



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

(11) BR 112014029274-4 B1



(22) Data do Depósito: 24/05/2012

(45) Data de Concessão: 15/02/2022

(54) Título: ANTICORPO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO, E, KIT PARA TRATAR INFECÇÃO RÁBICA

(51) Int.Cl.: C07K 16/10; C12N 15/13; A61K 39/42; A61P 31/14.

(73) Titular(es): MOUNTGATE INNOTECH (HK) LIMITED.

(72) Inventor(es): ENYUN SHEN; SHIQI REN.

(86) Pedido PCT: PCT CN2012076012 de 24/05/2012

(87) Publicação PCT: WO 2013/174003 de 28/11/2013

(85) Data do Início da Fase Nacional: 24/11/2014

(57) Resumo: ANTICORPO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO, KIT PARA TRATAR INFECÇÃO RÁBICA OU DETECTAR VÍRUS RÁBICO EM UMA AMOSTRA, E, ÁCIDO NUCLEICO ISOLADO. A presente divulgação se refere geralmente a anticorpos antirrábicos que podem se ligar a e neutralizar o vírus rábico. Os anticorpos da presente tecnologia são úteis sozinhos ou em combinação com terapias conhecidas na técnica para o tratamento ou prevenção de infecção rábica.

ANTICORPO ISOLADO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO ANTICORPO, E, KIT PARA TRATAR INFECÇÃO RÁBICA CAMPO TÉCNICO

[001] Esta tecnologia se refere geralmente à preparação de anticorpos antirrábicos e usos dos mesmos. Em particular, a presente tecnologia se refere à preparação de anticorpos neutralizantes do vírus da raiva e seu uso na prevenção e tratamento de infecção rábica.

FUNDAMENTOS

[002] A seguinte descrição é fornecida para auxiliar a compreensão do leitor. Nenhuma das informações fornecidas ou referências citadas é admitida como sendo estado da técnica para os presentes métodos.

[003] A raiva é uma infecção viral com distribuição quase mundial que afeta principalmente animais selvagens e domésticos, mas também afeta os seres humanos. A infecção causa uma encefalite devastadora e, se não tratada, quase invariavelmente fatal. Mais de 70.000 pessoas morrem anualmente de infecções ráticas, e milhões mais requerem tratamento pós-exposição.

[004] O vírus rábico é um vírus de RNA de fita única, envelopado da família *Rhabdovirus* e gênero *Lyssavirus*. O genoma do vírus rábico codifica cinco proteínas: RNA polimerase dependente de RNA (L); uma nucleoproteína (N); uma proteína fosforilada (P); uma proteína matriz (M) localizada no lado interno do envelope de proteína viral; e uma glicoproteína de superfície externa (G). A proteína G (62-67 kDa) é uma glicoproteína tipo-I composta por 505 aminoácidos, com dois a quatro sítios de N-glicosilação potenciais, dos quais apenas um ou dois são glicosilados dependendo da cepa viral. A proteína G forma protruções que cobrem a superfície externa do envelope de vírion e é conhecida por induzir a produção de anticorpo

neutralizantes de vírus (vide Gaudin et al., 1999).

[005] A infecção rábica pode ser tratada ou prevenida através das imunizações ativas e passivas. A profilaxia pós-exposição rábica (PEP) inclui tratamento de feridas local imediato e administração de ambas as imunizações passivas (imunoglobulinas antirrábicas) e ativas (vacinas). Atualmente, as imunoglobulinas antirrábicas (RIG) são preparadas a partir do soro de sujeitos humanos (HRIG) ou equinos (ERIG). O uso de imunoglobulinas a partir dessas fontes apresenta várias dificuldades, no entanto, incluindo a transmissão da doença, custo, e no caso da imunoglobulina equina, reações adversas, tal como choque anafilático. Para superar estas desvantagens sugeriu-se usar anticorpos monoclonais capazes de neutralizar o vírus rábico na profilaxia pós-exposição.

[006] Anticorpos monoclonais murinos neutralizantes do vírus rábico são conhecidos na técnica (vide, Schumacher et al., 1989). No entanto, o uso de anticorpos murinos *in vivo* é limitado devido a problemas associados à administração de anticorpos murinos aos seres humanos, tais como meia-vida sérica curta, uma incapacidade para desencadear determinadas funções efetoras humanas e elicitação de uma resposta imune dramática indesejada contra o anticorpo murino em um ser humano (a reação de "anticorpo anticamundongo humano" (HAMA)). Atualmente, há uma necessidade de novos anticorpos monoclonais neutralizantes do vírus rábicos humanos tendo potencial profilático pós-exposição aprimorado. É vantajoso que anticorpos administrados em conjunto com vacinas antirrábicas não interferem na antigenicidade da vacina, assim, reduzindo sua eficácia.

SUMÁRIO

[007] A presente tecnologia se refere geralmente a anticorpos neutralizantes do vírus rábico que se ligam à glicoproteína do vírus rábico. Uma vantagem destes anticorpos é que eles têm a capacidade de reduzir a infectividade do vírus rábico, mas não interferem na eficácia de uma vacina

rábica. Anticorpos neutralizantes para raiva atualmente disponíveis inibem simultaneamente a eficácia da vacinação, quando eles neutralizam os vírus. Portanto, a dose dos anticorpos convencionais deve ser limitada, que por sua vez fornece apenas uma proteção mínima durante a primeira semana de infecção. Por outro lado, os anticorpos descritos neste documento superam esse problema por exibirem atividade neutralizante superior embora não interfiram na eficácia da vacinação. Assim, os anticorpos podem ser usados em combinação com uma vacina rábica para fornecer um tratamento para a infecção aguda, bem como imunidade de longa duração.

[008] Em um aspecto, a presente tecnologia fornece um anticorpo isolado que se liga à glicoproteína do vírus rábico em que o anticorpo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada selecionadas a partir de DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58), GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSMYD (SEQ ID NO:61), ou uma variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas; e o anticorpo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia leve selecionadas a partir do grupo consistindo em KASQNVGTTVA (SEQ ID NO: 62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVS RFS (SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), ou uma variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas.

[009] Em uma modalidade, o anticorpo compreende sequências de CDR de cadeia pesada: DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), e QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58) e compreende sequências de CDR de cadeia leve: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), e QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64). Em uma modalidade, o anticorpo

compreende sequências de CDR de cadeia pesada: GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSMY (SEQ ID NO:61) e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67).

[0010] Em um aspecto, a presente tecnologia fornece um anticorpo isolado que se liga à glicoproteína do vírus rábico, em que o anticorpo tem a mesma especificidade de ligação de antígeno como um anticorpo produzido por uma linhagem celular de hibridoma selecionada a partir do grupo consistindo em CGMCC N^{os}s de Acesso 4805 e 4806.

[0011] Em uma modalidade, o anticorpo é capaz de reduzir a infectividade do vírus rábico e não interfere na imunogenicidade de uma vacina rábica. Em uma modalidade, o anticorpo é selecionado a partir de um grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo murino, um anticorpo quimérico, e um anticorpo humanizado.

[0012] Em uma modalidade, a presente tecnologia fornece uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de RVNA ou um coquetel de um ou mais anticorpos de RVNA e um transportador farmaceuticamente aceitável. Em uma modalidade, a composição farmacêutica compreende um coquetel de anticorpos, em que um primeiro anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTS YNLKFKG (SEQ ID NO:57), e QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58) e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), e QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64); e em que um segundo anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSMY (SEQ ID NO:61) e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), e

FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67).

[0013] Em uma modalidade, a presente tecnologia fornece o uso de um anticorpo de RVNA descrito neste documento na fabricação de um medicamento para tratar a infecção rábica em um sujeito em necessidade do mesmo. Em uma modalidade, o anticorpo reduz a infectividade do vírus rábico, mas não interfere na imunogenicidade de uma vacina rábica.

[0014] Em uma modalidade, a presente tecnologia fornece um Método para tratar infecção rábica em um sujeito em necessidade do mesmo compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um ou mais anticorpos de RVNA descritos neste documento. Em uma modalidade, o anticorpo é administrado ao sujeito antes, depois, ou simultaneamente com a vacina rábica. Em uma modalidade, o anticorpo é administrado ao sujeito antes, depois, ou simultaneamente com uma imunoglobulina antirrábica.

[0015] Em um aspecto, a presente tecnologia fornece um kit para tratar infecção rábica em um sujeito em necessidade do mesmo compreendendo um ou mais anticorpos que se ligam à glicoproteína do vírus rábico e instruções de uso do anticorpo, em que: o anticorpo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada selecionadas a partir do grupo consistindo em DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTS NLKFKG (SEQ ID NO:57), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58), GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSM DY (SEQ ID NO:61), ou uma variante do mesmo tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas; e o anticorpo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia leve selecionadas a partir do grupo consistindo em KASQNVGTTVA (SEQ ID NO: 62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVSNRFS (SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), ou variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas.

[0016] Em um aspecto, a presente tecnologia fornece um kit para detectar vírus rábico em uma amostra compreendendo um anticorpo que se liga à glicoproteína do vírus rábico e instruções de uso do anticorpo, em que: o anticorpo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada selecionadas a partir do grupo consistindo em DYIML (SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:57), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:58), GFAMS (SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSMFY (SEQ ID NO:61), ou uma variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas; e o anticorpo compreende uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia leve selecionadas a partir do grupo consistindo em KASQNVGTTVA (SEQ ID NO: 62), SASYRYS (SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:64), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:65), LVS RFS (SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (SEQ ID NO:67), ou uma variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas. Em uma modalidade, o anticorpo é acoplado a um ou mais rótulos detectáveis. Em uma modalidade, o kit ainda compreende um anticorpo secundário que se liga especificamente ao anticorpo de glicoproteína do vírus rábico. Em uma modalidade, o anticorpo secundário é acoplado a um ou mais rótulos detectáveis.

[0017] Em outro aspecto, a presente tecnologia fornece um ácido nucleico isolado que codifica os anticorpos de RVNA descritos neste documento. Em ainda outro aspecto, a presente tecnologia fornece uma célula hospedeira compreendendo o ácido nucleico isolado que codifica os anticorpos de RVNA descritos neste documento.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

[0018] A figura 1 é um gráfico que mostra as curvas de ligação exemplares de cinco vírus rábicos ilustrativos que neutralizam os anticorpos (RVNAs) para a glicoproteína de RV.

[0019] A figura 2 é um Western Blot que mostra os cinco RVNAs que reconhecem o epítopo linear ou epítopo conformacional na glicoproteína do vírus rábico (RVGP). As pistas são como segue: pista 1: 50 µL, reduzindo RVGP com 7G11 A3; pista 2: 5 µL, reduzindo RVGP com 7G11 A3; pista 3: 5 H_L não-reduzindo RVGP com 7G11 A3; pista 4: 50 µL, reduzindo RVGP com 5A1C10; pista 5: 5 H_L reduzindo RVGP com 5A1C10; pista 6: 5 µL, não-reduzindo RVGP com 5A1C10; pista 7: 50 H_L reduzindo RVGP com 6F11C1; pista 8: 5 µL, reduzindo RVGP com 6F11C1 ; pista 9: 5 µL, não-reduzindo RVGP com 6F11C1 ; pista 10: 50 µL, reduzindo RVGP com 3H10D3; pista 11: 5 H_L reduzindo RVGP com 3H10D3; pista 12: 5 µL, não-reduzindo RVGP com 3H10D3; pista 13: 50 µL, reduzindo RVGP com 3D11E3; pista 14: 5 µL, reduzindo RVGP com 3D11E3; pista 15: 5 não-reduzindo RVGP com 3D11E3.

[0020] As figuras 3 A-4E são uma série de gráficos que mostra resultados exemplares de CLEIA indireta em que cinco RVNAs ilustrativos se ligam à glicoproteína do vírus rábico que foi tratada com diferentes detergentes. Figura 3A: Capacidade de ligação de 3D11E3 à glicoproteína de RV; Figura 3B: Capacidade de ligação de 3H10D3 à glicoproteína de RV; Figura 3C: Capacidade de ligação de 5A1C10 à glicoproteína de RV; Figura 3D: Capacidade de ligação de 6F11C1 à glicoproteína de RV; Figura 3E:

[0021] Capacidade de ligação de 7G11 A3 à glicoproteína de RV.

[0022] As figuras 4A-4J são uma série de gráficos que mostra a porcentagem de sobrevivência de camundongos desafiados com uma variedade de vírus rábicos em um teste de neutralização de camundongo (MNT). Figura 4A: YNI (humano); Figura 4B: DRV (veado); Figura 4C: HN35 (Humano); Figura 4D: SC-CD09 (cão); Figura 4E: GN07 (cão); Figura 4F: ZJ-HZ09 (cão); Figura 4G: BD06 (cão); Figura 4H: JX08-45 (texugo); Figura 4I: JX09-27 (texugo); Figura 4J: ZJ-LA (texugo).

[0023] As figuras 5A-50 são uma série de gráficos que retrata

resultados exemplares de um conjunto de experimentos de competição realizados usando um formato de CLEIA. RVNAs 3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 e 7G11 A3 competem entre si para se ligar à glicoproteína do vírus rábico (RVGP). Os cinco RVNAs ilustrativos foram permitidos se ligar à glicoproteína competindo com 3D11E3-HRP (figuras 5A-5C), 3H10D3-HRP (figuras 5D-5F), 5A1C10-HRP (figuras 5G-5I), 6F11C1-HRP (figuras 5J-5L) e 7G11A3-HRP (figuras 5M-5O).

[0024] As figuras 6A-6E são uma série de gráficos que mostra títulos de RVNA do soro em camundongos BALB/c não-desafiados. Os camundongos em cada grupo de tratamento ($n = 6$ por grupo) foram vacinados com vacina rábica e tratados no dia 0 com: Figura 6A: 50 µg/dose de 7G11 A3; Figura 6B: 50 µg/dose de 3D11E3; Figura 6C: 50 µg/dose de 3H10D3; ou Figura 6D: 20 IU/kg de globulina imune rábica humana (HRIG). Os camundongos no grupo de controle (Figura 6E) receberam apenas vacina Rabipur®. Nos dias 1, 3, 7, 14 e 28, o sangue foi coletado da órbita de camundongos e misturou-se o soro de 6 camundongos com 3 soros em cada grupo. O título de RVNA em cada amostra de soro foi determinado por um teste rápido de inibição de foco fluorescente, e títulos médios geométricos foram calculados e plotados contra o tempo. As linhas longas representam meios e as linhas curtas representam max e min, respectivamente.

[0025] A figura 7 é um gráfico que mostra as curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier para hamsters sírios ($n = 10$ por grupo) desafiados com o vírus rábico de rua de cão (BD06).

[0026] A figura 8 é uma representação esquemática do vetor de expressão pCH1A9.

[0027] A figura 9 é uma análise de SDS PAGE de anticorpos CT.RV 3D11E3 1A9 (pista 1), Ch1A9 (pista 2), Hu1A9-1 (pista 3) e Hu1A9-2 (pista 4). Padrão Invitrogen SeeBlue® Plus2 Prestained (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA; Cat # LC5925) foi usado como padrões de peso

molecular (pista 5).

[0028] A figura 10 é um gráfico de uma análise de ELISA que mostra a ligação de anticorpos Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2 para Vacina de Vírus Rábico Inativado (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha).

[0029] A figura 11 é uma representação esquemática do vetor de expressão pCh2G11.

[0030] A figura 12 é análise de SDS PAGE de anticorpos CT.RV 7G11 A3 1H5 (pista 2), Ch2G11 (pista 3), Hu2G11-1 (pista 4) e Hu2G11-2 (pista 5). As amostras (5 µg cada) foram executadas em um gel de SDS PAGE a 4-20% sob condições de redução. Padrão Invitrogen SeeBlue® Plus2 Prestained (Invitrogen, Grand Island, NY, EUA; Cat # LC5925) foi usado como padrões de peso molecular (pista 1). H e L denotam a posição de cadeias pesadas e leves, respectivamente.

[0031] A figura 13 é um gráfico de um ELISA competitivo que mostra a ligação de anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2 para Vacina de Vírus Rábico Inativado (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha). Uma placa de ELISA foi revestida com Rabipur®. A ligação do camundongo 7G11 A3 1H5 a Rabipur® foi examinada na presença de várias concentrações de Ch2G11, Hu2G11-1 ou Hu2G11-2. O camundongo 7G11A3 1H5 ligado foi detectado pelo anticorpo IgG anticamundongo de cabra conjugado com HRP, específico de cadeia de Fcy, absorvido por IgG humano, policlonal.

[0032] As figuras 14A e 14B são gráficos de uma análise de ELISA da ligação de anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2 para Vacina do Vírus Rábico Inativado (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha). As placas de ELISA foram revestidas com 2,5 µg/ml (figura 14A) ou 1,0 µg/ml (figura 14B) Ch2G11, Hu2G11-1 ou Hu2G11-2. Rabipur® capturado por anticorpos revestidos foi detectado por 3D10

conjugado com HRP.

[0033] As figuras 15A-15F são uma série de gráficos que mostra as curvas de ligação de RVNAs humanizados e quiméricos 2G11 à glicoproteína de RV, conforme determinado por CLEIA. Os 2G11 humanizado e quimérico foram usados como anticorpo de captura e detecção, respectivamente. A glicoproteína foi diluída em 1:50, 1: 100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1: 1600 e em seguida, adicionada na microplaca. 3D10-HRP de RV murino e IgG-HRP anti-humano de camundongo foram usados como conjugado de enzima. Unidade de luminescência relacionada (RLU) representa o sinal de quimioluminescência.

[0034] As figuras 16A-16J são uma série de curvas ligação dos RVNAs humanizados, quiméricos, e murinos 1A9 RVNAs à glicoproteína de RV como determinado por CLEIA. Os 1A9 humanizado e quimérico foram usados como anticorpo de captura e detecção, respectivamente. A glicoproteína foi diluída em 1:50, 1: 100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1: 1600 e em seguida, adicionada na microplaca. 3D10-HRP de RV murino e IgG-HRP anti-humano de camundongo foram usados como conjugado de enzima. Unidade de luminescência relacionada (RLU) representa o sinal de quimioluminescência.

[0035] As figuras 17A-17F são uma série de gráficos que mostra a porcentagem de sobrevivência de camundongos BALB/C em experimentos de MNT. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier são mostradas para os dias 0 a 21.

[0036] As figuras 18A-18B são uma série de gráficos que mostra a sobrevivência de hamsters sírios ($n = 5$ por grupo) que foram desafiados com RV de rua de cão (BD06) no dia 1. Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier são mostradas para os dias 0 a 28.

[0037] A figura 19 é uma série de gráficos que mostra títulos de RVNA de soro em camundongos BALB/c não desafiados. Os camundongos

em cada grupo de tratamento ($n = 8$ por grupo) foram vacinados com vacina rábica e tratados com (1) 5000 IU/kg de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2, (2) 1000 IU/kg de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2, (3) 200 IU/kg de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2, ou (4) 20 IU/kg de globulina imune rábica humana (HRIG) no dia 0, os camundongos no grupo de controle (5) receberam apenas vacina, e os camundongos que receberam apenas PBS eram o controle negativo (6).

[0038] A figura 20 é um gráfico que mostra uma comparação entre um coquetel de RVNA e HRIG com vacina em hamsters sírios.

DESCRIÇÃO DETALHADA

[0039] Os detalhes de uma ou mais modalidades da presente tecnologia são estabelecidos na descrição acompanhante abaixo. Na prática dos presentes métodos, muitas técnicas convencionais em biologia molecular, bioquímica de proteína, biologia celular, imunologia, microbiologia e DNA recombinante são usadas. Estas técnicas são bem-conhecidas e são explicadas em, por exemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. I-III, Ausubel, Ed. (1997); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Ed. (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989); *DNA Cloning: A Practical Approach*, Vols. I and II, Glover, Ed. (1985); *Oligonucleotide Synthesis*, Gait, Ed. (1984); *Nucleic Acid Hybridization*, Hames & Higgins, Eds. (1985); *Transcription and Translation*, Hames & Higgins, Eds. (1984); *Animal Cell Culture*, Freshney, Ed. (1986); *Immobilized Cells and Enzymes* (IRL Press, 1986); Perbal, *A Practical Guide to Molecular Cloning*; the series, *Meth. Enzymol.*, (Academic Press, Inc., 1984); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells*, Miller & Calos, Eds. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987); e *Meth. Enzymol.*, Vols. 154 and 155, Wu & Grossman, e Wu, Eds., respectivamente. Métodos para detectar e medir níveis de produtos de expressão de gene de polipeptídeo (isto é, nível de tradução de gene) são bem-conhecidos na técnica e incluem o

uso de métodos de detecção de polipeptídeo tais como técnicas de detecção e quantificação de anticorpo. (Vide também, Strachan & Read, *Human Molecular Genetics*, Second Edition. (John Wiley and Sons, Inc., NY, 1999)).

[0040] A menos que definido de outra forma, todos os termos técnicos e científicos usados neste documento geralmente têm o mesmo significado como comumente entendido por uma pessoa versada na técnica à qual pertence esta tecnologia. Como usado neste relatório descritivo e nas reivindicações acrescentadas, as formas singulares "um", "uma" e "o/a" incluem referentes plurais a menos que o conteúdo dite claramente o contrário. Por exemplo, a referência a "uma célula" inclui uma combinação de duas ou mais células, e similares. Geralmente, a nomenclatura usada neste documento e os procedimentos laboratoriais em cultura celular, genética molecular, química orgânica, química analítica e química de ácido nucleico e hibridização descritos abaixo são aqueles bem-conhecidos e comumente empregados na técnica. As definições de alguns termos como usados neste relatório descritivo são fornecidas abaixo. As definições de outros termos podem ser encontradas no *Illustrated Dictionary of Immunology*, 2nd Edition (Cruse, J.M. and Lewis, R.E., Eds., Boca Raton, FL: CRC Press, 1995).

[0041] Como usado neste documento, a "administração" de um agente ou droga a um sujeito ou indivíduo inclui qualquer via de introdução ou distribuição a um sujeito de um composto para executar sua função pretendida. A administração pode ser realizada por qualquer via adequada, incluindo por via oral, por via intranasal, por via parenteral (por via intravenosa, por via intramuscular, por via intraperitoneal, ou por via subcutânea), por via retal, por via intracraniana, por via intratecal, ou por via tópica. A administração inclui a autoadministração e a administração por outra pessoa.

[0042] Como usado neste documento, o termo "aminoácido" inclui aminoácidos de ocorrência natural e aminoácidos sintéticos, bem como

análogos de aminoácidos e miméticos de aminoácidos que funcionam de forma similar aos aminoácidos de ocorrência natural. Os aminoácidos de ocorrência natural são aqueles codificados pelo código genético, bem como aqueles aminoácidos que são posteriormente modificados, por exemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, e O-fosfoserina. Análogos de aminoácido se referem a compostos que têm a mesma estrutura química básica como um aminoácido de ocorrência natural, isto é, um α -carbono que está ligado a um hidrogênio, um grupo carboxil, um grupo amino, e um grupo R, por exemplo, homoserina, norleucina, sulfóxido de metionina, metionina metil sulfônio. Tais análogos têm grupos R modificados (por exemplo, norleucina) ou estruturas principais de peptídeo modificadas, mas mantêm a mesma estrutura química básica como um aminoácido de ocorrência natural. Miméticos de aminoácido se referem a compostos químicos que têm uma estrutura que é diferente da estrutura química geral de um aminoácido, mas que funciona de forma similar ao aminoácido de ocorrência natural. Os aminoácidos podem ser referidos neste documento por seus símbolos de três letras comumente conhecidos ou pelos símbolos de uma letra recomendados pela Comissão de Nomenclatura Bioquímica IUPAC-IUB. Nucleotídeos, da mesma forma, podem ser referidos por seus códigos de uma letra geralmente aceitos.

[0043] Como usado neste documento, o termo "anticorpo" significa um polipeptídeo compreendendo uma região *framework* de um gene de imunoglobulina ou fragmentos do mesmo que se liga ou reconhece especificamente um antígeno, por exemplo, uma glicoproteína rábica. O uso do termo anticorpo deve incluir anticorpos inteiros, incluindo anticorpos inteiros de cadeia única, e fragmentos de ligação ao antígeno dos mesmos. O termo "anticorpo" inclui anticorpos biespecíficos e anticorpos multiespecíficos enquanto eles exibem a atividade ou função biológica desejada. O termo anticorpo também se refere aos fragmentos de anticorpo de

ligação ao antígeno, incluindo anticorpos de cadeia única, que podem compreender a(s) região(ões) variável(eis) sozinha(s), ou em combinação, com todos ou parte dos seguintes elementos de polipeptídeo: região de dobradiça, domínios CH₁, CH₂, e CH₃ de uma molécula de anticorpo. São também incluídas na tecnologia quaisquer combinações de região(ões) variável(eis) e região de dobradiça, domínios CH₁, CH₂, e CH₃. Moléculas relacionadas ao anticorpo úteis nos presentes métodos, por exemplo, mas não limitadas a, Fab, Fab' e F(ab')₂, Fd, Fvs de cadeia única (scFv), anticorpos de cadeia única, Fvs ligados ao dissulfeto (sdFv) e fragmentos compreendendo um domínio V_L ou V_H. Os exemplos incluem: (i) um fragmento Fab, um fragmento monovalente consistindo nos domínios V_L, V_H, C_L e CH₁; (ii) um fragmento F(ab')₂, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos Fab ligados pela ponte de dissulfeto na região de dobradiça; (iii) um fragmento Fd consistindo nos domínios V_H e CH₁; (iv) um fragmento Fv consistindo nos domínios V_L e V_H de um braço único de um anticorpo, (v) um fragmento dAb (Ward *et al.*, Nature 341: 544-546, 1989), que consiste em um domínio de V_H; e (vi) uma região determinante de complementaridade isolada (CDR). Como tais, "fragmentos de anticorpo" podem compreender uma porção de um anticorpo de comprimento total, geralmente a região variável ou de ligação ao antígeno do mesmo. Exemplos de fragmentos de anticorpo incluem fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, e Fv; diacorpos; anticorpos lineares; moléculas de anticorpo de cadeia única; e anticorpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticorpo. Moléculas de anticorpo de cadeia única podem compreender um polímero com um número de moléculas individuais, por exemplo, dímero, trímero ou outros polímeros.

[0044] Como usado neste documento, o termo "anticorpo quimérico" significa um anticorpo em que a região Fc constante de um anticorpo monoclonal de uma espécie (por exemplo, uma região Fc constante de camundongo) é substituída, usando técnicas de DNA recombinante, com uma

região Fc constante de um anticorpo de outra espécie (por exemplo, uma região Fc constante humana).

[0045] Como usado neste documento, o termo "epítopo" significa um determinante de proteína capaz de fazer ligação específica com um anticorpo. Os epítopos geralmente consistem em agrupamentos de superfície quimicamente ativos de moléculas tais como aminoácidos ou cadeias laterais de açúcar e geralmente têm características estruturais tridimensionais específicas, bem como características de carga específicas. Epítopos conformacionais e não conformacionais distinguem-se em que a ligação ao anterior, mas não ao último está perdida na presença de solventes de desnaturação. Em uma modalidade, um "epítopo" da glicoproteína do vírus da raiva é uma região da proteína à qual os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia se ligam especificamente.

