS. A preparação é depois assepticamente aliquotada em frascos para a administração.

Outras Formas de Realização

Aqueles habilitados na técnica reconhecerão ou serão capazes de averiguar usando não mais do que experimentação de rotina, muitos equivalentes para as formas de realização específicas da invenção aqui descritas. Tais equivalentes são intencionados a serem abrangidos pelas seguintes reivindicações.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal humano isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado(a) pelo fato de que se liga especificamente ao(s) epítopo(s) pertencentes à proteína G do vírus da raiva reconhecidos por um anticorpo que compreende uma seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia leve como mostrado na SEQ ID NO: 2 e uma seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia pesada como mostrado na SEQ ID NO: 1 (anticorpo 17C7), ou uma seqüência de aminoácidos de região variável de cadeia leve como mostrado na SEQ ID NO: 16 e uma seqüência de aminoácido de região variável de cadeia pesada como mostrado na SEQ ID NO: 15 (anticorpo 6G11).

2. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo 17C7 ou porção de ligação de antígeno do mesmo se liga à glicoproteína do vírus da raiva e inibe a habilidade do vírus de infectar células, e que compreende:

uma seqüência de CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 5,

uma seqüência de CDR3 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 8,

uma seqüência de CDR2 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 4,

uma seqüência de CDR2 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 7,

uma seqüência de CDR1 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 3, e

uma seqüência de CDR1 de região variável de cadeia leve compreendendo SEQ ID NO: 6.

3. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de

acordo com a reivindicação 2, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende sequências de aminoácidos de região variável de cadeias pesada e leve como mostrado nos resíduos 20 a 144 da SEQ ID NO: 1 e resíduos 21 a 127 da SEQ ID NO: 2, respectivamente.

4. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende uma sequência de aminoácido de região variável de cadeia pesada como mostrado nos resíduos 20 a 144 da SEQ ID NO: 1.

5. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 2, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende uma sequência de aminoácido de região variável de cadeia leve como mostrado nos resíduos 21 a 127 da SEQ ID NO: 2.

6. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-5, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo: (a) inibe a ligação do vírus da raiva às células de mamífero; ou (b) inibe a ligação da glicoproteína do vírus da raiva às células de mamífero.

7. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo de plena extensão.

8. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-6, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo de cadeia única ou a porção de ligação de antígeno do mesmo é um fragmento Fab.

9. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-8, caracterizado(a) pelo fato

de que compreendem ainda um rótulo ou toxina.

10. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo como definida em qualquer uma das reivindicações 1-9, em um carreador farmacologicamente aceitável.

11. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende:

(i) um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada do anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo como definido na reivindicação 2 ou 3, em que o ácido nucleico é idêntico à SEQ ID NO: 13 e

(ii) um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo como definido na reivindicação 2 ou 3, em que o ácido nucleico é idêntico à SEQ ID NO: 14.

12. Microrganismo transgênico, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 11.

13. Célula hospedeira procariótica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 11.

14. Célula hospedeira procariótica de acordo com a reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira procariótica é uma célula *E. coli*.

15. Anticorpo monoclonal humano isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo 6G11 ou porção de ligação de antígeno do mesmo se liga à glicoproteína do vírus da raiva e inibe a habilidade do vírus de infectar células, e que compreende:

uma sequência de CDR3 de região variável de cadeia pesada compreendendo SEQ ID NO: 19,

uma sequência de CDR3 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 22,

uma sequência de CDR2 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 18,

uma sequência de CDR2 de região variável de cadeia leve

5 compreendendo SEQ ID NO: 21,

uma sequência de CDR1 de região variável de cadeia pesada

compreendendo SEQ ID NO: 17, e

uma sequência de CDR1 de região variável de cadeia leve

compreendendo SEQ ID NO: 20.

10 16. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende sequências de aminoácidos de região variável de cadeias pesada e leve como mostrado na SEQ ID NO: 15 e resíduos 2 a 107 da SEQ ID NO: 16, respectivamente.

15 17. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende uma sequência de aminoácido de região variável de cadeia pesada como mostrado na SEQ ID NO: 15.

20 18. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com a reivindicação 15, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo compreende uma sequência de aminoácido de região variável de cadeia leve como mostrado nos resíduos 2 a 107 da SEQ ID NO: 16.