[0046] Como usado neste documento, o termo "quantidade eficaz" ou "quantidade farmaceuticamente eficaz" ou "quantidade terapeuticamente eficaz" de uma composição, é uma quantidade suficiente para atingir um efeito profilático e/ou terapêutico desejado, por exemplo, uma quantidade que resulta na prevenção de, ou uma diminuição dos sintomas associados à doença que está sendo tratada, por exemplo, infecção rábica. A quantidade de uma composição da presente tecnologia administrada ao sujeito dependerá do tipo e da gravidade da doença e das características do indivíduo, tais como saúde geral, idade, sexo, peso corporal e tolerância às drogas. Também dependerá do grau, gravidade e tipo de doença. O versado na técnica será capaz de determinar as dosagens apropriadas dependendo destes e de outros fatores. As composições da presente tecnologia também podem ser administradas em combinação com um ou mais compostos terapêuticos adicionais. Por exemplo, as composições da presente tecnologia podem ser incorporadas na profilaxia pós-exposição para indivíduos expostos ao vírus rábico, e administradas em combinação com produtos antiterapêuticos conhecidos na

técnica tais como vacinas antirrábicas. Os anticorpos da presente tecnologia são adequados para a administração em combinação com vacinas ráticas incluindo, mas não limitadas a, vacina celular de embrião de pinto purificada (PCECV; RabAvert®, Novartis, Basel, Switzerland; Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha), vacina celular diploide humana (HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, EUA), vacina rática adsorvida (RVA), e globulina imune rática humana (HRIG). Em algumas modalidades, "quantidade eficaz" se refere à quantidade de antícorpo antirrábico da presente tecnologia que é parcialmente ou totalmente eficaz em neutralizar o vírus rático.

[0047] Como usado neste documento, o termo "raiva" se refere ao vírus do gênero *Lyssavirus*, da família *Rhabdoviridae*, ordem *Mononegavirales*. *Lyssaviruses* têm simetria helicoidal, com um comprimento de cerca de 180 nm e um diâmetro em corte transversal de cerca de 75 nm. Estes vírus são envelopados e têm um genoma de RNA de fita única com *sense* negativo. A informação genética é empacotada como um complexo de ribonucleoproteína no qual o RNA é rigidamente ligado pela nucleoproteína viral. O genoma de RNA do vírus codifica cinco genes cuja ordem é altamente conservada: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína da matriz (M), glicoproteína (G) e o RNA polimerase viral (L).

[0048] Como usado neste documento, o termo formas "humanizadas" de anticorpos não-humanos (por exemplo, murinos) são anticorpos quiméricos que contêm sequência mínima derivada da imunoglobulina não-humana. Na maior parte, os anticorpos humanizados são imunoglobulinas humanas em que os resíduos de região hipervariável do receptor são substituídos pelos resíduos de região hipervariável de uma espécie não-humana (anticorpo doador) tal como camundongo, rato, coelho ou primata não-humano, tendo a especificidade, afinidade, e capacidade desejadas. Em alguns casos, resíduos de região *framework* (FR) de Fv da imunoglobulina

humana são substituídos por resíduos não-humanos correspondentes. Além disso, os anticorpos humanizados podem compreender resíduos que não são encontrados no anticorpo do receptor ou no anticorpo do doador. Estas modificações são feitas para ainda refinar o desempenho do anticorpo tal como afinidade de ligação. Geralmente, o anticorpo humanizado compreenderá substancialmente todos de pelo menos um, e normalmente dois, domínios variáveis, em que todos ou substancialmente todos os loops hipervariáveis correspondem àqueles de uma imunoglobulina não-humana e todas ou substancialmente todas as regiões FR são aquelas de uma sequência de imunoglobulina humana, embora as regiões FR possam incluir uma ou mais substituições de aminoácidos que aprimoram a afinidade de ligação. O número dessas substituições de aminoácidos na FR é normalmente não mais do que 6 na cadeia H, e na cadeia L, não mais do que 3. O anticorpo humanizado opcionalmente também compreenderá pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina (Fc), normalmente a de uma imunoglobulina humana. Para mais detalhes, vide Jones et al., Nature 321 :522-525 (1986); Reichmann et al., Nature 332:323-329 (1988); and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

[0049] Como usado neste documento, o termo "região hipervariável" se refere a resíduos de aminoácidos de um anticorpo que são responsáveis pela ligação ao antígeno. A região hipervariável geralmente compreende resíduos de aminoácido de uma "região determinante de complementaridade" ou "CDR" (por exemplo, ao redor dos resíduos 24-34 (L1), 50-56 (L2) e 89-97 (L3) na V_L, e ao redor de 31-35B (H1), 50-65 (H2) e 95-102 (H3) na V_H (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) e/ou aqueles resíduos de um "*loop* hipervariável" (por exemplo, resíduos 26-32 (L1), 50-52 (L2) e 91-96 (L3) na V_L, e 26-32 (H1), 52A-55 (H2) e 96-101 (H3) na V_H (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)).

[0050] Como usado neste documento, os termos "idêntico" ou porcentagem de "identidade", quando usados no contexto de duas ou mais sequências de ácidos nucleicos ou polipeptídeos, se referem a duas ou mais sequências ou subsequências que são iguais ou têm uma determinada porcentagem de resíduos de aminoácidos ou nucleotídeos que são iguais (isto é, cerca de 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, ou identidade mais alta ao longo de uma região especificada (por exemplo, sequência de nucleotídeo que codifica um anticorpo descrito neste documento ou sequência de aminoácidos de um anticorpo descrito neste documento), quando comparada e alinhada para a máxima correspondência sobre uma janela de comparação ou região designada) conforme medido usando algoritmos de comparação de sequência BLAST ou BLAST 2.0 com parâmetros padrão descritos abaixo, ou por alinhamento manual e visual vide, por exemplo, site de NCBI). Tais sequências são então referidas como sendo "substancialmente idênticas". Este termo também se refere a, ou pode ser aplicado, ao complemento de uma sequência de teste. O termo também inclui sequências que têm deleções e/ou adições, bem como aquelas que têm substituições. Conforme descrito abaixo, os algoritmos podem contabilizar lacunas e similares. Em algumas modalidades, identidade existe sobre uma região que tem pelo menos de cerca de 25 aminoácidos ou nucleotídeos de comprimento, ou 50 a 100 aminoácidos ou nucleotídeos de comprimento.

[0051] Um polipeptídeo "isolado" ou "purificado" ou porção biologicamente ativa do mesmo é substancialmente livre de material celular ou outros polipeptídeos contaminantes da fonte de célula ou tecido a partir da qual o polipeptídeo é derivado, ou substancialmente livre de precursores químicos ou outros produtos químicos quando quimicamente sintetizados. Por exemplo, um anticorpo antirrábico isolado seria livre de materiais que interferia no diagnóstico ou usos terapêuticos do agente. Tais materiais

interferentes podem incluir enzimas, hormônios e outros solutos proteináceos e não proteináceos. Alternativamente, uma glicoproteína rábica isolada, que é imunorreativa com um anticorpo antirrábico da presente tecnologia, seria substancialmente livre de materiais que interferiria no diagnóstico ou usos terapêuticos do polipeptídeo.

[0052] Como usado neste documento, os termos "imunologicamente de reatividade cruzada" e "imunologicamente reativo" são usados de forma intercambiável para significar um antígeno que é especificamente reativo com um anticorpo que foi gerado usando o mesmo antígeno ("imunologicamente reativo") ou diferente ("imunologicamente de reatividade cruzada"). Geralmente, o antígeno é uma glicoproteína rábica, uma variante ou subsequência do mesmo.

[0053] Como usado neste documento, o termo "condições imunologicamente reativas" significa condições que permitem que um anticorpo, gerado para um epítopo específico de um antígeno, se ligue ao epítopo a um grau detectavelmente maior do que o anticorpo se liga a substancialmente todos os outros epítópos, geralmente pelo menos duas vezes acima da ligação anterior, ou pelo menos cinco vezes acima da anterior. Condições imunologicamente reativas são dependentes do formato da reação de ligação ao anticorpo e normalmente são aquelas utilizadas em protocolos de imunoensaio. Vide Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988) para uma descrição de formatos e condições de imunoensaio.

[0054] Como usado neste documento, o termo "condição médica" inclui, mas não está limitado a, qualquer condição ou doença manifestada como um ou mais sintomas psicológicos aos quais tratamento e/ou prevenção são desejáveis, e inclui doenças e outros distúrbios previamente e recentemente identificados. Por exemplo, uma condição médica pode ser uma infecção rábica.

[0055] O termo "anticorpo monoclonal" como usado neste documento se refere a um anticorpo obtido a partir de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos exceto para mutações de ocorrência natural possíveis que podem estar presentes em quantidades menores. Por exemplo, um anticorpo monoclonal pode ser um anticorpo que é derivado de um único clone, incluindo quaisquer eucariontes, procariontes, ou clone do fago, e não o método pelo qual este é produzido. Uma composição de anticorpo monoclonal exibe uma especificidade de ligação única e afinidade com um epítopo específico. Os anticorpos monoclonais são altamente específicos, sendo direcionados contra um único sítio antigênico. Além disso, em contraste com preparações de anticorpos (policlonais) convencionais que normalmente incluem diferentes anticorpos direcionados contra diferentes determinantes (epítulos), cada anticorpo monoclonal é direcionado contra um único determinante no antígeno. O modificador "monoclonal" indica o caráter do anticorpo como sendo obtido de uma população substancialmente homogênea de anticorpos, e não deve ser interpretado como exigindo a produção do anticorpo por qualquer método específico. Os anticorpos monoclonais podem ser preparados usando uma grande variedade de técnicas conhecidas na técnica incluindo, por exemplo, mas não limitadas a, tecnologias de hibridoma, recombinantes, e exibição de fago. Por exemplo, os anticorpos monoclonais a serem usados de acordo com os presentes métodos podem ser feitos pelo método de hibridoma primeiro descrito por Kohler *et al.*, Nature 256:495 (1975), ou podem ser feitos por métodos de DNA recombinante (vide, por exemplo, Patente U.S. Nº 4.816.567). Os "anticorpos monoclonais" podem também ser isolados de bibliotecas de anticorpo de fago usando as técnicas descritas em Clackson *et al.*, Nature 352:624-628 (1991) e Marks *et al*, J. Mol Biol. 222:581-597 (1991), por exemplo.

[0056] Como usado neste documento, o termo "anticorpo policlonal" significa uma preparação de anticorpos derivados de pelo menos duas (2) linhagens celulares produtoras de anticorpo diferentes. O uso deste termo inclui preparações de pelo menos dois (2) anticorpos que contêm anticorpos que se ligam especificamente a diferentes epítopos ou regiões de um antígeno.

[0057] Como usado neste documento, os termos "polipeptídeo", "peptídeo" e "proteína" são usados de forma intercambiável neste documento para significar um polímero compreendendo dois ou mais aminoácidos juntos uns aos outros por ligações de peptídeo ou ligações de peptídeo modificado, isto é, isosteres de peptídeo. O polipeptídeo se refere a ambas as cadeias curtas, comumente referidas como peptídeos, glicopeptídeos ou oligômeros, e a cadeias mais longas, geralmente referidas como proteínas. Os polipeptídeos podem conter aminoácidos além dos 20 aminoácidos codificados por gene. Os polipeptídeos incluem sequências de aminoácidos modificadas por processos naturais, tal como processamento pós-traducional, ou por técnicas de modificação química que são conhecidas na técnica. Tais modificações são bem descritas em textos básicos e em monografias mais detalhadas, bem como em uma literatura de pesquisa volumosa. Em uma modalidade específica, o polipeptídeo contém sequências de polipeptídeo a partir de uma proteína de anticorpo rábico.

[0058] Como usado neste documento, "profilaxia pós-exposição" ou "PEP" se refere a um regime de tratamento que é indicado para pessoas possivelmente expostas a um animal raivoso. Exposições possíveis incluem exposição à mordida (isto é, qualquer penetração da pele pelos dentes) incluindo mordidas de animais, e exposição à não-mordida. PEP normalmente comprehende a administração de anticorpos antirrábicos em conjunto com uma vacina rábica, tal como vacina de célula de embrião de pinto purificada (PCEC) (Rab Avert®, Novartis, Basel, Switzerland; Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha), vacina de célula diploide humana

(HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, USA), vacina rábica adsorvida (RVA). PEP frequentemente inclui a administração de globulina imune rábica humana (HRIG), uma globulina gama antirrábica concentrada a partir do plasma de doadores humanos hiperimunizados. HRIG é um agente imunizante normalmente administrado a uma exposição posterior individual ao vírus rábico.

[0059] Como usado neste documento, o termo "recombinante" quando usado com referência, por exemplo, a uma célula, ou ácido nucleico, proteína, ou vetor, indica que a célula, ácido nucleico, proteína ou vetor, foi modificado pela introdução de um ácido nucleico ou proteína heteróloga ou a alteração de um ácido nucleico ou proteína nativa, ou que o material é derivado de uma célula assim modificada. Assim, por exemplo, células recombinantes expressam genes que não são encontrados dentro da forma nativa (não-recombinante) da célula ou expressam genes nativos que são de outra forma anormalmente expressos, subexpressos ou não expressos de modo algum.

[0060] Como usado neste documento, o termo "ligação específica" significa o contato entre um anticorpo antirrábico e um antígeno com uma afinidade de ligação de pelo menos 10^{-6} M. Em algumas modalidades, os anticorpos se ligam especificamente com afinidades de pelo menos cerca de 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, ou 10^{-12} M.

[0061] Como usado neste documento, o termo "sujeito" se refere a um ser humano ou animal não-humano, por exemplo, animais domésticos (por exemplo, cães, gatos e similares), animais de fazenda (por exemplo, vacas, ovelhas, porcos, cavalos e similares), animais selvagens, (morcegos, guaxinins, raposas, gambás, esquilos, esquilos agrícolas, camundongos, coelhos, e similares) e animais de laboratório (por exemplo, macacos, ratos, camundongos, coelhos, cobaias e similares).

[0062] Como usado neste documento, o termo "substituição" é uma

das mutações que é geralmente usada na técnica. Essas variantes de substituição têm pelo menos um resíduo de aminoácido na molécula de anticorpo antirrábico substituída por um resíduo diferente. Os sítios de maior interesse para a mutagênese de substituição incluem as regiões hipervariáveis, mas alterações de FR também são contempladas. As substituições podem ser conservativas, isto é, um aminoácido é substituído por um de formato e carga similares. Substituições conservativas são bem-conhecidas na técnica e incluem, por exemplo, as alterações de: alanina para serina; arginina para lisina; asparagina para glutamina ou histidina; aspartato para glutamato; cisteína para serina; glutamina para asparagina; glutamato para aspartato; glicina para prolina; histidina para asparagina ou glutamina; isoleucina para leucina ou valina; leucina para valina ou isoleucina; lisina para arginina; metionina para leucina ou isoleucina; fenilalanina para tirosina, leucina ou metionina; serina para treonina; treonina para serina; triptofano para tirosina; tirosina para triptofano ou fenilalanina; e valina para isoleucina ou leucina. Alternativamente, substituições podem ser não-conservativas, de modo que uma função ou atividade do polipeptídeo seja afetada. Alterações não-conservativas normalmente envolvem a substituição de um resíduo por um que é quimicamente diferente, tal como um aminoácido polar ou carregado para um aminoácido não-polar ou não-carregado, e vice versa.

[0063] Como usado neste documento, os termos "tratar" ou "tratamento" ou "alívio" se referem ao tratamento terapêutico e medidas profiláticas ou preventivas, em que o objetivo é prevenir ou retardar (diminuir) a condição ou distúrbio patológico alvo. Um sujeito é "tratado" com sucesso de raiva ou um distúrbio relacionado à raiva se, após receber uma quantidade terapêutica do vírus rábico neutralizando anticorpos de acordo com os métodos da presente tecnologia, o sujeito mostrar redução observável e/ou mensurável em, ou ausência de, um ou mais sinais e sintomas da infecção/condição rábica. Além disso, deve ser apreciado que os vários

modos de tratamento ou prevenção de condições médicas conforme descrito são destinados a significar "substanciais", que incluem total, mas também menos do que o tratamento ou prevenção total, e em que algum resultado biologicamente ou medicinalmente relevante é atingido.

I. Composições da Presente Tecnologia

[0064] A presente divulgação geralmente fornece anticorpos antirrábicos, que podem se ligar à glicoproteína rábica e neutralizar a infectividade do vírus rábico. Os anticorpos são úteis para tratar ou prevenir infecção rábica de sujeitos humanos e não-humanos expostos ao vírus rábico. Nesse sentido, os diversos aspectos dos presentes métodos se referem à preparação, caracterização, e manipulação de anticorpos antirrábicos. Os anticorpos da presente tecnologia são úteis sozinhos ou em combinação com terapias ráticas conhecidas na técnica para tratar ou prevenir infecção rábica. A presente divulgação ainda se refere a métodos para administrar anticorpos antirrábicos da presente tecnologia a um sujeito em necessidade dos mesmos.

[0065] A presente divulgação engloba anticorpos antirrábicos que se ligam à glicoproteína do vírus rábico. Em modalidades selecionadas, os anticorpos compreendem os anticorpos resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Anticorpos Antirrábicos

Anticorpo	Tipo	Descrição
3D11E3	Anticorpo Monoclonal Murino	Liga-se ao epítopo II da glicoproteína rábica
3H10D3	Anticorpo Monoclonal Murino	Liga-se ao epítopo III da glicoproteína rábica
5A1C10	Anticorpo Monoclonal Murino	Liga-se ao epítopo IV da glicoproteína rábica
6F11C1	Anticorpo Monoclonal Murino	Liga-se ao epítopo I da glicoproteína rábica
7G11A3	Anticorpo Monoclonal Murino	Liga-se ao epítopo I da glicoproteína rábica

[0066] Depósitos de materiais biológicos da presente tecnologia foram feitos com o Centro de Coleta de Cultura Microbiológica Geral da China (*China General Microbiological Culture Collection Center CGMCC*), Comitê da China para Coleta de Cultura de Micro-organismos, P.O. Box 2714, Beijing 100080, República Popular da China como detalhado na tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Depósitos Biológicos			
Nome do Depósito	Materiais	Data	Número de Acesso
RV3D11E31A9	Hibridoma de camundongo-camundongo	12 de maio de 2011	CGMCC 4805
RV7G11A32G11	Hibridoma de camundongo-camundongo	12 de maio de 2011	CGMCC 4806
RV5A1C103C4	Hibridoma de camundongo-camundongo	10 de novembro de 2011	CGMCC 5471

[0067] A presente tecnologia inclui anticorpos que se ligam especificamente a epítopos que são epítopos conformacionais, bem como epítopos não conformacionais ou lineares. Como observado acima, epítopos conformacionais e epítopos não conformacionais distinguem-se em que a ligação ao anterior, mas não ao último, está perdida na presença de solventes de desnaturação.

[0068] Anticorpos antirrábicos dentro do escopo da presente tecnologia incluem, por exemplo, mas não estão limitados a, diacorpo monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado, e anticorpos monoclonais humanos e policlonais humanos que se ligam especificamente à glicoproteína rábica, um homólogo, derivado ou um fragmento do mesmo. Anticorpos úteis para os métodos divulgados neste documento incluem, por exemplo, mas não estão limitados a, IgG (incluindo IgG₁, IgG₂, IgG₃, e IgG₄), IgA (incluindo IgA₁ e IgA₂), IgD, IgE, ou IgM, e IgY.

[0069] Em uma modalidade, os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia se ligam especificamente à glicoproteína rábica. Em uma modalidade, os anticorpos são capazes de reduzir a infectividade do vírus rábico e não reduzem a imunogenicidade de uma vacina rábica. Nas modalidades selecionadas, os anticorpos são anticorpos monoclonais, anticorpos murinos, anticorpos quiméricos, ou anticorpos humanizados.

[0070] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente tecnologia compreendem uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia pesada selecionadas a partir do grupo consistindo em DYIML (SEQ ID NO:57), DIYPYYGSTSYNLKFKG (SEQ ID NO:58), QGGDGNYVLFDY (SEQ ID NO:59), GFAMS (SEQ ID NO:60), TISSGGTYTYSPDSVMG

(SEQ ID NO:61), RLRRNYYYSMDY (SEQ ID NO: 62), ou uma variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas. Em algumas modalidades, os anticorpos da presente tecnologia compreendem uma ou mais sequências de aminoácidos de CDR de cadeia leve selecionadas a partir do grupo consistindo em KASQNVGTTVA (SEQ ID NO:63), SASYRYS (SEQ ID NO:64), QQYNSYPFT (SEQ ID NO:65), KSTKSLLNSDGFTYLD (SEQ ID NO:66), LVSNRFS (SEQ ID NO:67), FQSNYLPFT (SEQ ID NO:68), ou uma variante das mesmas tendo uma ou mais substituições de aminoácidos conservativas.

[0071] Em algumas modalidades, a presente tecnologia compreende um ácido nucleico que codifica um vírus rábico neutralizando o anticorpo ou fragmento do mesmo. Em algumas modalidades, a tecnologia engloba uma célula hospedeira ou ácido nucleico englobando o ácido nucleico isolado codificando o anticorpo.

[0072] A presente tecnologia ainda inclui anticorpos que são anti-idiotípicos para os anticorpos da presente tecnologia. Os anticorpos da presente tecnologia podem ser monoespecíficos, biespecíficos, triespecíficos ou de multiespecificidade maior. Os anticorpos multiespecíficos podem ser específicos para diferentes epítopos da glicoproteína rábica ou podem ser específicos tanto para a glicoproteína rábica quanto para composições heterólogas, tal como um polipeptídeo heterólogo ou material de suporte sólido. Vide, por exemplo, WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al, J. Immunol. 147: 60-69 (1991); Pat. U.S. N°s 5.573.920, 4.474.893, 5.601.819, 4.714.681, 4.925.648; 6.106.835; Kostelny et al, J. Immunol. 148: 1547-1553 (1992). Os anticorpos podem ser de qualquer origem animal, incluindo pássaros e mamíferos. Em algumas modalidades, os anticorpos são humanos, murinos, de coelho, cabra, cobaia, camelo, cavalo, ou galinha. Em algumas modalidades, os anticorpos são quiméricos. Em algumas modalidades, os anticorpos são humanizados.

[0073] Os anticorpos da presente tecnologia podem ser usados sozinhos ou em combinação com outras composições. Por exemplo, anticorpos neutralizantes do vírus rábico podem ser usados em combinação com uma ou mais terapias antirrábicas conhecidas na técnica, como aqueles discutidos acima. Os anticorpos da presente tecnologia que podem ser administrados ao sujeito em necessidade dos mesmos antes de, após a, ou simultaneamente à administração de uma ou mais terapias ráticas adicionais, tal como uma vacina rábica, são incluídos.

[0074] Os anticorpos da presente tecnologia ainda podem ser fundidos de forma recombinante com um polipeptídeo heterólogo no terminal N ou C ou quimicamente conjugados (incluindo conjugações de forma covalente e não covalente) com polipeptídeos ou outras composições. Por exemplo, os anticorpos podem ser fundidos ou conjugados de forma recombinante com moléculas úteis como rótulos em ensaios de detecção e moléculas efetoras tais como polipeptídeos heterólogos, drogas, ou toxinas. Vide, por exemplo, WO 92/08495; WO 91/14438; WO 89/12624; Pat. U.S. Nº 5.314.995; e EP 0 396 387.

A. Métodos de Preparação de Anticorpos Antirrábicos da Presente Tecnologia

[0075] A preparação de anticorpos antirrábicos específicos para glicoproteína do vírus rábico é ilustrada no Exemplo 1, *infra*. Deve ser entendido que não só os anticorpos de ocorrência natural são adequados para o uso em conformidade com a presente divulgação, anticorpos engenheirados de forma recombinante e fragmentos de anticorpo, por exemplo, polipeptídeos relacionados ao anticorpo, que são direcionados à glicoproteína rábica e fragmentos dos mesmos são também adequados. Anticorpos antirrábicos que podem ser submetidos a técnicas estabelecidas neste documento incluem anticorpos monoclonais, e fragmentos de anticorpo tais como Fab, Fab', F(ab')₂, Fd, scFv, diacorpos, cadeias leves de anticorpo, cadeias pesadas de

anticorpo e/ou fragmentos de anticorpo. Métodos úteis para a produção de alto rendimento de polipeptídeos contendo anticorpo Fv, por exemplo, fragmentos de anticorpo Fab' e F(ab')₂ foram descritos. Vide Pat. U.S. Nº 5.648.237.

[0076] Anticorpo Monoclonal. Em uma modalidade da presente tecnologia, o anticorpo é um anticorpo monoclonal antirrábico. Por exemplo, em algumas modalidades, o anticorpo monoclonal antirrábico pode ser um anticorpo monoclonal antirrábico de ser humano ou um de camundongo. Para a preparação de anticorpos monoclonais direcionada a uma glicoproteína rábica específica, ou derivados, fragmentos, análogos ou homólogos dos mesmos, qualquer técnica que forneça a produção de moléculas de anticorpo pela cultura de linhagem celular contínua pode ser utilizada. Tais técnicas incluem, mas não estão limitadas a, técnica de hibridoma (Vide, por exemplo, Kohler & Milstein, 1975. *Nature* 256: 495-497); a técnica de trioma; a técnica de hibridoma de células B humanas (Vide, por exemplo, Kozbor, et al, 1983. *Immunol. Today* 4: 72) e a técnica de hibridoma de EBV para produzir anticorpos monoclonais humanos (Vide, por exemplo, Cole, et al, 1985. In: **MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY**, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Anticorpos monoclonais humanos podem ser utilizados na prática da presente tecnologia e podem ser produzidos usando hibridomas humanos (Vide, por exemplo, Cote, et al, 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) ou transformando células B humanas com o vírus de Epstein Barr *in vitro* (Vide, por exemplo, Cole, et al, 1985. In: **MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY**, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Por exemplo, uma população de ácidos nucleicos que codificam as regiões de anticorpos pode ser isolada. PCR que utiliza iniciadores derivados das sequências que codifica, regiões conservadas de anticorpos é usada para amplificar sequências que codificam porções de anticorpos da população e em seguida reconstruir DNAs que codificam anticorpos ou fragmentos dos

mesmos, tais como domínios variáveis, das sequências amplificadas. Tais sequências amplificadas também podem ser fundidas com DNAs que codificam outras proteínas, por exemplo, um revestimento bacteriófago, ou uma proteína de superfície celular bacteriana - para a expressão e a exibição dos polipeptídeos de fusão no fago ou bactérias. Sequências amplificadas podem então ser expressas e ainda selecionadas ou isoladas com base, por exemplo, na afinidade do anticorpo expresso ou fragmento do mesmo durante um antígeno ou epítopo presente na glicoproteína rábica. Alternativamente, os hibridomas que expressam anticorpos monoclonais antirrábicos podem ser preparados imunizando um sujeito e então isolando hibridomas do baço do sujeito usando métodos de rotina. Vide, por exemplo, Milstein *et al.*, (Galfre and Milstein, *Methods Enzymol* (1981) 73: 3-46). A triagem dos hibridomas que usam métodos padrão produzirá anticorpos monoclonais de especificidade variável (isto é, para diferentes epítopos) e afinidade. Um anticorpo monoclonal selecionado com as propriedades desejadas, por exemplo, ligação rábica, pode ser usado como expresso pelo hibridoma, este pode ser ligado a uma molécula tal como polietileno glicol (PEG) para alterar suas propriedades, ou um cDNA que codifica este pode ser isolado, sequenciado e manipulado de várias formas. Árvores dendroméricas sintéticas podem ser adicionadas a cadeias laterais de aminoácidos reativas, por exemplo, lisina para potencializar as propriedades imunogênicas da glicoproteína rábica. Além disso, a técnica de dinucleotídeo de CPG pode ser usada para potencializar as propriedades imunogênicas da glicoproteína rábica. Outras manipulações incluem substituir ou deletar resíduos de amino acil que contribuem com a instabilidade do anticorpo durante o armazenamento ou após a administração a um sujeito, e técnicas de maturação de afinidade para potencializar a afinidade do anticorpo da glicoproteína rábica.

[0077] Em uma modalidade, o anticorpo da presente tecnologia é um

anticorpo monoclonal antirrábico produzido por um hibridoma que inclui uma célula B obtida de um animal não-humano transgênico, por exemplo, um camundongo transgênico, tendo um genoma compreendendo um transgene de cadeia pesada humano e um transgene de cadeia leve fundido com uma célula imortalizada. Técnicas de hibridoma incluem aquelas conhecidas na técnica e ensinadas em Harlow et al, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 349 (1988); Hammerling et al, *Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas*, 563-681 (1981). Outros métodos para produzir hibridomas e anticorpos monoclonais são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica.

[0078] Técnica de Exibição de Fago. Os anticorpos da presente tecnologia podem ser produzidos através da aplicação de DNA recombinante e da tecnologia de exibição de fago. Por exemplo, os anticorpos antirrábicos, podem ser preparados usando vários métodos de exibição de fago conhecidos na técnica. Nos métodos de exibição de fago, domínios de anticorpo funcionais são exibidos na superfície de uma partícula de fago que transporta sequências de polinucleotídeos que codificam os mesmos. O fago com uma propriedade de ligação desejada é selecionado a partir de uma biblioteca de anticorpo combinatória ou de repertório (por exemplo, humana ou murina) selecionando diretamente com antígeno, normalmente ligada ao antígeno ou capturada para uma superfície sólida ou grânulo. O fago usado nesses métodos é normalmente fago filamentoso incluindo fd e M13 com domínios de anticorpo Fv estabilizados por Fab, Fv ou dissulfeto são fundidos de forma recombinante com a proteína do gene III ou gene VIII do fago. Além disso, ps métodos podem ser adaptados para a construção de bibliotecas de expressão de Fab (Vide, por exemplo, Huse, *et al.*, *Science* 246: 1275-1281, 1989) para permitir a rápida e eficaz identificação de fragmentos Fab monoclonais com a especificidade desejada para um polipeptídeo do vírus rábico, por exemplo, um polipeptídeo ou derivados, fragmentos, análogos ou homólogos dos

mesmos. Outros exemplos de métodos de exibição de fago que podem ser usados para fazer os anticorpos da presente tecnologia incluem aqueles conhecidos na técnica. Métodos úteis para exibir polipeptídeos na superfície das partículas de bacteriófago ligando os polipeptídeos através de ligações de dissulfeto foram descritos por Lohning, Pat. U.S. Nº 6.753.136. Após a seleção de fago, o anticorpo que codifica regiões do fago pode ser isolado e usado para gerar anticorpos inteiros, incluindo anticorpos humanos, ou qualquer outro fragmento de ligação ao antígeno desejado, e expresso em qualquer hospedeiro desejado incluindo células de mamíferos, células de insetos, células vegetais, levedura, e bactérias. Por exemplo, técnicas para produzir de forma recombinante fragmentos Fab, Fab' e F(ab')₂ podem também ser empregadas usando métodos conhecidos na técnica tais como aqueles divulgados no WO 92/22324; Mullinax et al, BioTechniques 12: 864-869, 1992; e Sawai *et al.*, AJRI 34: 26-34, 1995; e Better et al, Science 240: 1041-1043, 1988.

[0079] Geralmente, anticorpos híbridos ou fragmentos de anticorpo híbridos que são clonados em um vetor de exibição podem ser selecionados contra o antígeno apropriado a fim de identificar variantes que mantiveram boa atividade de ligação, pois o anticorpo ou fragmento de anticorpo estará presente na superfície da partícula de fago ou fagomídeo. Vide, por exemplo, Barbas III et al, Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001). No entanto, outros formatos de vetor poderiam ser usados para este processo, tal como clonagem da biblioteca de fragmento de anticorpo em um vetor de fago lítico (sistemas T7 ou Lambda Zap modificados) para seleção e/ou triagem.

[0080] Expressão de Anticorpos Antirrábicos Recombinantes. Como observado acima, os anticorpos da presente tecnologia podem ser produzidos através da aplicação de tecnologia de DNA recombinante. Construtos de polinucleotídeo recombinante que codificam um anticorpo antirrábico da

presente tecnologia normalmente incluem uma sequência de controle de expressão ligada operacionalmente a sequências codificadoras das cadeias de anticorpo antirrábico, incluindo regiões do promotor heterólogo ou naturalmente associado. Como tal, outro aspecto da tecnologia inclui vetores contendo uma ou mais sequências de ácidos nucleicos codificando um anticorpo antirrábico da presente tecnologia. Para a expressão recombinante de um ou mais dos polipeptídeos da tecnologia, o ácido nucleico contendo toda ou uma porção da sequência de nucleotídeos codificando o anticorpo antirrábico é inserido em um vetor de clonagem apropriado, ou um vetor de expressão (isto é, um vetor que contém os elementos necessários para a transcrição e tradução da sequência codificadora de polipeptídeo inserida) por técnicas de DNA recombinante conhecidas na técnica e conforme detalhado abaixo. Métodos para produzir diversas populações de vetores foram descritos por Lerner et al, Pat. U.S. Nº 6.291.160; 6.680.192.

[0081] Em geral, os vetores de expressão úteis nas técnicas de DNA recombinante estão frequentemente na forma de plasmídeos. No presente relatório descriptivo, "plasmídeo" e "vetor" podem ser usados de forma intercambiável uma vez que o plasmídeo é a forma mais comumente usada de vetor. No entanto, a presente tecnologia é destinada a incluir essas outras formas de vetores de expressão que não são tecnicamente plasmídeos, tais como vetores virais (por exemplo, replicação de retrovírus defeituoso, adenovírus e vírus adeno-associados), que atendem funções equivalentes. Tais vetores virais permitem infecção de um sujeito e expressão no sujeito de um composto. Em algumas modalidades, as sequências de controle de expressão são sistemas de promotor eucariótico em vetores capazes de transformar ou transfectar células hospedeiras eucarióticas. Uma vez que o vetor foi incorporado no hospedeiro apropriado, o hospedeiro é mantido sob condições adequadas para expressão de alto nível de sequências de nucleotídeos que codificam o anticorpo antirrábico, e a coleta e purificação do anticorpo

antirrábico, por exemplo, anticorpos antirrábicos de reação cruzada. Vide, de forma geral, Pedido U.S. Nº 20020199213. Esses vetores de expressão são normalmente replicáveis nos organismos de hospedeiro tanto como episomos quanto como uma parte integrante do DNA cromossômico do hospedeiro. Comumente, vetores de expressão contêm marcadores de seleção, por exemplo, resistência à ampicilina ou resistência à higromicina, para permitir a detecção dessas células transformadas com as sequências de DNA desejadas. Vetores também podem codificar o peptídeo sinal, por exemplo, pectato liase, útil para direcionar a secreção de fragmentos de anticorpo extracelular.

[0082] Os vetores de expressão recombinante da presente tecnologia compreendem um ácido nucleico codificando um composto com propriedades de ligação róbica em uma forma adequada para expressão do ácido nucleico em uma célula hospedeira, o que significa que os vetores de expressão recombinante incluem uma ou mais sequências regulatórias, selecionadas na base das células hospedeiras podem ser usadas para expressão que é operacionalmente ligada à sequência de ácidos nucleicos a ser expressa. Dentro de um vetor de expressão recombinante, "operacionalmente ligado" destina-se a significar que a sequência de nucleotídeos de interesse está relacionada à(s) sequência(s) regulatória(s) em uma forma que permite a expressão da sequência de nucleotídeos (por exemplo, em um sistema de transcrição/tradução *in vitro* ou em uma célula hospedeira quando o vetor é introduzido na célula hospedeira). O termo "sequência regulatória" é destinado a incluir promotores, potenciadores e outros elementos de controle de expressão (por exemplo, sinais de poliadenilação). Tais sequências regulatórias são descritas, por exemplo, em Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Sequências regulatórias incluem aquelas que direcionam a expressão constitutiva de uma sequência de nucleotídeos em muitos tipos de célula hospedeira e aquelas que direcionam a expressão da

sequência de nucleotídeos apenas em determinadas células hospedeiras (por exemplo, sequências regulatórias tecido-específicas). Será apreciado por aqueles versados na técnica que o projeto do vetor de expressão pode depender desses fatores como a escolha da células hospedeira a ser transformada, o nível de expressão do polipeptídeo desejado, etc. Sequências regulatórias típicas úteis como promotores de expressão de polipeptídeo recombinante (por exemplo, anticorpo antirrábico), incluem, por exemplo, mas não estão limitadas a, 3-fosglicerato quinase e outras enzimas glicolíticas. Promotores de levedura induzíveis incluem, entre outros, promotores de álcool desidrogenase, isocitocromo C, e as enzimas responsáveis pela utilização de maltose e galactose. Em uma modalidade, um polinucleotídeo que codifica um anticorpo antirrábico da presente tecnologia é operacionalmente ligado a um promotor de ara B e expressível em uma célula hospedeira. Vide Pat. U.S. 5.028.530. Os vetores de expressão da presente tecnologia podem ser introduzidos em células hospedeiras para produzir assim polipeptídeos ou peptídeos, incluindo polipeptídeos de fusão, codificados por ácidos nucleicos conforme descrito neste documento (por exemplo, anticorpo antirrábico, etc.).

[0083] Outro aspecto da presente tecnologia pertence a células hospedeiras que expressam anticorpo antirrábico, que contêm ácidos nucleicos que codificam um ou mais anticorpos antirrábicos. Os vetores de expressão recombinante da presente tecnologia podem ser projetados para a expressão de um anticorpo antirrábico em células procarióticas ou eucarióticas. Por exemplo, um anticorpo antirrábico pode ser expresso em células bacterianas, tais como *Escherichia coli*, células de inseto (usando vetores de expressão de baculovírus), células fúngicas, células de levedura, por exemplo, células de levedura ou células de mamíferos. Células hospedeiras adequadas são discutidas em Goeddel, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press,

San Diego, Calif. (1990).

[0084] Alternativamente, o vetor de expressão recombinante pode ser transcrito e traduzido *in vitro*, por exemplo, usando sequências regulatórias do promotor T7 e T7 polimerase. Métodos úteis para a triagem da preparação de polipeptídeos tendo propriedade predeterminada, por exemplo, anticorpo antirrábico, através da expressão de sequências de polinucleotídeo estocasticamente geradas foram descritos. Vide Pat. U.S. N°s 5.763.192; 5.723.323; 5.814.476; 5.817.483; 5.824.514; 5.976.862; 6.492.107; 6.569.641.

[0085] A expressão de polipeptídeos em procariontes é mais frequentemente realizada em *E. coli* com vetores contendo promotores constitutivos ou induzíveis direcionando a expressão de polipeptídeos de fusão ou não-fusão. Os vetores de fusão adicionam um número de aminoácidos a um polipeptídeo codificado nele, geralmente para o terminal amino do polipeptídeo recombinante. Tais vetores de fusão normalmente atendem três finalidades: (i) aumentar a expressão do polipeptídeo recombinante; (ii) aumentar a solubilidade do polipeptídeo recombinante; e (iii) ajudar na purificação do polipeptídeo recombinante agindo como um ligante na purificação da afinidade. Muitas vezes, em vetores de expressão de fusão, um sítio de clivagem proteolítico é introduzido na junção da fração da fusão e o polipeptídeo recombinante para permitir a separação do polipeptídeo recombinante da fração de fusão posterior para purificação do polipeptídeo de fusão. Tais enzimas e suas sequências de reconhecimento cognatas, incluem o Fator Xa, trombina e enteroquinase. Vetores de expressão de fusão típicos incluem pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith and Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) e pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fundem glutationa S-transferase (GST), polipeptídeo de ligação à maltose E, ou polipeptídeo A, respectivamente, com o polipeptídeo recombinante alvo.

[0086] Exemplos de vetores de expressão de *E. coli* de não-fusão induzíveis incluem pTrc (Amrann et al, (1988) Gene 69: 301-315) e pET 11d (Studier et al., GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89). Métodos para montagem alvo de peptídeo ativo distinto ou domínios de proteína para produzir polipeptídeos multifuncionais através da fusão de polipeptídeos foram descritos por Pack et al, Pat. U.S. N°s 6.294.353; 6.692.935. Uma estratégia para maximizar a expressão de polipeptídeo recombinante, por exemplo, um anticorpo antirrábico, em *E. coli* é para expressar o polipeptídeo em bactérias hospedeiras com uma capacidade prejudicada para clivar proteoliticamente o polipeptídeo recombinante. Vide, por exemplo, Gottesman, GENE EXPRESSION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Outra estratégia é alterar a sequência de ácido nucleico do ácido nucleico a ser inserido em um vetor de expressão de modo que os códons individuais para cada aminoácido sejam aqueles preferencialmente utilizados no hospedeiro de expressão, por exemplo, *E. coli* (Vide, por exemplo, Wada, et al., 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118). Essa alteração de sequências de ácidos nucleicos da presente tecnologia pode ser realizada por técnicas de síntese de DNA padrão.

[0087] Em outra modalidade, o vetor de expressão de anticorpo antirrábico é um vetor de expressão de levedura. Exemplos de vetores para expressão em *Saccharomyces cerevisiae* de levedura incluem pYEpSecl (Baldari, et al., 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan and Herskowitz, Cell 30: 933-943, 1982), pJRY88 (Schultz et al, Gene 54: 113-123, 1987), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif), e picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif). Alternativamente, um anticorpo antirrábico pode ser expresso em células de inseto usando vetores de expressão de baculovírus. Vetores de baculovírus disponíveis para a expressão de polipeptídeos, por

exemplo, anticorpo antirrábico, em células de inseto cultivadas (por exemplo, células SF9) incluem a série de pAc (Smith, et al., Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165, 1983) e a série de pVL (Lucklow and Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

[0088] Em outra modalidade, um ácido nucleico que codifica um anticorpo antirrábico da presente tecnologia é expresso em células de mamíferos usando um vetor de expressão de mamíferos. Exemplos de vetores de expressão de mamíferos incluem, por exemplo, mas não estão limitados a, pCDM8 (vide Nature 329: 840, 1987) e pMT2PC (Kaufman, et al, EMBO J. 6: 187-195, 1987). Quando usadas em células de mamíferos, as funções de controle do vetor de expressão são muitas vezes fornecidas por elementos regulatórios virais. Por exemplo, promotores comumente usados são derivados de polioma, adenovírus 2, citomegalovírus, e vírus simiano 40. Para outros sistemas de expressão adequados para ambas as células procarióticas e eucarióticas úteis para expressão do anticorpo antirrábico da presente tecnologia. Vide, por exemplo, Capítulos 16 e 17 de Sambrook, et al, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

[0089] Em outra modalidade, o vetor de expressão de mamíferos recombinante é capaz de direcionar a expressão do ácido nucleico em um tipo de célula específico (por exemplo, elementos regulatórios tecido-específicos são usados para expressar o ácido nucleico). Elementos regulatórios tecido-específicos são conhecidos na técnica. Exemplos não-limitantes de promotores tecido-específicos adequados incluem o promotor de albumina (específico do fígado; Pinkert, et al, Genes Dev. 1: 268-277, 1987), promotores linfoide-específicos (Calame and Eaton, Adv. Immunol. 43. 235-275, 1988), em promotores específicos de receptores de células T (Winoto and Baltimore, EMBO J. 8: 729-733, 1989) e imunoglobulinas (Banerji, et al.,

1983. Cell 33: 729-740; Queen and Baltimore, Cell 33: 741-748, 1983.), promotores neurônio-específicos (por exemplo, o promotor de neurofilamento; Byrne and Ruddle, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477, 1989), promotores específicos do pâncreas (Edlund, et al., 1985. Science 230: 912-916), e promotores específicos da glândula mamária (por exemplo, promotor do soro do leite; Pat. U.S. Nº 4.873.316 e Publicação de Pedido Europeu Nº 264, 166). Promotores regulados de forma desenvolvida também são englobados, por exemplo, os promotores de hox murino (Kessel and Gruss, Science 249: 374-379, 1990) e o promotor de α -fetoproteína (Campes and Tilghman, Genes Dev. 3: 537-546, 1989).

[0090] Outro aspecto dos presentes métodos pertence às células hospedeiras em que um vetor de expressão recombinante da presente tecnologia foi introduzido. Os termos "célula hospedeira" e "célula hospedeira recombinante" são usados de forma intercambiável neste documento. Entende-se que tais termos se referem não só à célula do sujeito específica, mas também à progênie ou progênie potencial de tal célula. Como determinadas modificações podem ocorrer na sucessão de gerações devido à mutação ou influências ambientais, tal progênie pode, na verdade, não ser idêntica à célula-mãe, mas ainda está incluída no escopo do termo como usado neste documento.

[0091] Uma célula hospedeira pode ser qualquer células procariótica ou eucariótica. Por exemplo, um anticorpo antirrábico pode ser expresso em células bacterianas, tais como *E. coli*, células de inseto, células de levedura ou de mamíferos. Células de mamíferos são um hospedeiro adequado para expressar os segmentos de nucleotídeo codificando imunoglobulinas ou fragmentos dos mesmos. Vide Winnacker, de Genes To Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Uma série de linhagens de célula hospedeira adequadas capazes de secretar proteínas heterólogas intactas foi desenvolvida na técnica, e incluem linhagens celulares de ovário de hamster chinês (CHO),

várias linhagens celulares de COS, células HeLa, células L e linhagens celulares de mieloma. Em algumas modalidades, as células são não-humanas. Vetores de expressão para essas células podem incluir sequências de controle de expressão, tal como uma origem de replicação, um promotor, um potenciador e sítios de informação de processamento necessários, tais como sítios de ligação ao ribossomo, sítios de *splice* de RNA, sítios de poliadenilação, e sequências de terminador transcrecional. Queen et al, Immunol. Rev. 89: 49, 1986. As sequências de controle de expressão ilustrativas são promotores derivados de genes endógenos, citomegalovírus, SV40, adenovírus, papilomavírus bovino, e similares. Co et al, J Immunol. 148: 1149, 1992. Outras células hospedeiras adequadas são conhecidas por aqueles versados na técnica.

[0092] O DNA do vetor pode ser introduzido em células procarióticas ou eucarióticas através de técnicas de transformação ou transfecção convencionais. Como usado neste documento, os termos "transformação" e "transfecção" são destinados a se referir a uma variedade de técnicas reconhecidas na técnica para introduzir ácido nucleico estrangeiro (por exemplo, DNA) em uma célula hospedeira, incluindo coprecipitação de fosfonato de cálcio ou cloreto de cálcio, transfecção mediada por DEAE-dextran, lipofecção, ou eletroporação, transfecção viral ou biolística pode ser usada para outros hospedeiros celulares. Outros métodos usados para transformar células de mamíferos incluem o uso de polibreno, fusão de protoplasto, lipossomos, eletroporação, e microinjeção (Vide, geralmente, Sambrook et al., Molecular Cloning). Métodos adequados para transformar ou transfectar células hospedeiras podem ser encontrados em Sambrook, et al. (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), e outros manuais de laboratório. Os vetores contendo os segmentos de DNA de interesse podem ser transferidos para a célula

hospedeira por métodos bem-conhecidos, dependendo do tipo de hospedeiro celular.

[0093] Para a transfecção estável de células de mamíferos, sabe-se que, dependendo do vetor de expressão ou técnica de transfecção usados, apenas uma pequena fração das células pode integrar o DNA estrangeiro em seu genoma. A fim de identificar e selecionar estes integrantes, um gene que codifica um marcador selecionável (por exemplo, resistência a antibióticos) é geralmente introduzido nas células hospedeiras juntamente com o gene de interesse. Vários marcadores selecionáveis incluem aqueles que conferem resistência a drogas, tais como G418, higromicina e metotrexato. O ácido nucleico que codifica um marcador selecionável pode ser introduzido em uma célula hospedeira no mesmo vetor uma vez que codifica o anticorpo antirrábico ou pode ser introduzido em um vetor separado. Células estavelmente transfectadas com o ácido nucleico introduzido podem ser identificadas pela seleção da droga (por exemplo, as células que incorporaram o gene do marcador selecionável sobreviverão, enquanto as outras células morrerão).

[0094] Uma células hospedeira que inclui um anticorpo antirrábico da presente tecnologia, tal como uma célula hospedeira procariótica ou eucariótica na cultura, pode ser usada para produzir (isto é, expressar) anticorpo antirrábico recombinante. Em uma modalidade, o método compreende cultivo da célula hospedeira (na qual um vetor de expressão recombinante que codifica o anticorpo antirrábico foi introduzido) em um meio adequado de modo que o anticorpo antirrábico seja produzido. Em outra modalidade, o método ainda compreende a etapa de isolar o anticorpo antirrábico do meio ou da célula hospedeira. Uma vez expressas, coletas do anticorpo antirrábico, por exemplo, dos anticorpos antirrábicos ou dos polipeptídeos relacionados ao anticorpo antirrábico são purificadas a partir dos meios de cultura e de células hospedeiras. O anticorpo antirrábico pode

ser purificado de acordo com os procedimentos padrão da técnica, incluindo purificação por HPLC, cromatografia de coluna, eletroforese em gel e similares. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico é produzido em um organismo hospedeiro pelo método de Boss et al., Pat. U.S. Nº 4.816.397. Geralmente, cadeias de anticorpo antirrábico são expressas com sequências sinal e, portanto, são liberadas para os meios de cultura. No entanto, se as cadeias de anticorpo antirrábico não forem naturalmente secretadas por células hospedeiras, as cadeias de anticorpo antirrábico podem ser liberadas por tratamento com detergente suave. A purificação de polipeptídeos recombinantes é conhecida na técnica e inclui precipitação de sulfato de amônio, técnica de purificação de cromatografia de afinidade, cromatografia de coluna, técnica de purificação de troca iônica, eletroforese em gel e similares (vide, de forma geral, Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., 1982)).

[0095] Polinucleotídeos que codificam anticorpos antirrábicos, por exemplo, as sequências codificadoras de anticorpo antirrábico, podem ser incorporados em transgenes para a introdução no genoma de um animal transgênico e expressão posterior no soro do animal transgênico. Vide, por exemplo, Pat. U.S. Nºs 5.741.957, 5.304.489, e 5.849.992. Os transgenes adequados incluem sequências codificadoras para cadeias leves e/ou pesadas na ligação operável com um promotor e potenciador de um gene específico da glândula mamária, tal como a caseína ou β -lactoglobulina. Para a produção de animais transgênicos, os transgenes podem ser microinjetados em óócitos fertilizados, ou podem ser incorporados no genoma de células-tronco embrionárias, e os núcleos de tais células transferidos para óócitos sem núcleo.

[0096] Devido à degeneração de sequências codificadoras de ácido nucleico, outras sequências que codificam substancialmente as mesmas sequências de aminoácidos como aquelas das proteínas de ocorrência natural

podem ser usadas na prática da presente tecnologia. Estas incluem, mas não estão limitadas a, sequências de ácidos nucleicos, incluindo todas ou porções das sequências de ácidos nucleicos que codificam os polipeptídeos acima, que são alterados pela substituição de diferentes códons que codificam um resíduo de aminoácido funcionalmente equivalente dentro da sequência, assim produzindo uma alteração silenciosa. Aprecia-se que a sequência de nucleotídeo de uma imunoglobulina de acordo com a presente tecnologia tolera variações de homologia de sequência de até 25%, calculadas por métodos padrão ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis," Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pp. 127-149, 1998, Alan R. Liss, Inc.) desde que tal variante forme um anticorpo operativo que reconhece glicoproteínas rábicas ou tipo rábicas. Por exemplo, um ou mais resíduos de aminoácidos dentro de uma sequência de polipeptídeo podem ser substituídos por outro aminoácido de uma polaridade similar que age como um equivalente funcional, resultando em uma alteração silenciosa. Substitutos para um aminoácido dentro da sequência podem ser selecionados de outros membros da classe à qual o aminoácido pertence. Por exemplo, os aminoácidos não polares (hidrofóbicos) incluem alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano e metionina. Os aminoácidos neutros polares incluem glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, e glutamina. Os aminoácidos positivamente carregados (básicos) incluem arginina, lisina e histidina. Os aminoácidos negativamente carregados (ácidos) incluem ácido aspártico e ácido glutâmico. Além disso, são incluídos no escopo da presente tecnologia proteínas ou fragmentos ou derivados dos mesmos que são diferencialmente modificados durante ou após a tradução, por exemplo, por glicosilação, clivagem proteolítica, ligação a uma molécula de anticorpo ou outros ligantes celulares, etc. Qualquer técnica para mutagênese conhecida na técnica pode ser usada, incluindo, mas não limitada a, mutagênese sítio-dirigida *in vitro*, J. Biol.

Chem. 253 :6551, uso de ligantes Tab (Pharmacia), e similares.

[0097] Anticorpos de Cadeia Única. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico da presente tecnologia é um anticorpo antirrábico de cadeia única. De acordo com a presente tecnologia, técnicas podem ser adaptadas para a produção de anticorpos de cadeia única específicas para uma glicoproteína rábica (Vide, por exemplo, Pat. U.S. Nº 4.946.778). Exemplos de técnicas que podem ser usadas para produzir Fvs e anticorpos de cadeia única da presente tecnologia incluem aqueles descritos nas Pat. U.S. Nºs 4.946.778 e 5.258.498; Huston et al., Methods in Enzymology, 203: 46-88, 1991; Shu, L. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7995-7999, 1993; e Skerra *et al.*, Science 240: 1038-1040, 1988.

[0098] Anticorpos Quiméricos e Humanizados. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico da presente tecnologia é um anticorpo antirrábico químérico. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico da presente tecnologia é um anticorpo antirrábico humanizado. Em uma modalidade da presente tecnologia, os anticorpos doadores e aceitadores são anticorpos monoclonais de espécies diferentes. Por exemplo, o anticorpo aceitador é um anticorpo humano (para minimizar sua antigenicidade em um ser humano), em cujo caso o anticorpo CDR-enxertado resultante é denominado um anticorpo "humanizado".

[0099] Anticorpos antirrábicos recombinantes, tais como anticorpos monoclonais humanizados e químéricos, tais como anticorpos monoclonais químéricos e humanizados, compreendendo porções humanas e não-humanas, podem ser feitos usando técnicas de DNA recombinante padrão, e estão dentro do escopo da presente tecnologia. Para alguns usos, incluindo uso *in vivo* do anticorpo antirrábico da presente tecnologia em seres humanos bem como o uso destes ensaios de detecção *in vitro* de agentes, é possível usar anticorpos antirrábicos químéricos, humanizados, ou humanos. Tais anticorpos monoclonais químéricos e humanizados podem ser produzidos por

técnicas de DNA recombinante conhecidas na técnica.