25 19. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-18, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo: (a) inibe a ligação do vírus da raiva às células de mamífero; ou (b) inibe a ligação da glicoproteína do vírus da raiva às células de mamífero.

20. Anticorpo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15 a 19, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo de plena extensão.

5 21. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-19, caracterizado(a) pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo de cadeia única ou a porção de ligação de antígeno do mesmo é um fragmento Fab.

10 22. Anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo de acordo com qualquer uma das reivindicações 15-21, caracterizado(a) pelo fato de que compreendem ainda um rótulo ou toxina.

23. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo como definida em qualquer uma das reivindicações 15-22, em um carreador farmacologicamente aceitável.

15 24. Vetor de expressão, caracterizado pelo fato de que compreende:

20 (i) um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia pesada do anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo como definido na reivindicação 15 ou 16, em que o ácido nucleico é idêntico aos resíduos 1 a 432 da SEQ ID NO: 25 e

(ii) um ácido nucleico que codifica uma região variável de cadeia leve ou porção de ligação de antígeno do mesmo como definido na reivindicação 15 ou 16, em que o ácido nucleico é idêntico aos resíduos 1 a 387 da SEQ ID NO: 23.

25 25. Microrganismo transgênico, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 24.

26. Célula hospedeira procariótica, caracterizada pelo fato de que compreende o vetor de expressão como definido na reivindicação 24.

27. Célula hospedeira procariótica de acordo com a

reivindicação 26, caracterizada pelo fato de que a célula hospedeira procariótica é uma célula *E. coli*.

28. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende um ou mais anticorpos monoclonais humanos isolados ou porções de ligação de antígeno do mesmo como definidos(as) em qualquer uma das reivindicações 1-9 e 15-22, e instruções para o uso no tratamento da doença mediada pelo vírus da raiva.

29. Uso de um anticorpo monoclonal humano isolado ou porção de ligação de antígeno do mesmo, como definido em qualquer uma das reivindicações 1-9 e 15-22, ou de uma composição como definida na reivindicação 10 ou 23, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar infecção da raiva em um paciente.

30. Uso de acordo com a reivindicação 29, caracterizado pelo fato de que o paciente é humano.

31. Uso de acordo com a reivindicação 29 ou 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo são administrados intravenosa, intramuscular ou subcutaneamente ao paciente.

32. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 29-31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo ou porção de ligação de antígeno do mesmo são administrados em combinação com um segundo agente terapêutico.

33. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o segundo agente é um segundo anticorpo humano ou porção de ligação de antígeno do mesmo.

34. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o segundo agente é um agente antiviral.

35. Uso de acordo com a reivindicação 32, caracterizado pelo fato de que o segundo agente é um vírus da vacina contra a raiva.

36. Uso de acordo com a reivindicação 35, caracterizado pelo

fato de que o vírus da vacina contra a raiva é uma glicoproteína do vírus da raiva ou fragmento desta.

FIG. 1**SEQUÊNCIA DE AMINOÁCIDO DA REGIÃO VARIÁVEL DE
ANTICORPO 17C7 HUMANO ANTI-RAIVA EXEMPLAR****Região variável de cadeia pesada(17C7 VH)**

(SEQ ID NO: 1)

Líder**CDR 1**

MEFGLNWFVLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSITYAMHWVRQAP 60

CDR 2

(SEQ ID NO: 3)

GKGLEWVAVVSYDGRTKDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRTEDTAVYFCARERF 119

(SEQ ID NO: 4)

CDR 3

SGAYFDYWGQGTLLVTVSSASTKGP 144

(SEQ ID NO: 5)

Região variável de cadeia leve (17C7 VL)

(SEQ ID NO: 2)

Líder**CDR 1**

MEAPAQLLFLLLLLWLPDTTGEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKP 60

CDR 2

(SEQ ID NO: 6)

CDR 3

GQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYSCQQRNNWPPTFGG 120

(SEQ ID NO: 7)

(SEQ ID NO: 8)

GTKVEIK 127

FIG. 2**SEQÜÊNCIA DE AMINOÁCIDO DA REGIÃO VARIÁVEL DE
ANTICORPO 6G11 EXEMPLAR****Região variável de cadeia pesada (6G11 VH)**
(SEQ ID NO: 15)**Líder**