[00100] Em uma modalidade, a presente tecnologia permite a construção de anticorpos antirrábicos humanizados que não são suscetíveis de induzir uma resposta ao anticorpo anticamundongo humano (adiante referido como "HAMA"), embora ainda tendo uma função efetora de anticorpo eficaz. Como usado neste documento, os termos "humanos" e "humanizados", em relação aos anticorpos, se referem a qualquer anticorpo que é esperado eliciar uma resposta imunogênica fraca terapeuticamente tolerável em um sujeito humano. Em uma modalidade, a presente tecnologia fornece a anticorpos antirrábicos humanizados, imunoglobulinas de cadeia leve e pesada.

[00101] Anticorpos de CDR. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico da presente tecnologia é um anticorpo de CDR antirrábico. Geralmente os anticorpos doadores e aceitadores usados para gerar o anticorpo de CDR antirrábico são anticorpos monoclonais de diferentes espécies; normalmente, o anticorpo aceitador é um anticorpo humano (para minimizar sua antigenicidade em um ser humano), em cujo caso o anticorpo CDR-enxertado resultante é denominado um anticorpo "humanizado". O enxerto pode ser de uma CDR única (ou mesmo uma porção de uma CDR única) dentro de uma V_H ou V_L única do anticorpo aceitador, ou de múltiplas CDRs (ou porções dos mesmos) dentro de uma ou ambas V_H e V_L . Frequentemente todas as três CDRs em todos os domínios variáveis do anticorpo aceitador serão substituídas por CDRs do doador correspondentes, embora precise substituir apenas quando necessário para permitir ligação adequada do anticorpo enxertado em CDR resultante a MetAp3. Métodos para gerar anticorpos enxertados em CDR e humanizados são ensinados por Queen et al. Pat. U.S. Nº 5.585.089, Pat. U.S. Nº 5.693.761; Pat. U.S. Nº 5.693.762; e Winter U.S. 5.225.539; e EP 0682040. Métodos úteis para preparar polipeptídeos de V_H e V_L são ensinados por Winter et al., Pat. U.S. Nºs 4.816.397; 6.291.158; 6.291.159; 6.291.161; 6.545.142; EP 0368684;

EP0451216; EP0120694.

[00102] Após selecionar candidatos de região *framework* adequados a partir da mesma família e/ou do mesmo membro da família, qualquer uma ou ambas as regiões variáveis de cadeia leve e pesada são produzidas pelo enxerto das CDRs a partir das espécies de origem nas regiões *framework* híbridas. A montagem de anticorpos híbridos ou fragmentos de anticorpo híbrido tendo regiões de cadeia variável híbridas com relação a qualquer um dos aspectos acima pode ser realizada usando métodos convencionais conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, sequências de DNA que codificam os domínios variáveis híbridos descritos neste documento (isto é, estruturas baseadas nas espécies alvo e CDRs das espécies de origem) podem ser produzidas pela síntese de oligonucleotídeo e/ou PCR. O ácido nucleico que codifica regiões CDR também pode ser isolado dos anticorpos de espécies de origem usando enzimas de restrição adequadas e ligado na estrutura de espécie alvo pela ligação às enzimas de ligação adequadas. Alternativamente, as regiões *framework* das cadeias variáveis do anticorpo de espécies de origem podem ser alteradas por mutagênese sítio-dirigida.

[00103] Uma vez que os híbridos são construídos a partir de escolhas entre múltiplos candidatos correspondentes a cada região *framework*, há muitas combinações de sequências que são passíveis de construção em conformidade com os princípios descritos neste documento. Nesse sentido, bibliotecas de híbridos podem ser montadas tendo membros com diferentes combinações de regiões *framework* individuais. Essas bibliotecas podem ser coletas do banco de dados eletrônico de sequências ou coletas físicas de híbridos.

[00104] Este processo normalmente não altera FRs do anticorpo aceitador flanqueando as CDRs enxertadas. No entanto, uma pessoa versada na técnica às vezes pode melhorar a afinidade de ligação ao antígeno do anticorpo CDR enxertado antirrábico resultante substituindo determinados

resíduos de uma determinada FR para tornar a FR mais parecida à FR correspondente do anticorpo doador. Localizações adequadas das substituições incluem resíduos de aminoácidos adjacentes à CDR, ou que são capazes de interagir com uma CDR (Vide, por exemplo, US 5.585.089, especialmente colunas 12-16). Ou uma pessoa versada na técnica pode iniciar com a FR do doador e modificá-la para ser mais parecida com a FR do aceitador ou uma FR consenso humana. Técnicas para fazer essas modificações são conhecidas na técnica. Particularmente se a FR resultante encaixar uma FR consenso humana nessa posição, ou for pelo menos 90% ou mais idêntica à essa FR consenso, fazendo isso poderão não aumentar a antigenicidade do anticorpo de CDR antirrábico modificado resultante significativamente em comparação com o mesmo anticorpo com uma FR completamente humana.

[00105] Proteínas de Fusão. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico da presente tecnologia é uma proteína de fusão. Os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia, quando fundidos com uma segunda proteína, podem ser usados como uma marca antigênica. Exemplos de domínios que podem ser fundidos com polipeptídeos incluem não apenas sequências sinal heterólogas, mas também outras regiões funcionais heterólogas. A fusão não necessariamente precisa ser direta, mas pode ocorrer através de sequências de ligante. Além disso, as proteínas de fusão da presente tecnologia também podem ser engenheiradas para aprimorar as características dos anticorpos antirrábicos. Por exemplo, uma região de aminoácidos adicionais, particularmente aminoácidos carregados, pode ser adicionada ao terminal N do anticorpo antirrábico para aprimorar a estabilidade e persistência durante a purificação da célula hospedeira ou subsequente manipulação e armazenamento. Além disso, frações do peptídeo podem ser adicionadas a um anticorpo antirrábico para facilitar a purificação. Tais regiões podem ser removidas antes da preparação final do anticorpo

antirrábico. A adição de frações de peptídeo para facilitar a manipulação de polipeptídeos são técnicas de rotina e familiares na técnica. O anticorpo antirrábico da presente tecnologia pode ser fundido para sequências marcadoras, tal como um peptídeo que facilita a purificação do polipeptídeo fundido. Nas modalidades selecionadas, a sequência de aminoácido marcadora é um peptídeo de hexa-histidina, tal como a marca fornecida em um vetor pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif, 91311), entre outros, muitos dos quais estão comercialmente disponíveis. Como descrito em Gentz et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 821-824, 1989, por exemplo, a hexa-histidina fornece purificação conveniente da proteína de fusão. Outra marca de peptídeo útil para a purificação, a marca "HA", corresponde a um epítopo derivado da proteína de hemaglutinina de influenza. Wilson et al., Cell 37: 767, 1984. Assim, qualquer uma dessas fusões acima pode ser engenheirada usando os polinucleotídeos ou os polipeptídeos da presente tecnologia. Além disso, a proteína de fusão pode mostrar uma meia-vida aumentada *in vivo*.

[00106] Proteínas de fusão tendo estruturas diméricas ligadas ao dissulfeto (devido ao IgG) podem ser mais eficientes na ligação e neutralização de outras moléculas, do que a proteína secretada monomérica ou fragmento de proteína sozinho. Fountoulakis et al., J. Biochem. 270: 3958-3964, 1995.

[00107] De forma similar, EP-A-0 464 533 (homólogo canadense 2045869) divulga as proteínas de fusão compreendendo várias porções da região constante das moléculas de imunoglobulina junto com outra proteína humana ou parte da mesma. Em muitos casos, a parte de Fc em uma proteína de fusão é benéfica na terapia e diagnóstico, e assim pode resultar em, por exemplo, propriedades farmacocinéticas aprimoradas. Vide EP-A 0232 262. Alternativamente, deletar a parte de Fc após a proteína de fusão ter sido expressa, detectada, e purificada, seria desejado. Por exemplo, a porção de Fc

pode impedir a terapia e diagnóstico se a proteína de fusão for usada como um antígeno para imunizações. Na descoberta da droga, por exemplo, proteínas humanas, tal como hIL-5, foram fundidas com porções de Fc para fins de ensaios de triagem de alta produtividade para identificar antagonistas de hIL-5. Bennett et al, J. Molecular Recognition 8: 52-58, 1995; Johanson et al., J. Biol. Chem., 270: 9459-9471, 1995.

[00108] Anticorpos Antirrábicos Marcados. Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico da presente tecnologia é acoplado a uma fração do rótulo, isto é, grupo detectável. O rótulo específico ou grupo detectável conjugado com o anticorpo antirrábico não é um aspecto crítico da tecnologia, desde que não interfira significativamente na ligação específica do anticorpo antirrábico da presente tecnologia para a glicoproteína rábica ou glicoproteína do tipo rábico. O grupo detectável pode ser qualquer material tendo uma propriedade física ou química detectável. Tais rótulos detectáveis foram bem desenvolvidos no campo de imunoensaios e imageamento, em geral, a maior parte de qualquer rótulo útil em tais métodos pode ser aplicada à presente tecnologia. Assim, um rótulo é qualquer composição detectável por meios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, imunoquímicos, elétricos, ópticos ou químicos. Rótulos úteis na prática da presente tecnologia incluem grânulos magnéticos (por exemplo, DynabeadsTM), corantes fluorescentes (por exemplo, isotiocianato de fluoresceína, vermelho Texas, rodamina, e similares), radiorótulos (por exemplo, ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹²¹I, ¹³¹I, ¹¹²In, ^{99m}Tc), outros agentes de imageamento tais como microbolhas (para imageamento por ultrassom), ¹⁸F, ¹¹C, ¹⁵O, (para tomografia de emissão de pósitron), ^{99m}Tc, ¹¹¹In (para tomografia de emissão de fóton único), enzimas (por exemplo, peroxidase de raiz forte, fosfatase alcalina e outras comumente usadas em um ELISA), e rótulos colorimétricos tais como grânulos de ouro coloidal ou vidro colorido ou plástico (por exemplo, poliestireno, polipropileno, látex, e similares). As patentes que descreveram o uso de tais

rótulos incluem Pat. U.S. N°s 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; e 4.366.241, cada uma incorporada neste documento por referência em sua totalidade e para todos os fins. Vide também Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals (6th Ed., Molecular Probes, Inc., Eugene OR.).

[00109] O rótulo pode ser acoplado diretamente ou indiretamente ao componente desejado de um ensaio de acordo com os métodos bem-conhecidos na técnica. Como indicado acima, uma ampla variedade de rótulos pode ser usada, com a escolha do rótulo dependendo da sensibilidade requerida, facilidade de conjugação com o composto, requisitos de estabilidade, instrumentação disponível, e disposições de eliminação.

[00110] Rótulos não-radioativos são muitas vezes ligados por meios indiretos. Em geral, uma molécula ligante (por exemplo, biotina) é covalentemente ligada à molécula. O ligante que se liga a uma molécula antiligante (por exemplo, estreptavidina) que é inherentemente detectável ou covalentemente ligada a um sistema sinal, tal como uma enzima detectável, um composto fluorescente, ou um composto quimioluminescente. Uma série de ligantes e antiligantes pode ser usada. Onde um ligante tem um antiligante natural, por exemplo, biotina, tiroxina, e Cortisol, podem ser usados em conjunto com os antiligantes de ocorrência natural, marcados. Alternativamente, qualquer composto haptônico ou antigênico pode ser usado em combinação com um anticorpo, por exemplo, um anticorpo antirrábico.

[00111] As moléculas também podem ser conjugadas diretamente com compostos geradores de sinal, por exemplo, por conjugação com uma enzima ou fluoróforo. Enzimas de interesse como rótulos serão principalmente hidrolases, particularmente, fosfatases, esterases e glicosidases, ou oxidorredutases, particularmente peroxidases. Compostos fluorescentes úteis como frações de rótulo, incluem, mas não limitados a, por exemplo, fluoresceína e seus derivados, rodamina e seus derivados, dansila,

umbeliferona, e similares. Compostos quimioluminescentes úteis como frações de rótulo, incluem, mas não estão limitados a, por exemplo, luciferina, e 2,3-dihidroftalazinadionas, por exemplo, luminol. Para uma revisão de vários sistemas de produção de sinal ou rótulo que podem ser usados, vide Pat. U.S. Nº 4.391.904.

[00112] Os meios de detecção de rótulos são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Assim, por exemplo, onde o rótulo é um rótulo radioativo, meios para a detecção incluem um contador de cintilação ou filme fotográfico como na autoradiografia. Onde o rótulo é um rótulo fluorescente, ele pode ser detectado pela excitação do fluorocromo com comprimento de onda apropriado de luz e detecção da fluorescência resultante. A fluorescência pode ser detectada visualmente, por meio de filme fotográfico, através do uso de detectores eletrônicos tais como dispositivos de carga acoplada (CCDs) ou fotomultiplicadores e similares. De forma similar, rótulos enzimáticos podem ser detectados fornecendo os substratos apropriados para a enzima e detectar o produto de reação resultante. Finalmente rótulos colorimétricos simples podem ser detectados simplesmente pela observação da cor associada ao rótulo. Assim, em vários ensaios de fita, ouro conjugado muitas vezes aparece rosa, enquanto vários grânulos conjugados aparecem da cor do grânulo.

[00113] Alguns formatos de ensaio não requerem o uso de componentes marcados. Por exemplo, ensaios de aglutinação podem ser usados para detectar a presença de anticorpos alvo, por exemplo, os anticorpos antirrábicos. Neste caso, partículas antígeno-revestidas são aglutinadas por amostras compreendendo os anticorpos alvo. Neste formato, nenhum dos componentes precisa ser rotulado e a presença do anticorpo alvo é detectada pela simples inspeção visual.

B. Identificação e Caracterização dos Anticorpos Antirrábicos da Presente Tecnologia

[00114] Métodos úteis para identificar e triar anticorpos contra a raiva

e os polipeptídeos relacionados à raiva para aqueles que possuem a especificidade desejada para uma glicoproteína rábica incluem quaisquer técnicas imunologicamente conhecidas na técnica. Componentes de uma resposta imune podem ser detectados *in vitro* por vários métodos que são bem-conhecidos por aqueles versados na técnica. Por exemplo, (1) os linfócitos T citotóxicos podem ser incubados com células alvo radioativamente rotuladas e a lise destas células alvo detectadas pela liberação de radioatividade; (2) linfócitos T auxiliares podem ser incubados com抗ígenos e células que apresentam antígeno e a síntese e secreção de citocinas medidas por métodos padrão (Windhagen A; et al, *Immunity*, 2: 373-80, 1995); (3) as células que apresentam antígeno podem ser incubadas com o antígeno de proteína inteiro e a apresentação desse antígeno no MHC detectado por ensaios de ativação de linfócito T ou métodos biofísicos (Harding et al, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86: 4230-4, 1989); (4) mastócitos podem ser incubados com reagentes que realizam ligação cruzada com seus receptores de Fc-épsilon e liberação de histamina medida por imunoensaio enzimático (Siraganian et al., *TIPS*, 4: 432-437, 1983); e (5) ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA).

[00115] De forma similar, produtos de uma resposta imune em um organismo modelo (por exemplo, camundongo) ou um sujeito humano também podem ser detectados por diversos métodos que são bem-conhecidos para aqueles versados na técnica. Por exemplo, (1) a produção de anticorpos em resposta à vacinação pode ser facilmente detectada por métodos padrão atualmente usados em laboratórios clínicos, por exemplo, um ELISA; (2) a migração de células imunes para sítios da inflamação pode ser detectada arranhando a superfície da pele e colocando um recipiente estéril para capturar as células migradas para o sítio do arranhão (Peters et al., *Blood*, 72: 1310-5, 1988); (3) a proliferação de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) em resposta a mitógenos ou reação mista linfocitária pode

ser medida usando³ H-timidina; (4) a capacidade fagocitária de granulócitos, macrófagos, e outros fagócitos em PBMCs pode ser medida colocando PBMCs em poços juntamente com partículas rotuladas (Peters *et al.*, Blood, 72: 1310-5, 1988); e (5) a diferenciação de células do sistema imunológico pode ser medida rotulando PBMCs com anticorpos contra moléculas de CD tais como CD4 e CD8 e medindo a fração dos PBMCs expressando esses marcadores.

[00116] Em uma modalidade, anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são selecionados usando a exibição de peptídeos rábicos na superfície dos pacotes genéticos replicáveis. Vide, por exemplo, Pat. U.S. N°s 5.514.548; 5.837.500; 5.871.907; 5.885.793; 5.969.108; 6.225.447; 6.291.650; 6.492.160; EP 585 287; EP 605522; EP 616640; EP 1024191; EP 589 877; EP 774 511; EP 844 306. Métodos úteis para produzir/selecionar uma partícula de bacteriófago filamentoso contendo um genoma de fagemídeo que codifica uma molécula de ligação com uma especificidade desejada foram descritos. Vide, por exemplo, EP 774 511; US 5871907; US 5969108; US 6225447; US 6291650; US 6492160.

[00117] Em uma modalidade, anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são selecionados usando a exibição de peptídeos rábicos na superfície de uma célula hospedeira de levedura. Métodos úteis para o isolamento de polipeptídeos de scFv pela exibição da superfície de levedura foram descritos por Kieke *et al.*, Protein Eng. 1997 Nov; 10(11): 1303-10.

[00118] Em uma modalidade, anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são selecionados usando a exibição do ribossomo. Métodos úteis para identificar ligantes em bibliotecas de peptídeo com exibição do ribossomo foram descritos por Mattheakis *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:9022-26, 1994; e Hanes *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 4937-42, 1997.

[00119] Em uma modalidade, anticorpos antirrábicos da presente

tecnologia são selecionados usando a exibição de tRNA de peptídeos rábicos. Métodos úteis para seleção *in vitro* de ligantes usando a exibição de tRNA foram descritos por Merryman et al., Chem. Biol, 9: 741-46, 2002.

[00120] Em uma modalidade, anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são selecionados usando a exibição de RNA. Métodos úteis para selecionar peptídeos e proteínas usando bibliotecas de exibição de RNA foram descritos por Roberts et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-302, 1997; e Nemoto *et al.*, FEB S Lett., 414: 405-8, 1997. Métodos úteis para selecionar peptídeos e proteínas usando bibliotecas de exibição de RNA não naturais foram descritos por Frankel et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 13 : 506-12, 2003.

[00121] Em uma modalidade, anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são expressos no periplasma de bactérias gram negativas e misturados com glicoproteína rábica rotulada. Vide WO 02/34886. Em clones que expressam polipeptídeos recombinantes com afinidade para a glicoproteína rábica, a concentração da glicoproteína rábica rotulada ligada aos anticorpos antirrábicos é aumentada e permite que as células sejam isoladas do resto da biblioteca conforme descrito em Harvey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 22: 9193-98 2004 e Publicação de Pat. U.S. Nº 2004/0058403.

[00122] Após a seleção dos anticorpos antirrábicos desejados, é previsto que estes podem ser produzidos em grande volume por qualquer técnica conhecida por aqueles versados na técnica, por exemplo, expressão de células procarióticas ou eucarióticas e similares. Os anticorpos antirrábicos que são, por exemplo, mas não estão limitados a, anticorpos híbridos antirrábicos ou fragmentos podem ser produzidos usando técnicas convencionais para construir um vetor de expressão que codifica uma cadeia pesada do anticorpo em que as CDRs e, se necessário, uma porção mínima da região *framework* variável, que são necessárias para manter a especificidade de ligação do anticorpo de espécie original (como engenheirado de acordo

com técnicas descritas neste documento) são derivadas do anticorpo de espécie originária e o restante do anticorpo é derivado de uma imunoglobulina de espécie alvo que pode ser manipulada conforme descrito neste documento, assim produzindo um vetor para a expressão de uma cadeia pesada de anticorpo híbrido.

[00123] Medição de Ligação do Vírus Rábico. Em uma modalidade, um ensaio de ligação rábica se refere a um formato de ensaio em que uma glicoproteína rábica e um anticorpo antirrábico são misturados sob condições adequadas para a ligação entre a glicoproteína rábica ou tipo rábica e o anticorpo antirrábico e avaliação da quantidade de ligação entre a glicoproteína rábica ou tipo rábica e o anticorpo antirrábico. A quantidade de ligação é comparada com um controle adequado, que pode ser a quantidade de ligação na ausência da glicoproteína rábica, a quantidade da ligação na presença de composição de imunoglobulina não-específica, ou ambas. A quantidade de ligação pode ser avaliada por qualquer método adequado. Métodos de ensaio de ligação incluem, por exemplo, ELISA, radioimunoensaios, ensaios de proximidade de cintilação, ensaios de transferência de energia de fluorescência, cromatografia líquida, ensaios de filtração de membrana, e similares. Ensaios biofísicos para a medição direta da ligação de glicoproteína rábica ao anticorpo antirrábico são, por exemplo, ressonância magnética nuclear, fluorescência, polarização de fluorescência, ressonância de plasmon de superfície (BIACOR chips) e similares. A ligação específica é determinada por ensaios padrão conhecidos na técnica, por exemplo, ensaios de ligação de radioligante, ELISA, FRET, imunoprecipitação, SPR, MR (2D-MR), espectroscopia de massa e similares. Se a ligação específica de um anticorpo antirrábico candidato for pelo menos 1 por cento maior do que a ligação observada na ausência do anticorpo antirrábico candidato, o anticorpo antirrábico candidato será útil como um anticorpo antirrábico da presente tecnologia.

[00124] Cocristais das glicoproteínas rábicas e os anticorpos antirrábicos também são fornecidos pela presente tecnologia como um método de determinação de interações moleculares. As condições adequadas para a ligação entre o anticorpo antirrábico e uma glicoproteína rábica dependerão do composto e seu ligante e podem ser facilmente determinadas por uma pessoa versada na técnica.

[00125] Medição de Neutralização do Vírus Rábico. Como usado neste documento, "neutralização do vírus rábico" se refere à redução da infectividade do vírus rábico através da ligação de um anticorpo antirrábico. A capacidade dos anticorpos antirrábicos da presente tecnologia para neutralizar um vírus rábico pode ser avaliada *in vitro* ou *in vivo* usando métodos conhecidos na técnica. Métodos *in vitro* ilustrativos incluem o teste rápido de inibição de foco fluorescente (RFFIT), conforme descrito em Smith et al., "A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody," em: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, eds. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1996; 181-192. Métodos *in vivo* ilustrativos incluem, mas não estão limitados a, teste de neutralização de camundongo (MNT), tal como descrito em Hasse, et al., 13(2) J. Biol Stand. 123-28 (1985). Resultados ilustrativos de RFFIT e MNT são mostrados nos Exemplos, infra. Em algumas modalidades, a infectividade do vírus rábico é neutralizada pelo menos 5%, pelo menos 10%, pelo menos 15%, pelo menos 25%, pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 75%, pelo menos 85%, pelo menos 90%, pelo menos 95%, pelo menos 99%, pelo menos 99,5%, pelo menos 99,9%, ou pelo menos 100%.

[00126] Medição da Interferência da Vacina Rábica. Os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia têm a capacidade de neutralizar o vírus rábico em um sujeito em necessidade dos mesmos, sem interferir na eficácia de uma vacina rábica. Este aspecto da presente tecnologia é de valor

particular porque terapias ráticas típicas compreendem a coadministração de vacinas e anticorpos antirrábicos. O grau ao qual um anticorpo antirrábico interfere na eficácia de uma vacina rática pode ser avaliado usando métodos conhecidos na técnica, tal como demonstrado nos Exemplos, infra. Brevemente, a vacina antirrábica pode ser administrada a sujeitos animais em conjunto com ou na ausência de anticorpos antirrábicos. Após um período de tempo suficiente para a vacina eliciar uma resposta imune nos sujeitos, títulos específicos da vacina de sujeitos administrados com a vacina sozinha são comparados com aqueles de sujeitos administrados com a vacina em conjunto com o anticorpo. O grau ao qual um anticorpo antirrábico interfere na eficácia da vacina é refletido em um título de anticorpo específico da vacina reduzido. Resultados ilustrativos de tal experimento são mostrados nos Exemplos, infra. Em algumas modalidades, o anticorpo interfere na resposta imune induzida pela vacina rática menos do que 0,1%, menos do que 0,5%, menos do que 1%, menos do que 2%, menos do que 5%, menos do que 10%, menos do que 20%, menos do que 25%, menos do que 50%, ou menos do que 75%) em comparação com um sujeito de controle que foi administrado com a vacina, mas não administrado com o anticorpo.

[00127] Medição de Profilaxia Pós-exposição. Anticorpos antirrábicos podem ser avaliados para profilaxia pós-exposição em sujeitos expostos ao vírus rático usando métodos conhecidos na técnica tal como demonstrado nos Exemplos, infra. De forma breve, sujeitos animais expostos ao vírus rático podem ser administrados com um ou mais anticorpos antirrábicos candidatos como um componente de tratamento pós-exposição. O anticorpo pode ser administrado sozinho ou em conjunto com terapias ráticas conhecidas tal como uma vacina. Após um período de tempo suficiente para a infecção rática resultar, a taxa de sobrevivência de sujeitos administrados com o anticorpo é comparada com controles apropriados, em que nenhum anticorpo candidato foi administrado. A redução de infecciosidade do vírus rático é

refletida por uma taxa ou duração de tempo de sobrevivência aumentada de sujeitos administrados com o anticorpo do candidato em comparação com os controles. Resultados ilustrativos de tais experimentos são mostrados nos Exemplos, infra.

II. USOS DOS ANTICORPOS ANTIRRÁBICOS DA PRESENTE TECNOLOGIA

A. Usos de Diagnóstico de Anticorpos Antirrábicos

[00128] Os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são úteis nos métodos de diagnóstico. Como tal, a presente tecnologia fornece métodos usando os anticorpos no diagnóstico de infecção rábica em um sujeito. Anticorpos antirrábicos da presente tecnologia podem ser selecionados de modo que eles tenham qualquer nível de especificidade de ligação ao epítopo e afinidade de ligação muito alta a uma glicoproteína rábica. Em geral, quanto maior a afinidade de ligação de um anticorpo, as condições de lavagem mais rígidas poderão ser executadas em um imunoensaio para remover o material não especificamente ligado sem remover o polipeptídeo alvo. Consequentemente, anticorpos antirrábicos da presente tecnologia úteis em ensaios de diagnóstico geralmente têm afinidades de ligação de pelo menos 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} ou $10^{12} M$. Além disso, é desejável que os anticorpos antirrábicos usados como reagentes de diagnóstico tenham uma taxa de associação de cinética suficiente para atingir o equilíbrio sob condições padrão em pelo menos 12 h, pelo menos cinco (5) h, ou pelo menos uma (1) hora.

[00129] Anticorpos antirrábicos podem ser usados para detectar uma glicoproteína rábica imunorreativa ou uma glicoproteína do tipo rábico imunorreativa em uma variedade de formatos de ensaio padrão. Tais formatos incluem imunoprecipitação, Western blotting, ELISA, radioimunoensaio, e ensaios imunométricos. Vide Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988); Pat. U.S. N°s

3.791.932; 3.839.153; 3.850.752; 3.879.262; 4.034.074, 3.791.932; 3.817.837; 3.839.153; 3.850.752; 3.850.578; 3.853.987; 3.867.517; 3.879.262; 3.901.654; 3.935.074; 3.984.533; 3.996.345; 4.034.074; e 4.098.876. Amostras biológicas podem ser obtidas a partir de qualquer tecido ou fluido corporal de um sujeito.

B. Uso Terapêutico e Profilático de Anticorpos Antirrábicos

[00130] Os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia são úteis na terapia de profilaxia pós-exposição (PEP) para sujeitos expostos ao vírus rábico. Exposições possíveis incluem exposição à mordida (isto é, qualquer penetração na pele pelos dentes) incluindo mordidas de animal, e exposição à não-mordida. A exposição à não-mordida inclui o contato com animais infectados ou produtos de origem animal, tais como, mas não limitados a, cabelo, por exemplo, sangue, tecidos, urina, fezes, e saliva. A terapia de PEP normalmente compreende a administração de anticorpos antirrábicos a um sujeito em necessidade dos mesmos em combinação com uma vacina rábica.

[00131] As composições da presente tecnologia podem ser empregadas em conjunto com outras moléculas úteis na profilaxia e/ou tratamento de exposição ou infecção rábica. Por exemplo, elas podem ser coadministradas com uma ou mais vacinas contra o vírus rábico. Alternativamente, os anticorpos da presente tecnologia podem ser administrados antes ou após as uma ou mais vacinas. Os anticorpos podem ser administrados em conjunto com vacinas ráticas, incluindo, mas não limitadas a, vacina celular de embrião de pinto purificada (PCECV; RabAvert®, Novartis, Basel, Switzerland; Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha), vacina celular diploide humana (HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, EUA), e vacina rábica adsorvida (RVA). Adicionalmente, ou alternativamente, as composições da presente tecnologia podem ainda ser administradas em conjunto com a imunoglobulina rábica humana (HRIG) ou imunoglobulina rábica equina (ERIG).

[00132] As composições da presente tecnologia podem, opcionalmente, ser administradas como um único bolus a um sujeito em necessidade das mesmas. Alternativamente, o regime de dosagem pode compreender múltiplas administrações realizadas em diversas vezes pós-exposição. Por exemplo, o regime de dosagem pode compreender cinco doses de vacina rábica por via intramuscular e/ou por via intraperitoneal nos dias 0, 3, 7, 14 e 28 após a exposição. O sítio de administração pode variar em relação ao sítio da exposição rábica. Por exemplo, composições da presente tecnologia podem ser administradas em torno das feridas no dia 0 ou caso contrário logo que possível após a exposição, com o volume restante dado por via intramuscular em um sítio distante do sítio. Alternativamente, toda a composição pode ser administrada em um sítio distante do sítio de exposição. Composições da presente tecnologia podem ser administradas no mesmo sítio ou um sítio diferente como a administração de uma vacina rábica.

[00133] A administração pode ser realizada por qualquer via adequada, incluindo por via oral, por via intranasal, por via parenteral (por via intravenosa, por via intramuscular, por via intraperitoneal, ou por via subcutânea), por via retal, por via intracraniana, por via intratecal, ou por via tópica. A administração inclui a autoadministração e a administração por outra pessoa. Além disso, deve ser apreciado que os vários modos de tratamento ou prevenção de condições médicas conforme descrito são destinados a significar "substanciais", que incluem total, mas também menos do que o tratamento ou prevenção total, e em que algum resultado biologicamente ou medicinalmente relevante é atingido.

[00134] Em algumas modalidades, os anticorpos da presente tecnologia compreendem formulações farmacêuticas que podem ser administradas a sujeitos em necessidade das mesmas em uma ou mais doses. Os regimes de dosagem podem ser ajustados para fornecer a resposta desejada (por exemplo,

uma resposta terapêutica ou uma resposta profilática).

[00135] Normalmente, uma quantidade eficaz das composições da presente tecnologia, suficiente para atingir um efeito terapêutico ou profilático, varia de cerca de 0,000001 mg por quilograma de peso corporal por dia a cerca de 10.000 mg por quilograma de peso corporal por dia. Normalmente, as faixas de dosagem são de cerca de 0,0001 mg por quilograma de peso corporal por dia a cerca de 100 mg por quilograma de peso corporal por dia. Para a administração de anticorpos antirrábicos, a dosagem varia de cerca de 0,0001 a 100 mg/kg e mais geralmente 0,01 a 5 mg/kg a cada semana, a cada duas semanas ou a cada três semanas, do peso corporal do hospedeiro. Por exemplo as dosagens podem ser de 1 mg/kg de peso corporal ou 10 mg/kg de peso corporal a cada semana, a cada duas semanas ou a cada três semanas ou dentro da faixa de 1 a 10 mg/kg a cada semana, a cada duas semanas ou a cada três semanas. Em uma modalidade, uma dosagem única de anticorpo varia de 0,1-10,000 microgramas por kg de peso corporal. Em uma modalidade, as concentrações de anticorpo em um transportador varia de 0,2 a 2000 microgramas por mililitro distribuído. Um regime de tratamento exemplar envolve a administração uma vez a cada duas semanas ou uma vez por mês ou a cada 3 a 6 meses. Anticorpos antirrábicos podem ser administrados em várias ocasiões. Intervalos entre as dosagens unitárias podem ser por hora, diariamente, semanalmente, mensalmente ou anualmente. Os intervalos também podem ser irregulares, conforme indicado, medindo os níveis sanguíneos de anticorpo no sujeito. Em alguns métodos, a dosagem é ajustada para atingir uma concentração de anticorpo do soro no sujeito de cerca de 75 µg/mL a cerca de 125 µg/mL, 100 µg/mL a cerca de 150 µg/mL, de cerca de 125 µg/mL a cerca de 175 µg/mL, ou cerca de 150 µg/mL a cerca de 200 µg/mL. Alternativamente, os anticorpos antirrábicos podem ser administrados como uma formulação de liberação sustentada, caso em que administração menos frequente é requerida. A dosagem e a frequência

variam dependendo da meia-vida do anticorpo no sujeito. A dosagem e a frequência da administração podem variar dependendo de se o tratamento é profilático ou terapêutico. Em aplicações profiláticas, uma dosagem relativamente baixa é administrada em intervalos relativamente pouco frequentes durante um longo período de tempo. Em aplicações terapêuticas, uma dosagem relativamente alta em intervalos relativamente curtos é, às vezes, requerida até a progressão da doença ser reduzida ou terminada, ou até que o sujeito mostre melhora parcial ou completa dos sintomas da doença. Posteriormente, a patente pode ser administrada em um regime profilático.

[00136] Toxicidade. Idealmente, uma quantidade eficaz (por exemplo, dose) de anticorpos antirrábicos descritos neste documento fornecerá o benefício terapêutico sem causar toxicidade substancial ao sujeito. A toxicidade do anticorpo antirrábico descrita neste documento pode ser determinada por procedimentos farmacêuticos em culturas celulares ou animais experimentais, por exemplo, determinando a LD₅₀(a dose letal para 50% da população) ou a LD₁₀₀(a dose letal para 100% da população). A razão de dose entre o efeito terapêutico e tóxico é o índice terapêutico. Os dados obtidos a partir destes ensaios de cultura celular e estudos em animais podem ser usados na formulação de uma faixa de dosagem que é não tóxica para uso em ser humano. A dosagem do anticorpo antirrábico descrito neste documento encontra-se dentro de uma faixa de concentrações circulantes que incluem a dose eficaz com pouca ou nenhuma toxicidade. A dosagem pode variar dentro dessa faixa dependendo da forma de dosagem empregada e da via de administração utilizada. A formulação exata, via de administração e dosagem podem ser escolhidas pelo médico individual levando em consideração a condição do sujeito. Vide, por exemplo, Fingl et al., In: The Pharmacological Basis of Therapeutics, Ch. 1 (1975).

[00137] Formulações de Composições Farmacêuticas. De acordo com os métodos da presente tecnologia, o anticorpo antirrábico pode ser

incorporado em composições farmacêuticas adequadas para a administração. As composições farmacêuticas geralmente compreendem anticorpo nativo recombinante ou substancialmente purificado e um transportador farmaceuticamente aceitável em uma forma adequada para a administração de um sujeito. Carreadores farmaceuticamente aceitáveis são determinados em parte pela composição específica que está sendo administrada, bem como pelo método específico usado para administrar a composição. Nesse sentido, há uma grande variedade de formulações estáveis de composições farmacêuticas para administrar as composições de anticorpo (Vide, por exemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA 18th ed., 1990). As composições farmacêuticas são geralmente formuladas como substancialmente isotônicas, estéreis e em plena conformidade com todas as normas de Boas Práticas de Fabricação (BPF) da Administração de Drogas e Alimentos dos EUA.

[00138] Os termos "farmaceuticamente aceitável", "fisiologicamente tolerável", e variações gramaticais dos mesmos, como eles se referem a composições, transportadores, diluentes e reagentes, são usados de forma intercambiável e representam que os materiais são capazes de administração a ou em um sujeito sem a produção de efeitos fisiológicos indesejáveis em um grau que impedisse a administração da composição. Por exemplo, "excipiente farmaceuticamente aceitável" significa um excipiente que é útil na preparação de uma composição farmacêutica que é geralmente segura, não tóxica, e desejável, e inclui excipientes que são aceitáveis para uso veterinário bem como para uso farmacêutico humano. Tais excipientes podem ser sólidos, líquidos, semissólidos ou, no caso de uma composição de aerossol, gasosos. "Sais e ésteres farmaceuticamente aceitáveis" significa sais e ésteres que são farmaceuticamente aceitáveis e têm as propriedades farmacológicas desejadas. Tais sais incluem sais que podem ser formados onde prótons acídicos presentes na composição são capazes de reagir com bases

inorgânicas ou orgânicas. Sais inorgânicos adequados incluem aqueles formados com os metais alcalinos, por exemplo, sódio e potássio, magnésio, cálcio, e alumínio. Sais orgânicos adequados incluem aqueles formados com bases orgânicas, tais como bases de amina, por exemplo, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina, trometamina, N-metilglucamina, e similares. Tais sais também incluem sais de adição de ácido formados com ácidos inorgânicos (por exemplo, ácidos clorídrico e bromídrico) e ácidos orgânicos (por exemplo, ácido acético, ácido cítrico, ácido maleico, e ácidos alcano- e arenossulfônicos tais como ácido metanossulfônico e ácido benzenossulfônico). Ésteres farmaceuticamente aceitáveis incluem ésteres formados a partir de grupos carbóxi, sulfonilóxi, e fosfonóxi presentes no anticorpo antirrábico, por exemplo, C₁₋₆alquil ésteres. Quando há dois grupos acídicos presentes, um sal ou éster farmaceuticamente aceitável pode ser um mono-ácido-mono-sal ou éster ou um di-sal ou éster; e de forma similar onde há mais do que dois grupos acídicos presentes, alguns ou todos esses grupos podem ser salificados ou esterificados. O anticorpo antirrábico denominado nesta tecnologia pode estar presente em forma não salificada ou não esterificada, ou em forma salificada e/ou esterificada, e a nomeação de tal anticorpo antirrábico é destinada a incluir tanto o composto original (não salificado e não esterificado) e seus sais e ésteres farmaceuticamente aceitáveis. Além disso, determinadas modalidades da presente tecnologia podem estar presentes em mais de uma forma estereoisomérica, e a nomeação de tal anticorpo antirrábico é destinada a incluir todos os estereoisômeros únicos e todas as misturas (se racêmicas ou não) de tais estereoisômeros. Uma pessoa versada na técnica, não teria nenhuma dificuldade em determinar o momento apropriado, sequência e dosagens de administração de drogas e composições específicas da presente tecnologia.

[00139] Exemplos de tais transportadores ou diluentes incluem, mas não estão limitados a, água, solução salina, soluções de Ringer, solução de

dextrose, e albumina sérica humana a 5%. Lipossomos e veículos não aquosos tais como óleos fixos também podem ser usados. O uso de tais meios e compostos para substâncias farmaceuticamente ativas é bem-conhecido na técnica. Exceto na medida em que quaisquer meios ou composto convencionais são incompatíveis com o anticorpo antirrábico, o uso dos mesmos nas composições é contemplado. Os compostos ativos suplementares também podem ser incorporados nas composições.

[00140] A composição farmacêutica da presente tecnologia é formulada para ser compatível com sua via de administração pretendida. As composições de anticorpo antirrábico da presente tecnologia podem ser administradas por vias parenterais, tópicas, intravenosas, orais, subcutâneas, intra-arteriais, intradérmicas, transdérmicas, retais, intracranianas, intratecais, intraperitoneais, intranasais; ou intramusculares, ou como inalantes. O anticorpo antirrábico pode opcionalmente ser administrado em combinação com outros agentes que são pelo menos parcialmente eficazes no tratamento de várias doenças incluindo várias doenças relacionadas à actina ou microfilamento.

[00141] Soluções ou suspensões usadas para aplicação parenteral, intradérmica, ou subcutânea podem incluir os seguintes componentes: um diluente estéril tal como água para injeção, solução salina, óleos fixos, polietileno glicóis, glicerina, propileno glicol ou outros solventes sintéticos; compostos antibacterianos tais como álcool benzílico ou metil parabenos; antioxidantes tal como ácido ascórbico ou bissulfito de sódio; compostos quelantes tal como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA); tampões tais como acetatos, citratos ou fosfatos e compostos, para o ajuste da tonicidade, tal como cloreto de sódio ou dextrose. O pH pode ser ajustado com ácidos ou bases, tal como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A preparação parenteral pode ser colocada em ampolas, seringas descartáveis ou múltiplos frascos de dose de vidro ou plástico.

[00142] As composições farmacêuticas adequadas para uso injetável incluem soluções aquosas estéreis (onde solúveis em água) ou dispersões e pós estéreis para a preparação extemporânea de soluções ou dispersão injetáveis estéreis. Para a administração intravenosa, transportadores adequados incluem soro fisiológico, água bacteriostática, Cremophor ELTM (BASF, Parsippany, N. J.) ou solução salina tamponada com fosfato (PBS). Em todos os casos, a composição deve ser estéril e deve ser fluida à medida que existe a seringabilidade. Deve ser estável sob as condições de fabricação e armazenamento e deve ser preservado contra a ação contaminadora de micro-organismos, tais como bactérias e fungos. O transportador pode ser um solvente ou meio de dispersão contendo, por exemplo, água, etanol, poliol (por exemplo, glicerol, propileno glicol, e polietileno glicol líquido, e similares), e misturas adequadas dos mesmos. A fluidez apropriada 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 surfactantes. A prevenção da ação de micro-organismos pode ser atingida por vários compostos antibacterianos e antifúngicos, por exemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, e similares. Em muitos casos, seria desejável incluir compostos isotônicos, por exemplo, açúcares, polialcoóis tais como manitol, sorbitol, cloreto de sódio na composição. A absorção prolongada das composições injetáveis pode ser provocada ao incluir na composição um composto que retarda a absorção, por exemplo, monoestearato de alumínio e gelatina.

[00143] Soluções injetáveis estéreis podem ser preparadas ao incorporar o anticorpo antirrábico na quantidade necessária em um solvente apropriado com um ou uma combinação de ingredientes enumerados acima, conforme requerido, seguido por esterilização por filtração. Geralmente, as dispersões são preparadas ao incorporar o anticorpo antirrábico em um veículo estéril que contém um meio de dispersão básico e os outros

ingredientes necessários a partir daqueles enumerados acima. No caso de pós estéreis para a preparação de soluções injetáveis estéreis, métodos de preparação são secagem a vácuo e liofilização que produzem um pó do ingrediente ativo mais qualquer ingrediente adicional desejado a partir de uma solução previamente esterilizada por filtração dos mesmos. Os anticorpos da presente tecnologia podem ser administrados na forma de uma injeção de depósito ou preparação de implante que pode ser formulada de modo a permitir uma liberação sustentada ou pulsátil do ingrediente ativo.

[00144] As composições orais geralmente incluem um diluente inerte ou um transportador comestível. Eles podem ser colocados em cápsulas de gelatina ou comprimidos em comprimidos. Para fins de administração terapêutica oral, o anticorpo antirrábico pode ser incorporado com excipientes e usado na forma de comprimidos, pastilhas, ou cápsulas. Composições orais também podem ser preparadas usando um transportador fluido para uso como um enxaguatório bucal, em que o composto no transportador fluido é aplicado por via oral e bochechado e expectorado ou engolido. Compostos de ligação farmaceuticamente compatíveis, e/ou materiais de adjuvante podem ser incluídos como parte da composição. Os comprimidos, pílulas, cápsulas, pastilhas e similares podem conter qualquer um dos seguintes ingredientes, ou compostos de uma natureza similar: um aglutinante tal como celulose microcristalina, goma tragacanto ou gelatina; um excipiente tal como um amido ou lactose, um composto desintegrante como ácido algínico, Primogel, ou amido de milho; um lubrificante tal como estearato de magnésio ou Sterotes; um glidante tais como dióxido de silício coloidal; um composto edulcorante tais como sacarose ou sacarina; ou um composto flavorizante tais como hortelã, salicilato de metil, ou aroma de laranja.

[00145] Para a administração por inalação, o anticorpo antirrábico é distribuído na forma de um *spray* de aerossol a partir de recipiente ou distribuidor pressionado que contém um propelente adequado, por exemplo,

um gás tal como dióxido de carbono, ou um nebulizador.

[00146] A administração sistêmica pode também ser por meios transmucosais ou transdérmicos. Para a administração transmucosal ou transdérmica, penetrantes apropriados para a barreira a ser permeada são usados na formulação. Tais penetrantes são geralmente conhecidos na técnica, e incluem, por exemplo, administração transmucosal, detergentes, sais biliares, e derivados de ácido fusídico. A administração transmucosal pode ser realizada com o uso de sprays nasais ou supositórios. Para a administração transdérmica, o anticorpo antirrábico é formulado em pomadas, emplastos, géis, ou cremes como geralmente conhecidos na técnica.

[00147] O anticorpo antirrábico também pode ser preparado como composições farmacêuticas na forma de supositórios (por exemplo, com bases de supositório convencionais tais como manteiga de cacau e outros glicerídeos) ou enemas de retenção para distribuição retal.

[00148] Em uma modalidade, o anticorpo antirrábico é preparado com transportadores que protegerão o anticorpo antirrábico contra a eliminação rápida do corpo, tal como uma formulação de liberação controlada, incluindo implantes e sistemas de distribuição microencapsulada. Polímeros biodegradáveis, biocompatíveis podem ser usados, tais como acetato de vinil, polianidridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, e ácido polilático. Métodos para a preparação de tais formulações serão evidentes para aqueles versados na técnica. Os materiais também podem ser comercialmente obtidos a partir de Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Suspensões lipossomais (incluindo lipossomos direcionados a células infectadas com anticorpos monoclonais a抗ígenos virais) também podem ser usadas como transportadores farmaceuticamente aceitáveis. Estas podem ser preparadas de acordo com os métodos conhecidos por aqueles versados na técnica, por exemplo, conforme descrito na Pat. U.S. Nº 4.522.811.

C. Kits

[00149] A presente tecnologia fornece kits para o diagnóstico, profilaxia, e/ou tratamento de infecção rábica, compreendendo pelo menos um anticorpo da presente tecnologia, ou uma variante funcional do mesmo. Opcionalmente, os componentes descritos acima dos kits da presente tecnologia são embalados em recipientes adequados e rotulados para diagnóstico, profilaxia e/ou tratamento contra a raiva. Os componentes mencionados acima podem ser armazenados em recipientes de dose unitária ou múltiplas doses, por exemplo, ampolas vedadas, frascos, garrafas, seringas, e tubos de teste, como uma solução aquosa, preferencialmente estéril, ou como uma formulação liofilizada, preferencialmente estéril para a reconstituição. O kit pode ainda incluir um segundo recipiente que retém um diluente adequado para diluir a composição farmacêutica para um volume maior. Diluentes adequados incluem, mas não estão limitados, ao excipiente farmaceuticamente aceitável da composição farmacêutica e uma solução salina. Além disso, o kit pode compreender instruções para diluir a composição farmacêutica e/ou instruções para administrar a composição farmacêutica, se diluída ou não. Os recipientes podem ser formados a partir de uma variedade de materiais tal como vidro ou plástico e podem ter um orifício de acesso estéril (por exemplo, o recipiente pode ser um saco de solução intravenosa ou um frasco tendo uma rolha que pode ser perfurada por uma agulha de injeção hipodérmica). O kit pode ainda compreender mais recipientes compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável, tais como solução salina tamponada com fosfato, solução de Ringer e solução de dextrose. Além disso, pode incluir outros materiais desejáveis a partir do ponto de vista comercial e de usuário, incluindo outros tampões, diluentes, filtros, agulhas, seringas, meio de cultura para um ou mais dos hospedeiros adequados. Os kits podem opcionalmente incluir instruções habitualmente incluídas em pacotes comerciais de produtos terapêuticos, profiláticos, ou diagnósticos, que contêm informações sobre, por exemplo, as indicações, uso,

dosagem, fabricação, administração, contraindicações e/ou advertências sobre o uso de tais produtos terapêuticos, profiláticos ou diagnósticos.

[00150] Os kits são úteis para detectar a presença de uma glicoproteína rábica imunorreativa ou uma glicoproteína do tipo rábico imunorreativa em uma amostra biológica, por exemplo, qualquer fluido corporal incluindo, mas não se limitando a, por exemplo, soro, plasma, linfa, fluido cístico, urina, fezes, líquido cefalorraquidiano, fluido ascítico ou sangue e incluindo amostras de biópsia de tecido corporal. Por exemplo, o kit pode compreender: um ou mais anticorpos antirrábicos capazes de ligar uma glicoproteína rábica ou uma glicoproteína do tipo rábico em uma amostra biológica (por exemplo, um anticorpo ou fragmento de ligação ao antígeno do mesmo tendo a mesma especificidade de ligação ao antígeno dos anticorpos produzidos por uma linhagem celular depositada selecionada a partir do grupo consistindo em: CGMCC Nos de Acesso: 4805 e 4806); meios para determinar a quantidade da glicoproteína rábica ou glicoproteína do tipo rábico na amostra; e meios para comparar a quantidade da glicoproteína rábica imunorreativa ou da glicoproteína do tipo rábico imunorreativa na amostra com um padrão. Um ou mais dos anticorpos antirrábicos podem ser rotulados. Os componentes do kit, (por exemplo, reagentes) podem ser empacotados em um recipiente adequado. O kit pode ainda compreender instruções para usar o kit para detectar a glicoproteína rábica ou a glicoproteína do tipo rábico imunorreativa.

[00151] Para kits baseados em anticorpos, o kit pode compreender, por exemplo, 1) um primeiro anticorpo, por exemplo, ligado a um suporte sólido, que se liga a uma glicoproteína rábica correspondendo à presente tecnologia; e, opcionalmente, 2) um segundo anticorpo diferente que se liga também à glicoproteína rábica ou ao primeiro anticorpo e é conjugado com um rótulo detectável.

[00152] O kit também pode compreender, por exemplo, um agente tamponante, um conservante ou um agente estabilizante de proteína. O kit

pode ainda compreender componentes necessários para detectar o rótulo detectável, por exemplo, uma enzima ou um substrato. O kit pode também conter uma amostra de controle ou uma série de amostras de controle, que podem ser analisadas e comparadas com a amostra de teste. Cada componente do kit pode ser colocado dentro de um recipiente individual e todos os vários recipientes podem estar dentro de um único pacote, juntamente com instruções para a interpretação dos resultados dos ensaios realizados usando o kit. Os kits da presente tecnologia podem conter um produto escrito em ou no recipiente do kit. O produto escrito descreve como usar os reagentes contidos no kit, por exemplo, para a detecção de uma glicoproteína do vírus rábico *in vitro* ou *in vivo*, ou para o tratamento ou prevenção de infecção rábica em uma pessoa em necessidade disso. Em diversas modalidades, o uso dos reagentes pode ser de acordo com os métodos da presente tecnologia.

EXEMPLOS

[00153] Os seguintes exemplos são apresentados no intuito de ilustrar mais completamente as modalidades selecionadas da presente tecnologia. Estes exemplos não devem de forma alguma ser interpretados como limitando o escopo da presente tecnologia, conforme definido pelas reivindicações acrescentadas.

[00154] Os seguintes exemplos demonstram a preparação, caracterização, e uso de anticorpos antirrábicos ilustrativos da presente tecnologia. O exemplo 1 descreve a preparação de anticorpos monoclonais murinos. Os exemplos 2-7 demonstram a especificidade dos anticorpos ilustrativos para a glicoproteína do vírus rábico, a capacidade dos anticorpos para neutralizar o vírus rábico, a competição entre os anticorpos para a ligação da glicoproteína do vírus rábico, o grau ao qual os anticorpos afetam a imunogenicidade de uma vacina rábica e a capacidade de uma combinação dos anticorpos para neutralizar o vírus rábico.

[00155] Os exemplos 8-15 demonstram a produção de versões

químéricas e humanizadas de dois dos anticorpos ilustrativos, e caracterização de suas especificidades de ligação, capacidades de neutralizar o vírus rábico, e uso na proteção pós-exposição contra a infecção pelo vírus rábico.

Exemplo 1 - Preparação e Caracterização de Anticorpos Murinos Neutralizantes de Vírus Rábico

[00156] Os anticorpos murinos neutralizantes do vírus rábico podem ser obtidos pelo cultivo de um hibridoma que, por sua vez, pode ser obtido imunizando um camundongo com glicoproteína rábica e posteriormente fundindo as células do baço ou células do linfonodo do camundongo com células de mieloma de camundongo. O procedimento para a preparação dos anticorpos antirrábicos é detalhado abaixo tendo como referência as etapas descritas acima. Esse método para a preparação de um anticorpo da presente invenção é destinado apenas a ser ilustrativo dos métodos de preparação e não é limitado aos mesmos. Outros procedimentos conhecidos podem ser seguidos.

[00157] A presente tecnologia utiliza uma glicoproteína do vírus rábico (Nº de Acesso GenBank ABY1950) como um imunógeno para induzir um anticorpo capaz de neutralizar o vírus rábico. O imunógeno preparado é misturado com um adjuvante, tal como adjuvante completo ou incompleto de Freund e administrado a um camundongo. Vias de administração adequadas para imunizar um animal experimental incluem as injeções subcutâneas, intraperitoneais, intravenosas, intradérmicas, e intramusculares, com injeções subcutâneas e intraperitoneais sendo preferidas. Imunizações são, opcionalmente, executadas por uma única dose ou, por várias doses repetidas em intervalos apropriados. A produção de anticorpos de animais imunizados é determinada pelos níveis séricos de um anticorpo antígeno-específico. Quando altos títulos de anticorpo são atingidos, animais podem ser usados como uma fonte para a preparação de células produtoras de anticorpos. Em geral, as células produtoras de anticorpos podem ser colhidas em 3-5 dias

após a última injeção com um imunógeno.

[00158] Linfócitos e células plasmáticas obtidos a partir de qualquer parte adequada do animal são células precursoras para produzir o anticorpo. Fontes de célula do plasma ou linfócito incluem baço, gânglios linfáticos, sangue periférico, ou qualquer combinação apropriada dos mesmos, com células do baço sendo a fonte mais comum. Após a última injeção de reforço, a suspensão de linfócitos simples é preparada a partir de tecido linfoide, em que as células produtoras de anticorpos estão presentes. A técnica de fusão inclui lavagem de células do baço e mieloma com meio livre de soro (tal como RPMI 1640) ou solução salina tamponada com fosfato (adiante designada como "PBS") de modo que a razão de número de células de baço para células de mieloma seja aproximadamente entre 5: 1 e 10: 1, e então centrifugadas. Após o sobrenadante ter sido descartado e as células peletizadas suficientemente soltas, 1 ml de meio livre de soro contendo 50%(p/v) de polietileno glicol (p.m. de 1.000 a 4.000) é adicionado gota a gota com mistura. Posteriormente, 10 ml de meio livre de soro são adicionados lentamente e então centrifugados. O sobrenadante é descartado novamente, e as células peletizadas são suspensas em uma quantidade apropriada do meio HAT contendo uma solução de hipoxantina, aminopterina e timidina (adiante referida como "HAT").