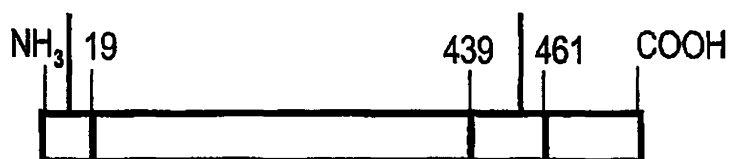
MEFGLSWVFLVALLRGVQCQVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIL
(SEQ ID NO: 17) (SEQ ID NO: 18)

YDGENKTHADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIAFAGSAFDYWGQGT LVT VSSASTKGP
(SEQ ID NO: 19)

Região variável de cadeia leve (6G11 VL)
(SEQ ID NO: 16)**Líder**

MDMMVPAQLLG LLLLWLPGARCAIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSVLAWYQOKSGKAPKELIY
(SEQ ID NO: 20)

CDR 2 CDR 3
DASSLESGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSTYPTFGQGTKLEIK
(SEQ ID NO: 21) (SEQ ID NO: 22)

FIG. 3**MAPEAMENTO DE EPÍTOPO DE GLICOPROTEÍNA DO
VÍRUS DA RAIVA****Esquemático da Estrutura de Proteína****Peptídeo de Sinal****Domínio de Transmembrana**

T7

Dados de Mapeamento de Epítipo

	clone	Resíduos de a.a.	imunomancha	
	COG524	19-524	+	+
	COG439	19-439	+	+
	COG422	19-422	+	+