[00159] As células de linhagens celulares de camundongo estabelecidas servem como a fonte de células de mieloma para a fusão, incluindo P3X63Ag8U.1 (P3-U1), P3/NSI/1-Ag4-1(NS-1). SP2/0-Ag14 (SP-2), P3X63Ag8.653 e P3X63 Ag8 (X63), que foram adquiridos a partir de ATCC. A linhagem celular selecionada é transferida em série para um meio apropriado, tal como o meio de 8-azaguanina. O meio de 8-azaguanina inclui Meio de Dulbecco Modificado por Iscove (adiante referido como "IMDM") ou Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (adiante referido como "DMEM"). O meio RPMI-1640 suplementado com glutamina, 2-

mercaptoetanol, gentamicina, soro de bezerro fetal (adiante designado "FCS"), e 8-azaguanina.

[00160] Após a fusão, quaisquer células de mieloma não fundidas e quaisquer fusões de mieloma-mieloma são incapazes de sobreviver no meio HAT. Por outro lado, fusões de células produtoras de anticorpo unidas com as outras, bem como hibridomas de células produtoras de anticorpo com células de mieloma podem sobreviver, o anterior tendo apenas uma vida limitada. Nesse sentido, a incubação continuada em meio HAT resulta na seleção de apenas os hibridomas desejados. Os hibridomas resultantes crescem em colônias que são então transferidas para o meio HAT sem aminopterina (meio HT). Posteriormente, alíquotas do sobrenadante de cultura são removidas para determinar o título do anticorpo por, por exemplo, ELISA. Os hibridomas que foram mostrados para produzir anticorpos específicos são então transferidos para outra placa para clonagem.

[00161] Os hibridomas camundongo-camundongo RV3D11E31 A9 e RV7G11 A32G11, que são uma base para anticorpos da presente tecnologia, foram depositados com CGMCC em 12 de maio de 2011, e têm os números de acesso CGMCC 4805 e 4806, respectivamente.

[00162] Após a obtenção de hibridoma produtor de anticorpo estável, a cultura do hibridoma selecionado pode ser expandida. O sobrenadante da cultura em larga escala é então colhido e purificado por um método adequado, tais como cromatografia de afinidade e filtração em gel. O hibridoma também pode ser crescido intraperitonealmente em um camundongo singêntico, tal como um camundongo BALB/c ou um camundongo nu/nu, para obter ascite contendo um anticorpo monoclonal antirrábico em grandes quantidades.

Exemplo 2 - Atividade de ligação de Anticorpos Murino Neutralizantes de Vírus Rábico

[00163] A atividade de ligação de cinco anticorpos neutralizantes de vírus rábico (RVNAs) para a glicoproteína RV de vírus rábico foi estudada

neste Exemplo. Os RVNAs murinos e outros materiais biológicos usados nos Exemplos 1-6 são mostrados na tabela 3. Os animais usados nestes estudos incluíam camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas, pesando 20 a 30 gramas, grau de SPF e hamsters sírios, 2-3 meses, pesando 100 gramas, grau de SPF.

Tabela 3. Biorreagentes

Categoría	Nome	Con. (mg/ml)	Fabricante
Anticorpo Antirrábico	3D11E3	2,15	Vide Exemplo 1
Anticorpo Antirrábico	3H10D3	0,88	Vide Exemplo 1
Anticorpo Antirrábico	5A1C10	1,38	Vide Exemplo 1
Anticorpo Antirrábico	6F11C1	2,45	Vide Exemplo 1
Anticorpo Antirrábico	7G11A3	2,62	Vide Exemplo 1
Anticorpo Secundário	IgG2a-HRP anticamundongo de cabra	-	Southernbiotech
Anticorpo Secundário	IgG2b-HRP anticamundongo de cabra	-	Southernbiotech
Anticorpo Secundário	Ig(H+L)-HRP anticamundongo de cabra	-	Southernbiotech
Globulina Rábica	Globulina imune rábica humana	100 IU/ml	Shuanglin Pharmaceutical
Vacina Rábica	Vacina Rábica	-	Rabipur®, Chiron Behring

[00164] Curvas de ligação dos cinco RVNAs para glicoproteína RV, conforme determinado pelo imunoensaio de enzima de quimioluminescência indireta (CLEIA) são mostradas na figura 1. A glicoproteína foi diluída para 1:500 em PBS e então revestiu a microplaca. Cinco clones de RVNA foram diluídos para 10000, 2000, 400, 80, 16, 3,2 e 0,64 ng/mL, respectivamente. IgG2a-FIRP anticamundongo de cabra e IgG2b-FIRP anticamundongo de cabra foram usados como o anticorpo secundário conjugado com a enzima. Unidade de luminescência relativa (RLU) representa o sinal de quimioluminescência.

[00165] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia se ligam especificamente à glicoproteína do vírus rábico, e que são úteis em métodos relacionados à essa ligação específica, incluindo métodos para detectar a glicoproteína do vírus rábico em uma amostra, ou tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade dos mesmos e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra a infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 3 - Potência Neutralizante de RVNAs Murinos e Caracterização de Epítopo

[00166] A potência neutralizante *in vitro* dos cinco RVNAs e do epítopo neutralizante reconhecido pelos RVNAs foi determinada conforme descrito neste documento. Para preparar o vírus CVS-11, monocamadas de células de neuroblastoma foram infectadas com o vírus desafio padrão-11 (CVS-11) ou outros vírus em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,3 por 15 min a 37°C/0,5% de CO₂. A inoculação do vírus foi então removida, o meio fresco foi adicionado às células, e a incubação foi continuada por 40 h a 37°C/0,5% de CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80°C até o uso posterior.

[00167] Testes rápidos de inibição de foco fluorescente padrão (RFFITs) para neutralização foram executados como descrito anteriormente em Smith et al. (A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody. In: Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H, eds. Laboratory techniques in rabies. 4th ed. Geneva, Switzerland: World Health Organization 1996; 181-192). Para determinar a potência neutralizante de cada RVNA, seus títulos neutralizantes de 50% foram comparados com o título neutralizante de 50% do padrão (GB padrão), que foi definido como 21,4 IU/mL. Os resultados do teste RFFIT usando o vírus rábico CVS-11 são mostrados na tabela 4.

Tabela 4. Potência neutralizante <i>in vitro</i> de RVNAs		
No.	Clone	Potência Neutralizante
1	3D11E3	3676
2	3H10D3	3101
3	5A1C10	2110
4	6F11C1	4244
5	7G11A3	701

[00168] Para identificar as características do epítopo de glicoproteína que foi reconhecido por 3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 e 7G11A3, análise de Western e CLEIA foram realizados. Para o *Western Blot*, as glicoproteínas reduzidas e não-reduzidas foram separadas por eletroforese

SDS-PAGE, e examinadas com os cinco RVNAs (figura 2). Para os RVNAs, 1 µg/mL do anticorpo foi usado. O anticorpo secundário era Ig(H+L)-HRP anticamundongo de cabra, diluído 1: 2000. Verificou-se que a glicoproteína do vírus rábico pode ser reconhecida por todos os 5 RVNAs sob condição de não-redução. No entanto, apenas 3D11E3, 3H10D3 e 5A1C10 podem reconhecer a glicoproteína reduzida. Os resultados confirmaram que o epítopo reconhecido por 3D11E3, 3H10D3 ou 5A1C10 era um epítopo linear enquanto o epítopo reconhecido por 6F11C1 ou 7G11A3 era um epítopo conformacional.

[00169] Os cinco RVNAs se ligam à glicoproteína do vírus rábico (RVGP) que foi tratada com diferentes tampões. A glicoproteína foi dissolvida em tampão de carbonato (CB), tampão de carbonato incluindo 0,1% dodecil sulfato de sódio (CB + 0,1% pes/vol de SDS) e tampão de carbonato incluindo 0,1% dodecil sulfato de sódio e 0,1% de β-Mercaptoetanol (CB + 0,1% de pes/vol de SDS + β-ME), respectivamente e então revestiu a microplaca. Os cinco RVNAs foram diluídos para 10000, 2000, 400, 80, 16, 3,2 e 0,64 ng/mL e então reagidos com a RVGP. IgG2a-HRP anticamundongo de cabra e IgG2b-HRP anticamundongo de cabra diluídos 1:2000 foram usados como o conjugado de enzima de anticorpo secundário. O sinal de quimioluminescência (RLU) é mostrado nas figuras 3A-E. Os resultados indicam que o epítopo que foi reconhecido por 6F11C1 ou 7G11A3 era mais sensível a SDS do que o reconhecido por 3D11E3, 3H10D3 ou 5A1C10. Assim, os resultados obtidos a partir dos dois métodos foram consistentes entre si em que 3D11E3, 3H10D3 e 5A1C10 reconheceram epítopos lineares e 6F11C1 e 7G11A3 reconheceram epítopos conformacionais.

[00170] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico, e que são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico, incluindo

métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra o vírus rábico a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 4 - Amplitude de neutralização contra um painel de vírus rábico

[00171] Para analisar a amplitude de neutralização, a cobertura de cinco RVNAs (3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 e 7G11A3) contra um painel representativo de 10 vírus rábicos de rua (RVs) foram determinados pelo teste de neutralização de camundongo (MNT) (Vide, Hasse, et al., 13(2) J. Biol. Stand. 123-28 (1985). Os resultados foram mostrados nas figuras 4I-J e resumidos na tabela 5. Todos os RVNAs produziram proteção neutralizante contra a maioria dos RVs. Embora uma pequena minoria de sujeitos no grupo experimental tenha morrido, a morte ocorreu pelo menos 2 dias depois do grupo de controle (figura 4). Em geral, os resultados indicaram que todos os cinco RVNAs podem potencialmente neutralizar o painel inteiro de RVs.

Tabela 5. Largura da neutralização contra os vírus rábicos de rua

Lyssavirus	6F11C1	3H10D3	5A1C10	7G11A3	3D11E3	Controle
Cão , BD06, Hebei	★	★	7/8	6/8	4/8	0/8
Cão , GN07, Guangdong	★	★	★	7/8	7/8	0/8
Cão , ZJ-HZ09, Zhejiang	★	★	6/8	7/8	6/8	0/8
Cão , SC-CD09, Sichuan	★	★	★	★	★	0/8
Ferret Badger, ZJ-LA, Zhejiang	★	★	★	★	7/8	0/8
Ferret Badger, JX08-45, Jiangxi	★	★	7/8	★	★	0/8
Ferret Badger, JX09-27, Jiangxi	★	7/8	★	★	★	0/8
Humano, HN35, Hunan	7/8	★	★	★	★	0/8
Humano, YN1, Yunnan	7/8	7/8	★	7/8	7/8	0/8
Veado , DRV, Jilin	★	★	★	★	7/8	0/8

Os dados refletem sobrevivência de sujeitos 20 dias após a inoculação com vírus rábico;

O numerador indica o número de sujeitos sobreviventes em cada grupo;

Estrela (★) indica sobrevivência de todos os 8 sujeitos no grupo

[00172] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico, e que são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra o vírus rábico a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 5 - Competição entre anticorpos neutralizantes antirrábicos

[00173] Para investigar se os anticorpos 3D11E3, 3H10D3, 5A1C10, 6F11C1 e 7G11A3 competem uns com os outros para ligação à glicoproteína do vírus rábico, um conjunto de experimentos de competição foi executado usando CLEIA (figuras 5A-O). Brevemente, uma microplaca de 96 poços foi revestida com glicoproteína do vírus rábico diluída a 1:500 em PBS. Cinquenta microlitros (50 µL) de anticorpo antirrábico diluído e 50 µL mAb-HRP antirrábico foram adicionados a cada poço e incubados a 37°C por 1 hora. Após a incubação, a placa foi lavada com solução de lavagem e 50 µL de solução de substrato de quimioluminescência mista foram adicionados. A placa foi mantida em um ambiente escuro por 3 minutos e em seguida a intensidade de quimioluminescência foi medida.

[00174] A RLU do poço que não tinha nenhum mAb antirrábico e tinha apenas conjugado de mAb-HRP antirrábico foi definida como B0. A RLU dos outros poços que tinha tanto mAb antirrábico e conjugado de mAb-HRP antirrábico foi definida como B. A taxa de ligação foi obtida dividindo BO por B. O anticorpo não-específico não bloqueia a ligação de cinco RVNAs rotulados por HRP (figuras 5C, F, I, L, O), assim servindo como o controle negativo. Quanto mais baixa a taxa de ligação for, maior será a competição do RVNA com o RVNA rotulado por FIRP. Os resultados mostraram que 7G11A3 não afetou substancialmente a ligação de 3D11A3-HRP (figuras 5A, B, C), 3H10D3-HRP (figuras 5D, E, F), 5A1C10-HRP (figuras 5G, H, I) ou 6F11C1-HRP (figuras 5J, K, L) para a glicoproteína. A competição de 3H10D3 ou 3D11E3 foi menor em comparação com a dos outros três RVNAs para a ligação de 7G11A3-HRP para RVGP (figuras 5M, N, O). De modo geral, a competição entre 3D11E3, 3H10D3, e 7G11A3 foi relativamente menor em comparação com os outros resíduos. Nesta base, 3D11E3, 3H10D3, e 7G11A3 foram selecionados por experimentos adicionais.

Exemplo 6 - Imunogenicidade da vacina em hamsters sírios não-

desafiados tratados com 3D11E3, 3H10D3, 7G11A3, ou Imunoglobulina do Vírus Rábico Humano

[00175] Durante a profilaxia pós-exposição (PEP), existe a possibilidade de que a administração simultânea de RVNAs e vacina diminua a capacidade da vacina para induzir os níveis limite de anticorpos de neutralização necessários para a proteção. Portanto, é importante avaliar o grau de interferência do tratamento de mAb na vacinação. Para determinar o efeito do RVNA na potência da vacina, um experimento em animal *in vivo* foi executado na ausência de RV (figura 6). Para PEP, camundongos BALB/c foram administrados com 50 µg/dose de RVNA mais a vacina ou 20 IU/kg de imunoglobulina rábica humana (HRIG) mais a vacina. Camundongos de controle foram administrados com vacinas apenas. Havia 6 camundongos em cada grupo experimental. Nos dias 1, 3, 7, 14 e 28, o sangue foi coletado da órbita. Pares de amostras foram agrupados em cada grupo, rendendo um total de três amostras de soro replicadas para cada condição. Títulos de RVNA foram medidos 1, 3, 7, 14, e 28 dias pós-tratamento. Os resultados são resumidos na figura 6.

[00176] Nos dias 1 e 3, os títulos de RVNA do soro foram elevados em camundongos que receberam 50 µg/dose de RVNA (figuras 6A-C). Os títulos foram menores em sujeitos administrados com 20 IU/kg de HRIG juntamente com a vacina, mas ainda estavam dentro do requerimento de WHO de >0,5 IU/mL (figura 6D). Os títulos não foram detectados em sujeitos administrados apenas com vacina (figura 6E). Os títulos de RVNA em camundongos que receberam 50 µg/dose de 7G11A3 (figura 6A) ou 50 µg/dose de 3D11E3 (figura 6B) permaneceram altos durante o período do dia 7-28, e foram mais altos do que ou equivalentes aos dos sujeitos administrados apenas com vacina (figura 6E). No entanto, os títulos de RVNA em camundongos que receberam 50 µg/dose de 3H10D3 diminuíram bastante do dia 7 ao dia 28 (figura 6C). Este resultado indicou que 7G11A3 e 3D11E3 não interferem na

capacidade da vacina de induzir a produção de um anticorpo neutralizante, e 3H10D3 reduz a eficácia da vacina.

[00177] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico sem reduzir a imunogenicidade de uma vacina rábica. Como tais, eles são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico em conjunto com a administração de uma vacina rábica, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra a infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 7 - Desempenho neutralizante *in vivo* de coquetel de mAbs antirrábicos em comparação com HRIG policlonal

[00178] Para avaliar o desempenho neutralizante *in vivo* de um coquetel de 3D11E3/7G11A3, um estudo de hamster sírio foi realizado. Os hamsters ($n = 10$ por grupo) foram infectados com RV de rua de cão (BD06) no dia 1. Os animais foram vacinados com a vacina rábica (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha), vacina de célula diploide humana (HDCV; Imovax®, Sanofi Pasteur, Swiftwater, PA, EUA) no dia 0 e então tratados com coquetel de 3D11E3/7G11A3 consistindo em quantidades iguais de 3D11E3 e 7G11A3 (0,5 mg/kg) ou 20 IU/kg de globulina imune rábica humana (Shuanglin Pharmaceutical) com 24 horas ou 72 horas de declínio, administrados no sítio de inoculação do vírus (isto é, gastrocnêmio direito). Doses adicionais de vacina foram administradas no músculo gastrocnêmio esquerdo nos dias 3, 7, 14, e 28. Os grupos de controle receberam vacina sozinha ou foram não tratados. Os hamsters foram examinados diariamente, e se eles mostrassem sinais clínicos de infecção rábica eles seriam sacrificados. Os sinais clínicos da raiva incluem: letargia, febre, vômitos, e anorexia. Os sinais progrediram dentro dos dias para disfunção cerebral, disfunção dos nervos cranianos, ataxia, fraqueza, paralisia, convulsões, dificuldade em respirar, dificuldade de deglutição, salivação

excessiva, comportamento anormal, agressividade, e/ou automutilação. Os resultados são resumidos na figura 7.

[00179] O grupo de controle negativo não tratado teve uma taxa de sobrevivência de 10%, indicando que a infecção viral foi eficaz. Com a decadência de 24 horas, os sujeitos administrados com vacina junto com o coquetel de 3D11E3/7G11A3 exibiram uma taxa de sobrevivência de 90% (9/10), e aqueles administrados com a vacina junto com HRIG exibiram uma taxa de sobrevivência de 80% (8/10). Por outro lado, com um declínio de 72 horas, os sujeitos administrados com vacina juntamente com o coquetel de 3D11E3/7G11A3 e HRIG caíram para 50% (5/10) e 20% (2/10), respectivamente.

[00180] Estes resultados mostram que uma combinação de anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico, e que são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 8 - Geração de Anticorpos 3D11E3-1A9 Quiméricos e Humanizados

[00181] Este exemplo descreve a preparação das formas quiméricas e humanizadas do anticorpo 3D11E3-1A9 descrito nos exemplos 2-7 acima.

[00182] Clonagem e sequenciamento de genes de região variável 1A9 de camundongo. Células de hibridoma de CT.RV 3D11E3 1 A9 de camundongo (referidas como "1 A9" neste Exemplo) foram cultivadas em Hibridoma-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo 12% de soro bovino fetal (FBS; HyClone, Logan, UT) a 37°C em uma incubadora com CO₂ a 7,5%. O RNA total foi extraído de aproximadamente 10⁷ células de hibridoma usando o reagente TRIzol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor. cDNA iniciado por Oligo dT para 5'-RACE foi sintetizado usando

o Kit de Amplificação de cDNA SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA), seguindo o protocolo do fornecedor. Os cDNAs de região variável para cadeias leves e pesadas de 1A9 foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com DNA polimerase Phusion (New England Biolabs, Beverly, MA) usando iniciadores 3' que recozem respectivamente para as regiões constantes gama-2a e kappa do camundongo e o iniciador 5'-RACE (Universal Primer A Mix ou Nested Universal Primer A) fornecido no Kit de amplificação de cDNA SMARTer RACE. Para a amplificação por PCR da região variável de cadeia pesada (V_H), foram usados dois iniciadores 3'. Eles têm a sequência 5'-GCC AGTGGAT AGACCGATGG-3' (SEQ ID NO: 1) e 5'-AC AGTC ACTGAGCTGC-3' (SEQ ID NO: 2). Para amplificação por PCR da região variável de cadeia leve (V_L), o iniciador 3' tem a sequência 5'-GATGGAT AC AGTTGGTGC AGC-3' (SEQ ID NO: 3). Os cDNAs de V_H e V_L amplificados foram clonados no vetor pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) para determinação da sequência. O sequenciamento de DNA foi realizado em Tocore (Menlo Park, CA). Vários clones de cadeias leve e pesada foram sequenciados e sequências homólogas exclusivas para regiões variáveis de cadeias leve e pesada de camundongo típicas foram identificadas. Nenhuma característica incomum foi observada nas sequências de aminoácidos de V_H e V_L de 1A49 maduras.

[00183] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 4) do cDNA da V_H de 1A9 de camundongo é mostrada na tabela 6, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 5). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (E) da V_H madura é sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No.91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) são sublinhadas.

Tabela 6. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 4) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 5) de cDNA da V_H de 1A9 Murino

ATGGGAGGGATCTGGATCTTCTCTTCCTCTGTCAAGGA	ACTGCAGGTGCCCACTCTGAG	M	G	G	I
<u>W I F L F L L S G T A G A H S E</u>					
ATCCAGCTGCAGCAGACTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGCTTCACTGAAGATATCC	I	Q	L	Q	
<u>Q T G P E L V K P G A S V K I S</u>					
TGCAAGGCTCTGGTTATTCACTGACTACATCATGCTCTGGGTGAAGCAGAGCCAT	C	K	A	S	
<u>G Y S F T D Y I M L W V K Q S H</u>					
GGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTATCCTTACTATGGTAGTACTAGCTACAAT	G	K	S	L	
<u>E W I G D I Y P Y Y G S T S Y N</u>					
CTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAATCTTCCAGCACAGCCTACATG	L	K	F	K	
<u>G K A T L T V D K S S S T A Y M</u>					
CAGCTAACAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGGCAGGGCGGG	Q	L	N	S	
<u>L T S E D S A V Y Y C A R Q G G</u>					
GATGGTAACTACGTCTCTTGACTACTGGGCCAAGGCACCACTCACAGTCTCCTCA					
<u>D G N Y V L F D Y W G Q G T T L T V S S</u>					

[00184] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 6) do cDNA da V_L de 1A9 de camundongo é mostrada na tabela 7, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 7). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (D) da V_L madura é sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) são sublinhadas.

Tabela 7. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 6) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 7) de cDNA da V_L de 1A9 Murino

ATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTGATACATGTTGCTGTGGTTGTTGATGGA	M	E	S	Q
<u>T Q V F V Y M L L W L S G V D G</u>				
GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCACTGTCCACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGC	<u>D</u>	I	V	M
<u>T Q S Q K F M S T S V G D R V S</u>				
GTCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGTTGCCTGGTATCAACAGAAACCA	V	T	C	<u>K</u>
<u>A S Q N V G T T V A W Y Q Q K P</u>				
GGACAATCTCCTAAAGCACTGATTTACTCGGCATCCTACCGGTACAGTGGAGTCCCTGAT	G	Q	S	P
<u>K A L I Y S A S Y R Y S G V P D</u>				
CGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGCAATGTGCAGTCT	R	F	T	G
<u>S G S G T D F T L T I S N V Q S</u>				
GAAGACTTGGCAGAATATTCTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATTACGTTGGCTCG	E	D	L	A
<u>E Y F C Q Q Y N S Y P F T F G S</u>				
GGGACAAAGTTGAAATAAAA				
<u>G T K L E I K</u>				

[00185] Construção do anticorpo IgGl/κ de 1A9 quimérico. Um gene que codifica a V_H de 1A9 foi gerado como um éxon incluindo um sinal doador de *splice* e apropriado flanqueando sítios de enzima de restrição por PCR usando CDNA da V_H de 1A9 como um modelo, 5'-GC AACTAGTACC ACC ATGGGAGGGATCTGGATC-3' (SEQ ID NO: 8) (sítio de Spel está sublinhado) como um iniciador 5', e 5'-GGGAAGCTTGTAAAGGACTCA CCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3' (SEQ ID NO: 9) (sítio de

Hindlll é sublinhado) como um iniciador 3'. A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 10) do gene da V_H de Ch1A9 projetado flanqueado pelos sítios de Spel e Hindlll (sublinhados) é mostrada na tabela 8 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 11). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (E) da V_H madura é sublinhada duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 8. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 10) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 11) de cDNA da V_H de 1A9 Quimérico

ACTAGTACCACCATGGGAGGGATCTGGATCTTCTCTTCCTGTCAAGGAAC	TCAGGT
M G G I W I F L F L L S G T A G	
GCCCACACTGAGATCCAGCTGCAGCAGACTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTC	A
A H S E I Q L Q Q T G P E L V K P G A S	
GTGAAGATATCTGCAAGGCTCTGGTTATTCACTGACTACATCATGCTCTGGGTG	V
V K I S C K A S G Y S F T D Y I M L W V	A
AAGCAGAGCCATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTATCCTTACTATGGTAGT	K
K Q S H G K S L E W I G D I Y P Y Y G S	
ACTAGCTACAATCTGAAGTCAAGGCCAACATTGACTGTAGACAAATCTTCCAGC	T
T S Y N L K F K G K A T L T V D K S S S	S
ACAGCCTACATGCAGCTAACAGTCTGACATCTGAGGACTCTGCAGCTATTACTGTGCA	A
T A Y M Q L N S L T S E D S A V Y Y C A	
AGGCAGGGCGGGATGGTAACACGTCCTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTC	R
R Q G G D G N Y V L F D Y W G Q G T T L	
ACAGTCTCCTCAGGTGAGTCCTTAAACAAGCTT	T
T V S S	

[00186] Da mesma forma, um gene que codifica a V_L de Ch1A9 foi gerado como um éxon incluindo um sinal doador de *splice* apropriado flanqueando os sítios de enzima de restrição por PCR usando cDNA da V_L de Ch1A9 como um modelo, 5'-GCTGCTAGCACCAACCACATGGAGTCACAG ACTCAG-3' (SEQ ID NO: 12) (sítio de Nhel está sublinhado) como um iniciador 5', e 5'-GGGAAATTGCAAAAGTCTACTACGTTTATT CCAACTTGTCCCCGA-3' (SEQ ID NO: 13) (sítio de EcoRI está sublinhado) como um iniciador 3'.

[00187] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 14) do gene da V_L de Ch1A9 projetado flanqueado pelos sítios de Nhel e EcoRI (sublinhados) é mostrada na tabela 9 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 15). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de

aminoácido de terminal N (D) da V_L madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 9. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 14) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 15) de cDNA da V_L de 1A9 Quimérico

GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTGTATACATGTTGCTGTGGTTGTCT
<i>M E S Q T Q V F V Y M L L W L S</i>
GGTGTGATGGAGACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTATGTCACATCAGTAGGA
<i>G V D G D I V M T Q S Q K F M S T S V G</i>
GACAGGGTCAGCGTCACCTGCAGGCCAGTCAGAAATGTGGGTACTACTGTTGCCCTGGTAT
<i>D R V S V T C K A S Q N V G T T V A W Y</i>
CAACAGAAACCAGGACAATCTCTAAAGCACTGATTACTCGGCATCCTACCGGTACAGT
<i>Q Q K P G Q S P K A L I Y S A S Y R Y S</i>
GGAGTCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGACAGATTCACTCTCACCATCAGC
<i>G V P D R F T G S G S G T D F T L T I S</i>
AATGTGCAGTCTGAAGACTGGCAGAATATTCCTGTCAGCAATAACAGCTATCCATT
<i>N V Q S E D L A E Y F C Q Q Y N S Y P F</i>
ACGTTGGCTCGGGACAAAGTTGGAAATAAACGTAAGTAGACTTTGCGAATT
<i>T F G S G T K L E I K</i>

[00188] Os sinais doadores de *splice* dos exons de V_H e V_L de Ch1A9 eram derivados das sequências JH2 e JK4 da linhagem germinativa de camundongo, respectivamente. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com gel usando Kit de Extração II NucleoSpin (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) e clonados no vetor de pCR4Blunt-TOPO para confirmação de sequência. Os fragmentos V corretos foram digeridos com Spel e HindIII (para V_H) ou NheI e EcoRI (para V_L), purificados com gel e clonados em um vetor de expressão de mamíferos transportando regiões constantes gama-1 e kappa humanas para a produção do anticorpo quimérico Ch1A9 IgG1/κ. A estrutura esquemática do vetor de expressão resultante, pCh1A9, é mostrada na figura 8.

[00189] Projeto de genes de V_H e V_L de 1A9 humanizados. As sequências de CDR juntamente com resíduos de aminoácidos de *framework* importantes para manter a estrutura de CDR foram enxertadas a partir de V_H e V_L de 1A9 nas sequências *framework* humanas selecionadas correspondentes. As sequências de VH humanas homólogas às estruturas da V_H de 1A9 foram buscadas dentro do banco de dados do GenBank, e a sequência de V_H codificada pelo cDNA de DA980102 humano (DA980102 V_H) (número de

acesso GenBank; Kimura et al, Genome Res. 16:55-65, 2006) foi escolhida como um aceitador para humanização. As sequências de CDR da V_H de 1A9 foram primeiramente transferidas para as posições correspondentes de DA980102 V_H .

[00190] Com base na pesquisa de homologia com as sequências *framework* da V_L de 1A9, a região VK humana codificada pelo CB958542 do cDNA (CB958542 V_L) (número de acesso GenBank; NIH-MGC EST Sequencing Project, 1999) foi escolhida como um aceitador para humanização. As sequências de CDR da V_L de 1A9 foram primeiramente transferidas para as posições correspondentes de CB958542 V_L . Em seguida, na posição *framework* 46, um resíduo de aminoácido do camundongo da V_L de 1A9 foi substituído pelo resíduo humano correspondente. Embora Ala na posição 46 no camundongo da V_L de 1A9 seja localizada em uma posição *framework* importante para a formação da estrutura de CDR, a análise detalhada das regiões variáveis de 1A9 em que um resíduo de aminoácido na posição 46 na VL1 de Hu1A9 poderia ser substituído pelo resíduo correspondente humano, Val, em CB958542 VL sem perder a afinidade de ligação ao antígeno. A fim de reduzir ainda mais a imunogenicidade potencial do anticorpo 1A9 humanizado, uma segunda V_L humanizada (V_L2 de Hu1A9), em que Ala na posição 46 na V_L1 de Hu1A9 foi substituída por Val.

[00191] Construção dos genes de V_H e V_L de 1A9 humanizados. Um gene que codifica da V_H de Hu1A9 foi projetado como um éxon incluindo um peptídeo sinal, um sinal doador de *splice* e sítios de enzima de restrição apropriados para posterior clonagem em um vetor de expressão dos mamíferos. O sinal doador de *splice* do éxon de Hu1A9 foi derivado da sequência JH1 da linhagem germinativa humana. Uma vez que o peptídeo sinal codificado pelo gene da V_H de 1A9 do camundongo foi previsto como sendo subideal para a clivagem precisa pelo software de previsão de peptídeo sinal SIG-Pred, a sequência de peptídeo sinal do gene DA980102 V_H humano

foi usada na V_H de Hu1A9.

[00192] Cada um dos genes que codifica V_{L1} e V_{L2} de Hu1A9 foi projetado como um éxon incluindo um peptídeo sinal, um sinal doador de *splice*, e sítios de enzima de restrição apropriados para posterior clonagem em um vetor de expressão dos mamíferos. O sinal doador de *splice* dos éxons foi derivado da sequência JK2 da linhagem germinativa humana. A sequência de peptídeo sinal em cada um dos éxons das V_{L1} e V_{L2} de Hu1A9 humanizado foi derivada da sequência da V_L de 1A9 do camundongo correspondente.

[00193] Os genes das V_H e V_L de Hu1A9 foram construídos por GenScript USA (Piscataway, NJ). Após a digestão com Spel e Hindlll (para V_H) ou Nhel e EcoRI (para V_L), os genes das V_H e V_L de Hu1A9 foram subclonados em sítios correspondentes em um vetor de expressão de mamíferos para a produção na forma de IgGI/κ humana. O vetor de expressão resultante, pHu1A9-1, expressa um anticorpo humanizado contendo as regiões V_H e V_{L1} de Hu1A9 (Hu1A9-1). Da mesma forma, pHu1A9-2 expressa um anticorpo humanizado contendo V_H e V_{L2} de Hu1A9 (Hu1A9-2).

[00194] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 16) do gene da V_H de Hu1A9 flanqueado pelos sítios de Spel e Hindlll (sublinhados) é mostrada na tabela 10 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 17). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (Q) da V_H madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 10. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 16) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 17) do Gene da V_H de Hu1A9 Humanizado

ACTAGTACCACCATGGACTGGACCTGGAGGATCCTTTGGTGGCAGCACAGGT
<u>M</u> <u>D</u> <u>W</u> <u>T</u> <u>W</u> <u>R</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u>
GCCCACTCCCAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCTGAAGTGAAAAAGCCTGGGCCTCA
<u>A</u> <u>H</u> <u>S</u> <u><u>Q</u></u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>V</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>K</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>S</u>
GTGAAGGTTTCCTGCAAGGCTTCTGGATACTCATTCACTGACTATATCATGCTTGGGTG
<u>V</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>C</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>F</u> <u>T</u> <u><u>D</u></u> <u><u>Y</u></u> <u>I</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>V</u>
CGCCAGGGCCCTGGACAAAGGCTTGAGTGGATGGAGATATCTATCCTTACTATGGCAGT
<u>R</u> <u>Q</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>R</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>G</u> <u><u>D</u></u> <u><u>I</u></u> <u><u>Y</u></u> <u>P</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>S</u>
ACAAGCTATAATCTGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCCTCACCGTCGACACATCCGCGAGC
<u>T</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>K</u> <u>F</u> <u>K</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u>
ACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGAGATCTGAAGACACCGCTGTGTATTACTGTGCC
<u>T</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>S</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>A</u>
AGGCAGGGCGGGATGGAAACTACGCTCTTGACTACTGGGCCAGGGAACCCCTGGT
<u>R</u> <u><u>Q</u></u> <u>G</u> <u>G</u> <u>D</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>V</u>
<u>ACCGTCTCCTCAGGTGAGTCTGCTGTACTAAGCTT</u>
<u>T</u> <u>V</u> <u>S</u> <u>S</u>

[00195] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 18) do gene da V_{L1} de Hu1A9 flanqueado pelos sítios de NheI e EcoRI (sublinhados) é mostrada na tabela 11 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 19). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (D) da V_L madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat *et al.* (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 11. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 18) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 19) do Gene da V_{L1} de Hu1A9 Humanizado

GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGACTCAGGTCTTGATGTGCTGTGGTTGTCT
<u>M</u> <u>E</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>V</u> <u>Y</u> <u>M</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>W</u> <u>L</u> <u>S</u>
GGTGTGATGGAGACATTAGATGACCCAGTCATCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTCGGA
<u>G</u> <u>V</u> <u>D</u> <u>G</u> <u><u>D</u></u> <u>I</u> <u>Q</u> <u>M</u> <u>T</u> <u>Q</u> <u>S</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>V</u> <u>G</u>
GACAGGGTCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGTTGCCTGGTAT
<u>D</u> <u>R</u> <u>V</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>T</u> <u>C</u> <u><u>K</u></u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>A</u> <u>W</u> <u>Y</u>
CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCCTAAAGTCCTGATTACTCCGCATCCTATCGGTACAGT
<u>Q</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>K</u> <u>V</u> <u>L</u> <u>I</u> <u>Y</u> <u>S</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>R</u> <u>Y</u> <u>S</u>
GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCTACTCACCATCAGC
<u>G</u> <u>V</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>R</u> <u>F</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>T</u> <u>L</u> <u>T</u> <u>I</u> <u>S</u>
AGTCTGCAGCCTGAAGACTTGCAACTTATTACTGTCAGCAATATAACAGCTATCCATT
<u>S</u> <u>L</u> <u>Q</u> <u>P</u> <u>E</u> <u>D</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u><u>Q</u></u> <u>Q</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>P</u> <u>F</u>
<u>ACGTTCGGCCAGGGACAAAGTTGAAATCAAACGTAAGTACTTTTCCGAATT</u>
<u>T</u> <u>F</u> <u>G</u> <u>Q</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>E</u> <u>I</u> <u>K</u>

[00196] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 20) do gene da V_{L2} de Hu1A9 flanqueado pelos sítios de NheI e EcoRI (sublinhados) é mostrada na tabela 12 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO:21). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (D) da V_L maduras estã sublinhado duas vezes. As

sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 12. Sequências de Nucleotídeos (SEQ ID NO: 20) e Aminoácidos (SEQ ID NO: 21) do Gene da V₁2 de 1A9 Humanizado

GCTAGCACCACCATGGAGTCACAGACTCAGGCTTTGTGTACATGTTGCTGTGGTTGTCT
<i>M E S Q T Q V F V Y M L L W L S</i>
GGTGGTGATGGAGACATT CAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCCGCATCAGTCGGA
<i>G V D G D I Q M T Q S P S S L S A S V G</i>
GACAGGGTCACCACCATCACCTGCAAGGCCAGTCAGAATGTGGGTACTACTGTTGCCCTGGTAT
<i>D R V T I T C K A S Q N V G T T V A W Y</i>
CAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAAGCTCTGATTACTCCGCATCCTATCGGTACAGT
<i>Q Q K P G K A P K V L I Y S A S Y R Y S</i>
GGAGTCCCTTCACGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTCACCATCAGC
<i>G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S</i>
AGTCTGCAGCCTGAAAGACTTGCACATTACTGTCAAGCAATATAACAGCTATCCATT
<i>S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P F</i>
ACGTTCGGCCAGGGGACAAAGTTGAAATCAAACGTAAGTACTTTTCCGAATT
<i>T F G Q G T K L E I K</i>

Geração de transfetantes estáveis de NS0 que produzem anticorpos 1A9 IgGI/κ quiméricos e humanizados. Para obter linhagens celulares de forma estável produzindo anticorpos Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2, vetores de expressão pCh1A9, pHu1A9-1 e pHu1A9-2, respectivamente, foram introduzidos no cromossomo de uma linhagem celular de mieloma de camundongo (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). Células NS0 foram cultivadas em meio DME contendo 10% de FBS a 37°C em uma incubadora de CO₂ a 7,5%. A transfecção estável em NS0 foi realizada por eletroporação conforme descrito em Bebbington et al. (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Antes da transfecção, cada vetor de expressão foi linearizado usando FspI. Aproximadamente 10⁷ células foram transfetadas com 20 μg de plasmídeo linearizado, suspensas em meio DME contendo 10% de FBS, e banhadas em várias placas de 96 poços. Após 48 horas, meios de seleção (meio DME contendo 10% de FBS, suplemento de meios HT (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 mg/ml de xantina e 1 μg/ml de ácido micofenólico) foram aplicados. Aproximadamente 10 dias após o início da seleção, sobrenadantes de cultura foram analisados para a produção de anticorpos.

[00197] A expressão de anticorpos Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2 foi

medida por ELISA em sanduíche. Em um experimento típico, uma placa de ELISA foi revestida durante a noite a 4°C com 100 µl/poço de anticorpo policlonal específico para cadeia Fcy IgG anti-humano de cabra diluído 1/2.000 (Sigma) em PBS, lavada com Tampão de Lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20), e bloqueada por 0,5 h à temperatura ambiente com 300 µl/poço do Tampão de Bloco (PBS contendo 2% de Leite Desnatado e 0,05% de Tween 20). Após a lavagem com Tampão de Lavagem, 100 µl/poço de amostras adequadamente diluídas em Tampão de ELISA (PBS contendo 1% de Leite Desnatado e 0,025% de Tween 20) foram aplicados à placa de ELISA. Um anticorpo IgG1/κ humanizado apropriado foi usado como um padrão. Após a incubação da placa de ELISA por 1 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, os anticorpos ligados foram detectados usando 100 µl/poço de anticorpo policlonal de cadeia kappa anti-humano de cabra conjugado com HRP diluído 1/2.000 (SouthernBiotech). Após a incubação por 0,5 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, o desenvolvimento da cor foi realizado adicionando 100 µl/poço de substrato de ABTS (bio WORLD, Dublin, OH). O desenvolvimento da cor [00198] foi interrompido pela adição de 100 µl/poço de ácido oxálico a 2%. A absorvância foi lida em 405 nm. Transfектantes estáveis de Ns0 produzindo um alto nível de anticorpos Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2 (NS0-Ch1A9 1C11, NS0-Hu1A9-1 3F9 e NS0-Hu1A9-2 3C9, respectivamente) foram adaptados ao crescimento em meios livres de soro usando Hibridoma-SFM.

[00199] A autenticidade das cadeias pesadas e leves produzidas em NS0-Ch1A9 1C11, NS0-Hu1A9-1 3F9, e NS0-Hu1A9-2 3C9 foi confirmada por sequenciamento de cDNA. A sequência de nucleotídeos obtida da região de codificação para cada cadeia pesada Ch1A9, cadeia leve Ch1A9, cadeia pesada Hu1A9-1, cadeia leve Hu1A9-1, cadeia pesada Hu1A9-2 e cadeia leve Hu1A9-2, combinada perfeitamente com a sequência correspondente no vetor

de pCh1A9, pHu1A9-1 ou pHu1A9-2 (Tabela 13).

Tabela 13. Sequência de regiões codificadoras de Cadeias Leves e Pesadas de pCh1A9		
Descrição	Sequência de Nucleotídeos	Sequência de Aminoácidos
Região codificadora de cadeia pesada gama-1 em pCh1A9	SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23
Região codificadora de cadeia leve kappa em pCh1A9	SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 25
Região codificadora de cadeia pesada gama-1 em pCh1A9-1 e pHu1A9-2	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 27
Região codificadora de cadeia leve kappa em pHu1A9-1	SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 29
Região codificadora de cadeia leve kappa em pHu1A9-2	SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 31

Exemplo 9 - Caracterização dos anticorpos Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2

[00200] As células NS0-Ch1A9 1C11, NS0-Hu1A9-1 3F9, e NS0-Hu1A9-2 3C9 foram cultivadas em Hibridoma-SFM em uma garrafa rotatória para a densidade de cerca de 10^6 /ml, alimentadas com 1/10th volume de 60 mg/ml de Hidrolisado de Soja Ultrafiltrado (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) dissolvidos em meios SFM4MAb (HyClone), e cultivadas ainda até a viabilidade celular se tornar menos do que 50%. Após a centrifugação e filtração, o sobrenadante de cultura foi carregado em uma coluna Sepharose proteína-A (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). A coluna foi lavada com PBS antes que o anticorpo fosse eluído com glicina-HCl a 0,1 M (pH 3,0). Após a neutralização com Tris-HCl a 1 M (pH 8), o tampão de anticorpo eluído foi alterado para PBS por diálise. A concentração de anticorpo foi determinada pela medição da absorbância em 280 nm (1 mg/ml = 1,4 OD). O rendimento foi de 8,2 mg para Ch1A9 (1000 ml de sobrenadante de cultura), 7,7 mg para Hu1A9-1 (a partir de 500 ml) e 10,8 mg para Hu1A9-2 (a partir de 500 ml).

[00201] Os Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2 purificados foram caracterizados por SDS-PAGE de acordo com os procedimentos padrão. A análise sob condições de redução indicou que cada um dos três anticorpos é composto de uma cadeia pesada com um peso molecular de cerca de 50 kDa e uma cadeia leve com um peso molecular de cerca de 25 kDa (figura 9). A pureza de cada anticorpo aparenta ser mais do que 95%.

[00202] A ligação ao antígeno de anticorpos Ch1A9, Hu1A9-1 e Hu1A9-2 foi examinada por ELISA. Em um experimento típico, uma placa de ELISA foi revestida com 100 µl/poço de Vacina do Vírus Rábico Inativada diluída em 1/500 (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha) no tampão de bicarbonato de sódio a 0,2 M (pH 9,4) durante a noite a 4°C, lavada com Tampão de Lavagem, e bloqueada por 0,5 h à temperatura ambiente com 300 µl/poço de Tampão de Bloco. Após a lavagem com Tampão de Lavagem, 100 µl/poço de amostras apropriadamente diluídas em Tampão de ELISA foram aplicados à placa de ELISA. Após a incubação da placa de ELISA por 1 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, os anticorpos ligados foram detectados usando 100 µl/poço de anticorpo policlonal específico de cadeia Fc IgG anti-humano de cabra conjugado com HRP diluído em 1/2.000 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, EUA). Após a incubação por 0,5 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, o desenvolvimento da cor foi realizado adicionando 100 µl/poço de substrato de ABTS. O desenvolvimento da cor foi interrompido pela adição de 100 µl/poço de ácido oxálico a 2%. A absorvância foi lida em 405 nm. Os valores de EC₅₀ calculados usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) foram 0,052 µg/ml para Ch1A9, 0,025 µg/ml para Hu1A9-1 e 0,016 µg/ml para Hu1A9-2 (figura 10). Este resultado indica que tanto Hu1A9-1 quanto 2-Hu1A9 retêm a afinidade de ligação ao antígeno do anticorpo 1A9 quimérico.

[00203] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia se ligam especificamente à glicoproteína do vírus rábico, e que são úteis em métodos relacionados à essa ligação específica, incluindo métodos para detectar a glicoproteína do vírus rábico em uma amostra, ou tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra a infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 10 - Geração de Anticorpo 2G11 Humanizado

[00204] Este exemplo descreve a preparação das formas químéricas e humanizadas do anticorpo 7G11 A3 2G11 descrito nos exemplos 1-6 acima.

[00205] Clonagem e sequenciamento de genes de região variável 2G11 de camundongo. Células de hibridoma de CT.RV 7G11 A3 2G11 de camundongo (referidas como 2G11 neste Exemplo) foram cultivadas em Hibridoma-SFM (Invitrogen, Carlsbad, CA) contendo 12% de soro bovino fetal (FBS; HyClone, Logan, UT) a 37°C em uma incubadora com CO₂ a 7,5%. O RNA total foi extraído de aproximadamente 10⁷ células de hibridoma usando o reagente TRIzol (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fornecedor. cDNA iniciado por Oligo dT para 5'-RACE foi sintetizado usando o Kit de Amplificação de cDNA SMARTer RACE (Clontech, Mountain View, CA), seguindo o protocolo do fornecedor. Os cDNAs de região variável para cadeias leves e pesadas de 2G11 foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com DNA polimerase Phusion (New England Biolabs, Beverly, MA) usando iniciadores 3' que recozem respectivamente para as regiões constantes gama-2a e kappa do camundongo, e o iniciador 5'-RACE (Universal Primer A Mix ou Nested Universal Primer A) fornecido no Kit de amplificação de cDNA SMARTer RACE. Para a amplificação por PCR da região variável de cadeia pesada (V_H), o iniciador 3' tem a sequência de SEQ ID NO: 1. Para a amplificação por PCR da região variável de cadeia leve (V_L), o iniciador 3' tem a sequência de SEQ ID NO: 3. Os cDNAs de V_H e V_L amplificados foram clonados no vetor pCR4Blunt-TOPO (Invitrogen) para determinação da sequência. O sequenciamento de DNA foi realizado em Tocore (Menlo Park, CA). Vários clones de cadeias leve e pesada foram sequenciados e sequências homólogas exclusivas para regiões variáveis de cadeias leve e pesada de camundongo típicas foram identificadas.

[00206] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 32) do cDNA da V_H de 2G11 de camundongo é mostrada na tabela 14, juntamente com a

sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 33). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (E) da V_H madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interests, Fifth edition, NIH Publication No.91-3242, U.S. Department of Health and Human Services, 1991) estão sublinhadas.

Tabela 14. Sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 32) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 33) do cDNA da V_H de 2G11 Murino

GTGCAGCTGGTGGAGCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGATA <u>ACTCTCC</u>
V Q L V E S G G G L V K P G G S L I L S
TGTGCAGCCTCAGGATTCACTTCAGTGGCTTGCCATGCTTGTTGCCAGACTCCG
C A A S G F T F S G F A M S W V R Q T P
GAGAAGAGGCTGGAGTGGTCGCAACCATTAGTAGTGGTGGTACTTATAACCTACTCTCCA
E K R L E W V A <u>T</u> I S S G G T Y T Y S P
GACAGTGTGATGGGTCGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCCCTGTACCTG
D S V M G R F T I S R D N A K N T L Y L
CAAATGAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACGATTACGT
Q M S S L R S E D T A M Y Y C A R <u>R</u> L R
CGGAATTACTACTCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
<u>R</u> N Y Y S M D Y W G Q G T S V T V S S

[00207] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 34) do cDNA da V_L de 2G11 de camundongo é mostrada na tabela 15, juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 35). Os resíduos de aminoácidos são mostrados no único código de letra. A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (D) da V_L madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat *et al.* (1991) estão sublinhadas.

Tabela 15. Sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 34) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 35) do cDNA da V_L de 2G11 Murino

ATGAAGCTGCCCTGTTCTGCTAGTGGTGCTGCTATTGTTCACGAGTCCAGCCTCAAGCAGT	
M K L P V L L V V L L L F T S P A S S S	
GATGTTGTTCTGACCCAAGCTCCACTCTCTGCCTGTCAATATTGGAGATCAAGCCTCT	
D V V L T Q A P L S L P V N I G D Q A S	
ATCTCTTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATAGTGATGGATTCACTTATTGGACTGG	
I S C K S T K S L L N S D G F T Y L D W	
TACCTGCAGAACGCCAGGCCAGTCTCACAGCTCCTAATATATTGGTTCTAATCGATT	
Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V S N R F	
TCTGGAGTTCCAGACAGGTCAGTGGCAGTGGTCAGGAACAGATTCACACTCAAGATC	
S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I	
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAAATTATTTGCTTCCAGAGTAACATCTTCCA	
S R V E A E D L G I Y F C F Q S N Y L P	
TTCACGTTGGCTGGGACAAAGTTGGAAATAAAA	
F T F G S G T K L E I K	

[00208] Construção do anticorpo IgG1/κ 2G11 quimérico. Um gene que codifica a V_H de 2G11 foi gerado como um éxon incluindo um sinal doador de *splice* e apropriado flanqueando sítios de enzima de restrição por PCR usando CDNA da V_H de 2G11 como um modelo, 5'-GCAACTAGTACCACCATGAACCTTGCTCAGC-3' (SEQ ID NO: 37) como um iniciador 5', e 5'-GGGAAGCTTGAGAGGCCATTCTTACCTGAGGAGACGGTGAUTGAGGT-3' (SEQ ID NO: 37) como um iniciador 3'. A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 38) do gene da V_H de 2G11 projetado flanqueado pelos sítios de Spel e HindIII (sublinhados) é mostrada na tabela 16 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 39). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (E) da V_H madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 16. Sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 38) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 39) do Gene da VH de 2G11 Quimérico

<u>ACTAGTACCA</u> CATGA <u>A</u> CTTGTGCTCAGCCTGATTTC <u>CTTGCC</u> CTCATTTAAGAGGT <u>M N F V L S L I F L A L I L R G</u> <u>G</u> TCCC <u>G</u> TGTGAAGTG <u>CAG</u> CTGG <u>G</u> AGTCTGGGG <u>G</u> AGG <u>C</u> TTAGTGAAGCCTGG <u>AGGG</u> TCC <u>V P C E V Q L V E S G G G L V K P G G S</u> <u>C</u> TGATA <u>CTC</u> CTGTGCAGCCT <u>CAGG</u> ATT <u>CA</u> TT <u>CAG</u> GG <u>CTT</u> GC <u>AT</u> GT <u>CTT</u> GG <u>TT</u> <u>L I L S C A A S G F T F S G F A M S W V</u> <u>C</u> GCC <u>A</u> GACT <u>CCGG</u> <u>A</u> GA <u>GAGG</u> CTGG <u>AGT</u> GG <u>TC</u> GA <u>ACC</u> ATT <u>AGT</u> AG <u>GGT</u> GG <u>TAC</u> TT <u>T</u> <u>R Q T P E K R L E W V A T I S S G G T Y</u> <u>A</u> C <u>CT</u> ACT <u>CTCC</u> <u>A</u> GAC <u>AGT</u> GT <u>GAT</u> GG <u>GT</u> CG <u>ATT</u> AC <u>CA</u> CT <u>CC</u> <u>A</u> G <u>AGA</u> CA <u>AT</u> GC <u>CA</u> <u>A</u> <u>AC</u> <u>T Y S P D S V M G R F T I S R D N A K N</u> <u>A</u> CC <u>CT</u> GT <u>AC</u> CT <u>GC</u> AA <u>AT</u> G <u>AGC</u> AG <u>CT</u> GT <u>GAGG</u> CT <u>GAGG</u> AC <u>CGGC</u> AT <u>GT</u> T <u>ATT</u> AC <u>GT</u> GC <u>A</u> <u>T L Y L Q M S S L R S E D T A M Y Y C A</u> <u>A</u> G <u>ACG</u> AT <u>TAC</u> GT <u>CGG</u> AA <u>TT</u> AC <u>TA</u> CT <u>CT</u> AT <u>GG</u> AC <u>TA</u> CT <u>GGGG</u> TC <u>AGG</u> AA <u>CC</u> CT <u>CA</u> <u>GTC</u> <u>ACC</u> <u>R R L R R N Y Y S M D Y W G Q G T S V T</u> <u>G</u> T <u>CT</u> CC <u>CT</u> CA <u>GGT</u> GA <u>GTC</u> CT <u>TTAA</u> <u>AGC</u> TT <u>V S S</u>
--

[00209] Da mesma forma, um gene que codifica a V_L de 2G11 foi gerado como um éxon incluindo um sinal doador de *splice* e apropriado flanqueando sítios de enzima de restrição por PCR. A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 40) do gene da V_L de 2G11 projetado flanqueado pelos sítios de NheI e EcoRI (sublinhados) é mostrada na Tabela 17 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 41). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (D) da V_L madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 17. Sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 40) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 41) do Gene da V_L de 2G11 Quimérico

GCTAGCACCATGAAGCTGCCTGTCAGTGGTGTCTATTGTTACCGAGTCCA
M K L P V L L V V L L L F T S P
GCCTCAAGCAGTGATGTTGTTCTGACCCAAGCTCCACTCTCTGTCAATATTGGA
A S S S D V V L T Q A P L S L P V N I G
GATCAAGCCTCTATCTCTGCAAGTCTACTAAGAGTCTTCTGAATAGTGATGGATTCACT
D Q A S I S C K S T K S L L N S D G F T
TATTTGGACTGGTACCTGCAGAACGCCAGTCTCCACAGCTCTTAATATTTGGTT
<u>Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V</u>
TCTAAATCGATTTCTGGAGTTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGGTAGGAACAGATTTC
S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F
ACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGAAATTATTTGCTTCCAGAGT
T L K I S R V E A E D L G I Y F C F Q S
AACTATCTTCCATTACGTTGGCTGGGACAAAGTTGAAATAAAACGTAAGTAGACT
N Y L P F T F G S G T K L E I K
<u>TTTGCAGATTTC</u>

[00210] Os sinais doadores de *splice* dos exons de V_H e V_L de 2G11 eram derivados das sequências JH2 e JK4 da linhagem germinativa de camundongo, respectivamente. Os fragmentos amplificados por PCR foram purificados com gel usando Kit de Extração II NucleoSpin (Macherey-Nagel, Bethlehem, PA) e clonados no vetor de pCR4Blunt-TOPO para confirmação de sequência. Os fragmentos V corretos foram digeridos com Spel e HindIII (para V_H) ou NheI e EcoRI (para V_L), purificados com gel e clonados em um vetor de expressão de mamíferos transportando regiões constantes gama-1 e kappa humanas para a produção do 2G11 (Ch2G11) IgG1/κ quimérico. A estrutura esquemática do vetor de expressão resultante, pCh2G11, é mostrada na figura 13.