FIG. 4

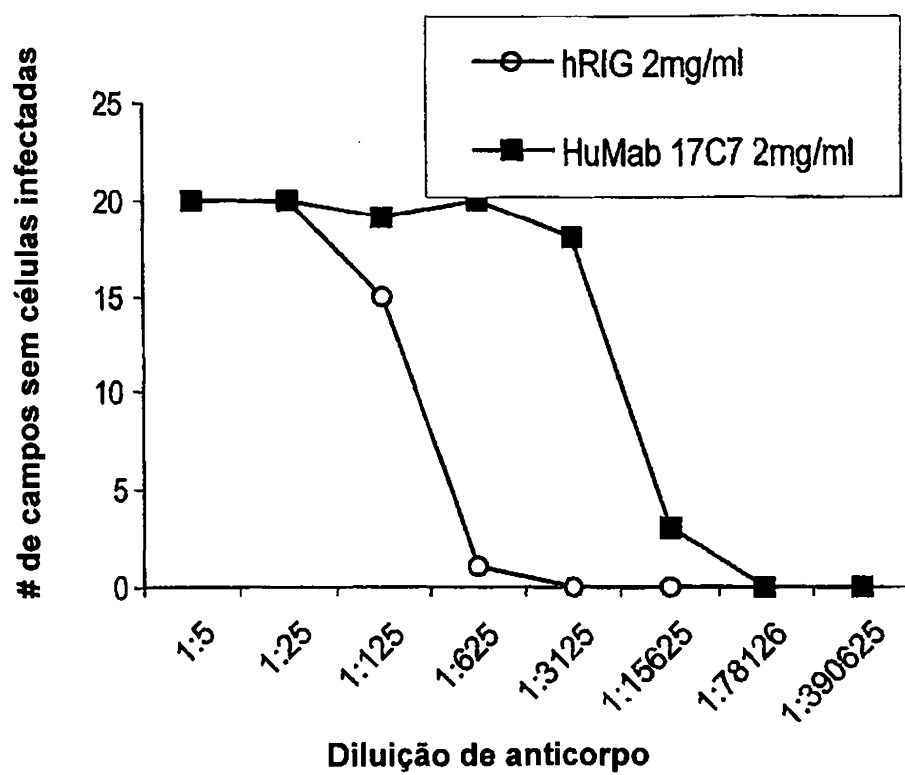


FIG. 5

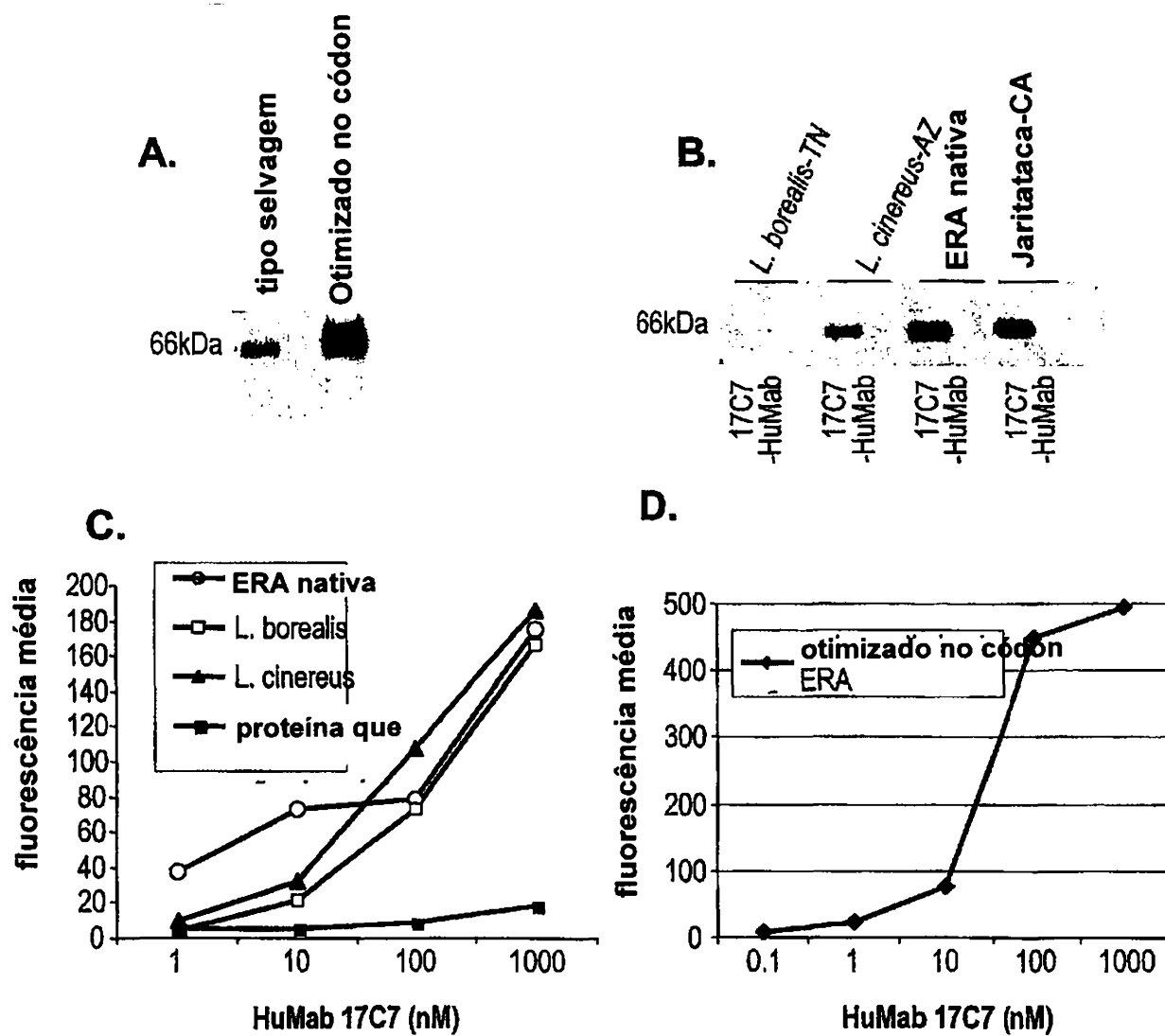
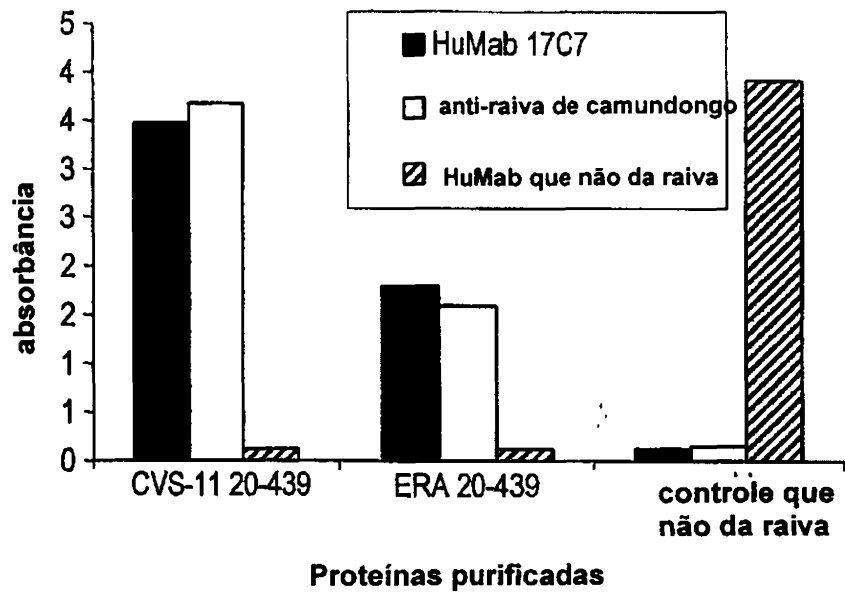


FIG. 6

A



B



C

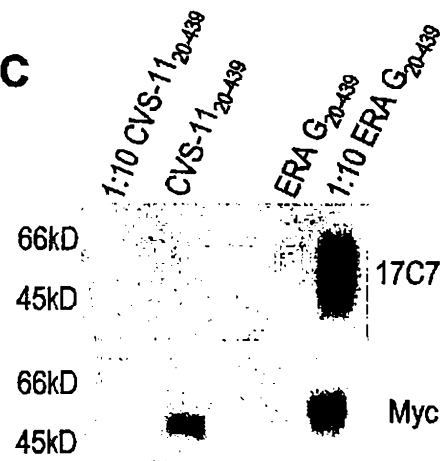
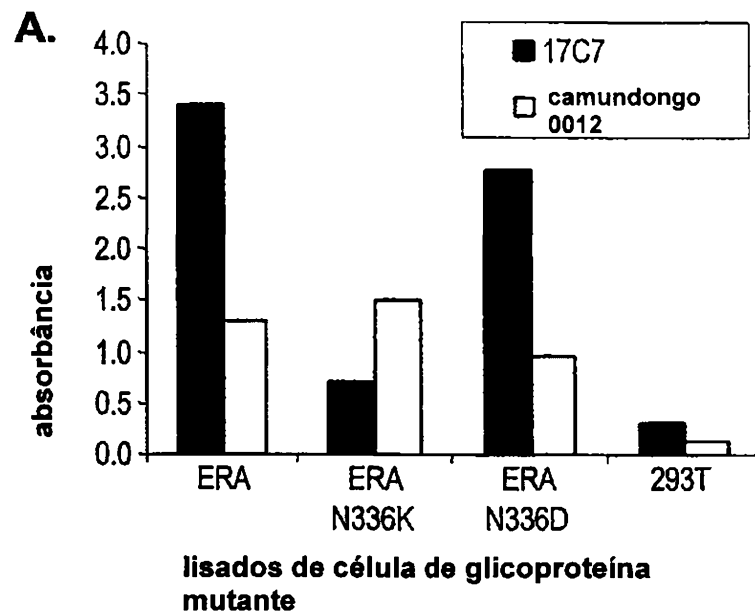


FIG. 7



B.

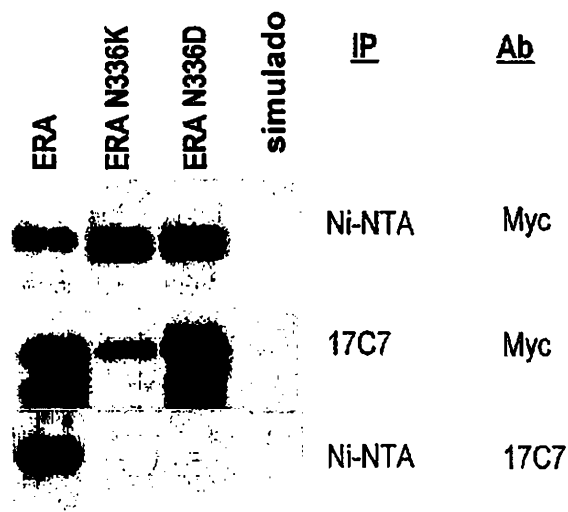


FIG. 8

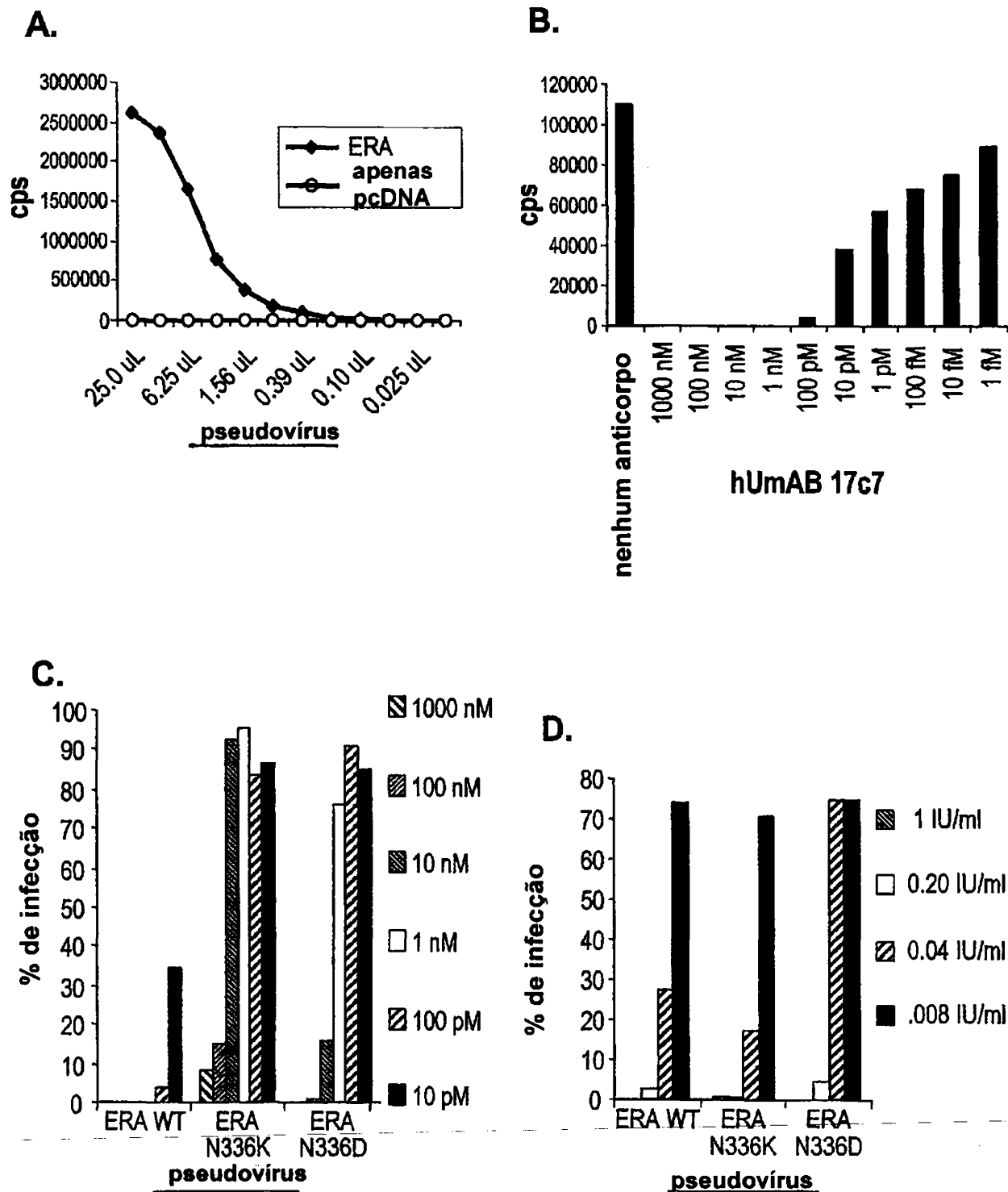


FIG. 9