[00211] Projeto dos genes de V_H e V_L de 2G11 humanizado. As sequências de CDR juntamente com resíduos de aminoácidos de *framework* importantes para manter a estrutura de CDR foram enxertadas a partir de V_H e V_L de 2G11 nas sequências *framework* humanas selecionadas correspondentes. Sequências de V_H humanas homólogas às estruturas da V_H

de 2G11 foram buscadas dentro do banco de dados GenBank, e a sequência de V_H codificada pelo cDNA U96282 humano (U96282 V_H) (número de acesso GenBank; Rassenti and Kipps, J. Exp. Med. 185:1435-1445, 1997) foi escolhida como um aceitador para humanização. As sequências de CDR da V_H de 2G11 foram transferidas para as posições correspondentes da V_H de U96282. Nenhuma substituição dos resíduos de aminoácidos *framework* humanos foi prevista ser necessária para manter a estrutura de CDR.

[00212] Embora o modelo tridimensional das regiões variáveis de 2G11 de camundongo em que um resíduo de aminoácido na posição 19 de V_H está localizado distante da CDR e não deveria afetar a formação da estrutura de CDR, a presença de um resíduo de isoleucina nesta posição, em vez de um resíduo de arginina ou lisina típico, é incomum e poderia influenciar a natureza funcional e/ou bioquímica do anticorpo. A segunda V_H humanizada foi, portanto, projetada em que um resíduo de arginina na V_H1 de Hu2G11 na posição 19 foi substituído por um resíduo de isoleucina.

[00213] Com base na pesquisa de homologia com as sequências *framework* da V_L de 2G11, a região VK humana codificada pelo cDNA X72466 (X72466 V_L) (número de acesso GenBank; Klein et al, Eur. J. Immunol. 23 :3248-3262, 1993) foi escolhida como um aceitador para humanização. As sequências de CDR da V_L de 2G11 foram primeiramente transferidas para as posições correspondentes de X72466 V_L . Nenhuma substituição dos aminoácidos *framework* humanos foi prevista ser necessária para manter a estrutura de CDR.

[00214] Construção dos genes de V_H e V_L de 2G11 humanizado. Cada um dos genes que codifica V_H1 e V_H2 de Hu2G11 foi projetado como um éxon incluindo um peptídeo sinal, um sinal doador de *splice*, e flanqueando sítios de Spel e HindIII para posterior clonagem em um vetor de expressão dos mamíferos. O sinal doador de *splice* usado nos éxons de V_H1 e V_H2 de Hu2G11 foi derivado de uma sequência JH3 da linhagem germinativa

humana. Uma vez que o peptídeo sinal codificado pelo gene da V_H de 2G11 do camundongo foi previsto como sendo subideal para a clivagem precisa pelo software de previsão de peptídeo sinal SIG-Pred, a sequência de peptídeo sinal do gene U96282 V_H humano foi usada em V_{H1} e V_{H2} de Hu2G11.

[00215] Um gene que codifica a V_H de Hu2G11 foi projetado como um éxon incluindo um peptídeo sinal, um sinal doador de *splice*, e flanqueando sítios de Nhel e EcoRI para posterior clonagem em um vetor de expressão dos mamíferos. O sinal doador de *splice* foi derivado da sequência de JK4 da linhagem germinativa humana. O peptídeo sinal codificado pelo gene da V_L de 2G11 do camundongo foi previsto como sendo subideal para a clivagem precisa pelo software de previsão de peptídeo sinal SIG-Pred, de modo que a sequência de peptídeo sinal do gene X72466 V_L humano fosse usada na V_L de Hu2G11.

[00216] Os genes de V_{H1} , V_{H2} e V_L de Hu2G11 foram construídos por GenScript USA (Piscataway, NJ). Após a digestão com Spel e Hindlll (para V_H) ou Nhel e EcoRI (para V_L), os genes de V_{H1} , V_{H2} e V_L de Hu1A9 foram subclonados em sítios correspondentes em um vetor de expressão de mamíferos para a produção de anticorpo na forma de IgGI/ κ humana. O vetor de expressão resultante, pHu2G11-1, expressa um anticorpo humanizado contendo a V_{H1} e V_L de Hu2G11 (HU2G11-1). Da mesma forma, pHu2G11-2 expressa um anticorpo humanizado contendo V_{H2} e V_L de Hu2G11 (Hu2G11-2).

[00217] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 42) do gene da V_H de Hu2G11 (também denominado V_H R19I) flanqueado pelos sítios Spel e Hindlll (sublinhados) é mostrada na Tabela 18 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 43). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (E) da V_H madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat et al. (1991) estão sublinhadas. A localização do aminoácido

encaixotado indica a diferença entre V_H1 e V_H2 de Hu2G11. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 18. Sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 42) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 43) do Gene da V_H de 2G11 Humanizado

<u>ACTAGTACCA</u> CCATGGAA <u>TTGGGGCTGAGCTGGGTTTCCTTGCTATTCTGGAAAGGC</u>	M E L G L S W V F L V A I L E G
GTCCAGTGTGA <u>A</u> GTGCAGCTCGTGGAGTCTGGGGAGGCCTCGTCCAGCCTGGGGCTCC	V Q C E V Q L V E S G G G L V Q P G G S
CTGATCCTCTCTGTGCAGCCTCTGGATT <u>CACCTT</u> AGTGGCTTGCCATGAGCTGGTC	L <u>I</u> L S C A A S G F T F S G F A M S W V
CGCCAGGCTCCAGGGAA <u>AGGGGCTCGAGTGGG</u> TCACCATTAGTAGTGGCGGA <u>ACTT</u> TAT	R Q A P G K G L E W V A <u>T</u> I S S G G T Y
ACCTACTCTCCAGACTCTGTGATGGGCCATT <u>CACCAT</u> CTCCAGAGACAACGCCAAC	T Y S P D S V M G R F T I S R D N A K N
TC <u>ACTGTATCTGCAA</u> ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACAGCTGTGATT <u>ACTGTGCC</u>	S L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
AGACGACT <u>GCCTCGGA</u> ATT <u>ACTACTCTATGGACTACTGGG</u> CCAAGGGACA <u>ATGGTCACC</u>	R <u>R</u> L R R N Y Y S M D Y W G Q G T M V T
GTCTCCTCAGGTAA <u>AGATGG</u> CTT <u>CC</u> TAAGCTT	V S S

[00218] A sequência de nucleotídeos (SEQ ID NO: 44) do gene da V_L de Hu2G11 flanqueado pelos sítios de NheI e EcoRI (sublinhados) é mostrada na Tabela 19 juntamente com a sequência de aminoácidos deduzida (SEQ ID NO: 45). A sequência de peptídeo sinal está em itálico. O resíduo de aminoácido de terminal N (D) da V_L madura está sublinhado duas vezes. As sequências de CDR de acordo com a definição de Kabat *et al.* (1991) estão sublinhadas. A sequência de ítron está em itálico.

Tabela 19. Sequência nucleotídica (SEQ ID NO: 44) e de aminoácidos (SEQ ID NO: 45) do Gene da VL de 2G11 Humanizado

```

GCTAGCACCAACATGAGGCTCCCTGCTCAGCTCCTGGGGCTGCTGATGCTCTGGGTCTCT
      M R L P A Q L L G L L M L W V S
GGATCCAGTGGGGATATTGTGATGACTCAGTCCTCCACTCTCCCTGCCCGTCACCCCTGGA
      G S S G D I V M T Q S P L S L P V T P G
GAGCCTGCCTCCATCTCCTGCAAGTCTACTAAGAGCCTCCTGAATAAGTGTGGATTCACT
      E P A S I S C K S T K S L L N S D G F T
TATTTGGATTGGTACCTGCAGAACGCCAGGGCAGTCTCCACAGCTCCTGATCTATTTGGTT
      Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L V
TCTAACTGGTTTCCGGGGTCCCAGACAGATTCACTGGCAGTGGATCAGGCACAGATTTC
      S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F
ACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATGTTGGCTTATTACTGCTTCAAAGT
      T L K I S R V E A E D V G V Y Y C F Q S
AACTATCTTCCTTCACCTTCGGCGCGGAACCAAAGTCGAGATCAAACGTAAGTGCAC
      N Y L P F T F G G G T K V E I K
TTCCCTAGAATTCT

```

[00219] Geração de transfetantes estáveis de NS0 que produzem anticorpos 2G11 IgGI/κ quiméricos e humanizados. Para obter linhagens celulares de forma estável produzindo anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2, os vetores de expressão pCh2G11, pHu2G11-1 e pHuG11-2, respectivamente, foram introduzidos no cromossomo de NS0 de linhagem celular de mieloma de camundongo (European Collection of Animal Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire, UK). Células NS0 foram cultivadas em meio DME contendo 10% de FBS a 37°C em uma incubadora de CO₂ a 7,5%. A transfeção estável em NS0 foi realizada por eletroporação conforme descrito em Bebbington *et al.* (Bio/Technology 10: 169-175, 1992). Antes da transfeção, cada vetor de expressão foi linearizado usando Fspl. Aproximadamente 10⁷ células foram transfetadas com 20 µg de plasmídeo linearizado, suspensas em meio DME contendo 10% de FBS, e banhadas em várias placas de 96 poços. Após 48 horas, meios de seleção (meio DME contendo 10% de FBS, suplemento de meios HT (Sigma, St. Louis, MO), 0,25 mg/ml de xantina e 1 µg/ml de ácido micofenólico) foram aplicados.

Aproximadamente 10 dias após o início da seleção, sobrenadantes de cultura foram analisados para a produção de anticorpos.

[00220] A expressão de anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2 foi medida por ELISA em sanduíche. Em um experimento típico, uma placa de ELISA foi revestida durante a noite a 4°C com 100 µl/poço de anticorpo policlonal específico para cadeia Fcy IgG anti-humano de cabra diluído 1/2.000 (Sigma) em PBS, lavada com Tampão de Lavagem (PBS contendo 0,05% de Tween 20), e bloqueada por 0,5 h à temperatura ambiente com 300 µl/poço do Tampão de Bloco (PBS contendo 2% de Leite Desnatado e 0,05% de Tween 20). Após a lavagem com Tampão de Lavagem, 100 µl/poço de amostras adequadamente diluídas em Tampão de ELISA (PBS contendo 1% de Leite Desnatado e 0,025% de Tween 20) foram aplicados à placa de ELISA. Um anticorpo IgGI/κ humanizado apropriado foi usado como um padrão. Após a incubação da placa de ELISA por 1 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, os anticorpos ligados foram detectados usando 100 µl/poço de anticorpo policlonal de cadeia kappa anti-humano de cabra conjugado com HRP diluído 1/2.000 (SouthernBiotech, Birmingham, AL, EUA). Após a incubação por 0,5 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, o desenvolvimento da cor foi realizado adicionando 100 µl/poço de substrato de ABTS (bioWORLD, Dublin, OH). O desenvolvimento de cor foi interrompido pela adição de 100 µl/poço de ácido oxálico a 2%. A absorbância foi lida em 405 nm. Transfектantes estáveis de NS0 que produzem um alto nível de anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2 (NS0-Ch2G11 1E7, NS0-Hu2G11-1 1E5, e NS0- Hu2G11-2 1A7, respectivamente) foram adaptados para cultivo em meios livres de soro usando Hibridoma- SFM.

[00221] A autenticidade das cadeias leves e pesadas produzida em NS0-Ch2G11 1E7, NS0-Hu2G11-1 1E5 e NS0-Hu2G11-2 1A7 foi confirmada pelo sequenciamento de cDNA. A sequência de nucleotídeos

obtida da região de codificação para cada uma de cadeia pesada de Ch2G11, cadeia leve de Ch2G11, cadeia pesada de Hu2G11-1, cadeia leve de Hu2G11-1, cadeia pesada de Hu2G11-2, e cadeia leve de Hu2G11-2 nas Tabelas 24-28. As sequências perfeitamente combinadas com a sequência correspondente no vetor de pCh2G11, pHu2G11-1 ou pHu2G11-2.

Tabela 20. Sequência de regiões codificadoras das Cadeias Leves e Pesadas de pCh2G11

Descrição	Sequência Nucleotídica	Sequência de Aminoácidos
Região codificadora da cadeia pesada gama-1 em pCh2G11	SEQ ID NO: 46	SEQ ID NO: 47
Região codificadora da cadeia leve kappa em pCh2G11	SEQ ID NO: 48	SEQ ID NO: 49
Região codificadora da cadeia pesada gama-1 em pCh2G11-1	SEQ ID NO: 50	SEQ ID NO: 51
Região codificadora da cadeia pesada gama-1 em pCh2G11-2	SEQ ID NO: 52	SEQ ID NO: 53
Região codificadora da cadeia leve kappa em pCh2G11-1 e	SEQ ID NO: 54	SEQ ID NO: 55
pCh2G11-2		

Exemplo 11 - Purificação de anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2.

[00222] As células NS0-Ch2G11 1E7, NS0-Hu2G11-1 1E5, e NS0-Hu2G11-2 1 A7 foram cultivadas em Hibridoma-SFM em uma garrafa rotatória para a densidade de cerca de 10^6 /ml, alimentadas com 1/10th volume de 60 mg/ml de Hidrolisado de Soja Ultrafiltrado (Irvine Scientific, Santa Ana, CA) dissolvidos em meios SFM4MAb (HyClone), e cultivadas ainda mais até a viabilidade se tornar menos do que 50%. Após a centrifugação e filtração, o sobrenadante de cultura foi carregado em uma coluna Sepharose proteína-A (HiTrap MABSelect SuRe, GE Healthcare, Piscataway, NJ). A coluna foi lavada com PBS antes que o anticorpo fosse eluído com glicina-HCl a 0,1 M (pH 3,0). Após a neutralização com Tris-HCl a 1 M (pH 8), o tampão de anticorpo eluído foi alterado para PBS por diálise. A concentração de anticorpo foi determinada pela medição de absorbância em 280 nm (1

mg/ml = 1,4 OD). O rendimento foi de 2,8 mg por Ch2G11 (500 ml do sobrenadante de cultura), 3,4 mg para Hu2G11-1 (a partir de 500 ml) e 1,1 mg para Hu2G11-2 (a partir de 500 ml).

[00223] Os anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2 purificados foram caracterizados por SDS-PAGE de acordo com procedimentos padrão. A análise sob condições de redução indicou que cada um dos três anticorpos é composto de uma cadeia pesada com um peso molecular de cerca de 50 kDa e uma cadeia leve com um peso molecular de cerca de 25 kDa (figura 12). A pureza de cada anticorpo aparentou ser de mais do que 90%.

Exemplo 12 - Caracterização dos anticorpos Ch2G11, Hu2G11-1 e Hu2G11-2

[00224] A ligação ao antígeno de anticorpos Ch2G11 , Hu2G11-1 e Hu2G11-2 foi examinada por um ELISA de ligação competitiva. Uma placa de ELISA foi revestida com 100 µl/poço de Vacina do Vírus Rábico Inativada diluída em 1/200 (Rabipur®, Chiron Behring GmbH & Co., Liederbach, Alemanha) no tampão de bicarbonato de sódio a 0,2 M (pH 9,4) durante a noite a 4°C, lavada com Tampão de Lavagem (PBS), e bloqueada com 300 µl/poço de Tampão de Bloco (3% BSA PBS) por 0,5h à temperatura ambiente. Após a lavagem com Tampão de Lavagem, uma mistura de anticorpo 7G11 A3 1H5 de camundongo (0,2 µg/ml; fornecido por Asia Vision) e anticorpo competidor (Ch2G11, Hu2G11-1 ou Hu2G11-2; começando em uma concentração final de 100 µg/ml e diluições de 3 vezes em série) em tampão de ELISA foi aplicado em 100 µl/poço em duplicata. Após a incubação da placa de ELISA por 1 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, os anticorpos 7G11 A3 1H5 de camundongo ligados foram detectados usando 100 µl/poço de anticorpo policlonal, absorvido por IgG humano, específico de cadeia Fcγ, IgG anti-humano de cabra conjugado com HRP diluído em 1/2.000 (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Após a incubação por 0,5 h à

temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, o desenvolvimento da cor foi realizado adicionando 100 µl/poço de substrato de ABTS e interrompido por 100 µl/poço de ácido oxálico a 2%. A absorvância foi lida em 405 nm. Os valores de IC₅₀ calculados usando GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA) foram 0,11 µg/ml para Ch2G11, 0,20 µg/ml para Hu2G11-1, e 0,23 µg/ml para Hu2G11-2 (figura 13). Este resultado indica que ambos Hu2G11-1 e Hu2G11-2 mantêm a afinidade de ligação ao antígeno do anticorpo 2G11 de camundongo.

[00225] A ligação ao antígeno de Ch2G11 , Hu2G11-1 e Hu2G11-2 foi também examinada por ELISA como descrito abaixo. Uma placa de ELISA foi revestida com 1 ou 2,5 µg/ml de Ch2G11, Hu2G11-1 ou Hu2G11-2 em PBS durante a noite a 4°C e bloqueada como descrito acima. Após a lavagem com Tampão de Lavagem, 100 µl/poço de Rabipur® diluído em 1/50, 100 ou 1/200 foram adicionados e incubados por 1 h à temperatura ambiente. Após a lavagem com Tampão de Lavagem, Rabipur® capturado por cada anticorpo de teste foi detectado usando 100 µl/poço de anticorpo monoclonal de camundongo conjugado por HRP diluído em 1/1.000 3D10 por Asia Vision. Após a incubação por 0,5 h à temperatura ambiente e lavagem com Tampão de Lavagem, o desenvolvimento da cor foi realizado como descrito acima. A absorvância foi lida em 405 nm. A ordem do sinal do maior para menor foi de Hu2G11-2, Ch2G11 e Hu2G11-1 (figura 14), sugerindo que Hu2G11-2 pode se ligar ao antígeno melhor do que Hu2G11-1.

[00226] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia se ligam especificamente à glicoproteína do vírus rábico, e que são úteis em métodos relacionados à essa ligação específica, incluindo métodos para detectar a glicoproteína do vírus rábico em uma amostra, ou tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra a infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 13 - Atividade de Ligação de RVNAs Humanizados

[00227] A atividade de ligação de RVNAs humanizados à glicoproteína de RV foi estudada neste exemplo. O RVNA humanizado e outros materiais biológicos usados nos exemplos são mostrados na tabela 21. Os animais usados nestes estudos incluíam camundongos BALB/c, fêmeas, 6-8 semanas, pesando 20 a 30 gramas, grau de SPF e hamsters sírios, 2-3 meses, pesando 100 gramas, grau de SPF.

Tabela 21. Biorreagentes

Categoría	Nome	Con. (mg/ml)
Anticorpo antirrábico murino	m-G11	2.3
Anticorpo antirrábico quimérico	Ch2G11	0.5
Anticorpo antirrábico humanizado	Hu2G11	1.0
Anticorpo antirrábico murino	m-1A9	1.9
Anticorpo antirrábico quimérico	Ch1A9	1.0
Anticorpo antirrábico humanizado	Hu1A9-1	1.4
Anticorpo antirrábico humanizado	Hu1A9-2	1.8
Anticorpo antirrábico murino	RV-3D10A6	1.2
Conjugado de enzima	3D10A6-HRP	-
Anticorpo secundário	IgG 3G2 anti-humana de camundongo	1.35
Anticorpo secundário	IgG 3G2-HRP anti-humana de camundongo	-
Globulina rabbica	Imunoglobulina rabbica humana	100 IU/ml
Vacina rabbica	Vacina rabbica	-

[00228] A ligação de RVNAs humanizados, quiméricos e murinos 1A9 para RVGP foi determinada por CLEIA (figura 16). Os 1A9 quiméricos e humanizados foram usados como anticorpos de captura (figura 16A-E) e detecção (figura 16F-J), respectivamente. RVGP foi diluído a 1:50, 1: 100, 1:200, 1:400, 1:800 e 1: 1600 e, em seguida, adicionado na microplaca. 3D 10-HRP RV Murino e IgG-HRP anti-humano de camundongo foram usados como conjugado de enzima. RLU (unidade de luminescência relacionada) representa o sinal de quimioluminescência. O resultado mostrou que a atividade de ligação do Ch1A9 quimérico era superior a do humanizado.

[00229] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia se ligam especificamente à glicoproteína do vírus rabbico, e que são úteis em métodos relacionados à essa ligação específica, incluindo

métodos para detectar a glicoproteína do vírus rábico em uma amostra, ou tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra a infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 14 - Potência neutralizante *in vitro* dos RVNAs Humanizados

[00230] A potência neutralizante *in vitro* dos RVNAs foi medida pelo teste rápido de inibição de foco de fluorescência (RFFIT) e teste de neutralização de vírus de anticorpo fluorescente (FAVN) usando vírus rábico de CVS-11. Os resultados são mostrados na Tabela 22. Os resultados dos dois métodos estavam em conformidade em que o nível de potência neutralizante *in vitro* do 2G11 humanizado era menor do que aquele do 2G11 murino e quimérico, o Hu1A9-1 humanizado tem a melhor atividade neutralizante *in vitro* de todos os quatro anticorpos 1A9.

Tabela 22. Potência neutralizante *in vitro* dos RVNAs humanizados medidos por RFFIT e FAVN

No.	Nome	Potência de neutralização (IU/mg)	
		RFFIT	FAVN
1	m-G11	1667	8309
2	Ch2G11	1261	8309
3	Hu2G11	1261	2631
4	m-1A9	1261	308
5	Ch1A9	1261	533
6	Hu1A9-1	2289	2104
7	Hu1A9-2	1306	405

[00231] Para comparar a atividade de neutralização do 7G11 A32G11 ou 3D11E31 A9 humanizado com o RVNA murino e o quimérico, um teste de neutralização de camundongo (MNT) foi realizado. O vírus rábico 100LD₅₀/0,03ml CVS-11 foi neutralizado pelo volume igual dos RVNAs a 37°C por 1 hora e então injetado no cérebro dos camundongos BALB/C (n = 8 por grupo). O grupo de controle foi injetado com o vírus não-neutralizante. Os camundongos foram examinados diariamente, e se eles mostrassem sinais clínicos de infecção rábica eles seriam sacrificados. A sobrevivência dos camundongos BALB/C foi observada (figura 17). Todos os animais de controle morreram dentro de 9 dias, provando que o experimento foi eficaz.

Não houve diferença da porcentagem de sobrevivência entre o grupo murino e o humanizado quando a concentração do RVNA estava superior a 0,02 mg/mL. No entanto, o desempenho neutralizante do 2G11 murino foi superior ao do químérico e ao do humanizado quando a dose diminuiu para 0,004 mg/mL. Aumentar as quantidades de tratamento do 7G11 A32G11 humanizado pode ajudar a melhorar seu desempenho neutralizante. Além disso, a taxa de sobrevivência dos camundongos que foram tratados com 0,004 mg/mL de Hu1A9-1 humanizado ou m-A19 murino atingiu 100% (8/8) e 50% (4/8), respectivamente.

[00232] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico, e que são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra o vírus rábico a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 15 - Desempenho de proteção pós-exposição dos dois RVNAs humanizados

[00233] Para avaliar o desempenho de proteção pós-exposição dos 2G11 e 1A9 humanizados, um estudo de hamster sírio foi executado em que o RVNA humanizado foi comparado com o RVNA murino e o químérico. Os hamsters ($n = 5$ por grupo) foram infectados com RV de rua de cão (BD06) no dia 1. Os animais foram tratados com as quantidades iguais de 2G11 ou 1A9 murino, químérico ou humanizado (1 mg/kg) com declínio de 16 horas, administrados no sítio de inoculação do vírus (isto é, gastrocnêmio direito). O grupo de controle foi não tratado. Os hamsters foram examinados diariamente, e se eles mostrassem sinais clínicos de infecção rábica eles seriam sacrificados. A sobrevivência dos hamsters sírios foi observada (figura 18). Todos os animais não tratados morreram dentro de 9 dias, provando que o experimento foi eficaz. Para 2G11, não houve diferença da porcentagem de

sobrevivência entre o grupo murino e o humanizado. No entanto, a taxa de sobrevivência dos hamsters que foram tratados com 1A9-1 humanizado ou o 1A9 murino atingiu 100% (5/5) e 60% (3/5), respectivamente.

[00234] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia fornecem proteção pós-exposição contra a infecção rábica, e que são úteis em métodos em relação à essa proteção, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra o vírus rábico a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 16 - Imunogenicidade da vacina em animais tratados com Coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 ou HRIG

[00235] Para avaliar o desempenho de proteção pós-exposição de um coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 humanizado, um estudo com animais foi realizado. Monocamadas de células de neuroblastoma foram infectadas com o vírus desafio padrão-11 (CVS-11) ou outros vírus em uma multiplicidade de infecção (MOI) de 0,3 por 15 min a 37°C/0,5% de CO₂. O inóculo do vírus foi então removido, o meio fresco foi adicionado às células, e a incubação foi continuada por 40 h a 37°C/0,5% de CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram coletados e armazenados a -80°C até o uso posterior. RFFITs padrão para neutralização foram realizados conforme descrito acima. Para determinar a potência neutralizante de cada anticorpo neutralizante de vírus rábico (RVNA), seus títulos neutralizantes de 50% foram comparados com o título neutralizante de 50% do padrão (GB padrão), que foi definido como 21,4 IU/mL.

[00236] Durante a profilaxia pós-exposição (PEP), há a possibilidade de que a administração simultânea de RVNAs e vacina diminua a capacidade da vacina para induzir os níveis limite de anticorpos de neutralização necessários para a proteção. Portanto, é fundamental avaliar o grau da interferência do tratamento com coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 na

vacinação. Para determinar o efeito do coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 na potência da vacina, um experimento em animal *in vivo* foi executado na ausência de RV (figura 19). Para PEP, camundongos BALB/c foram administrados com três doses de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 mais a vacina ou 20 IU/kg de HRIG mais a vacina. As três doses de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 foram de 5000 IU/kg, 1000 IU/kg ou 200 IU/kg, respectivamente. Os camundongos que foram apenas administrados com vacina foram usados como controle. Havia 8 camundongos em cada grupo experimental. Além disso, 6 camundongos que foram apenas administrados com PBS foram usados como controle negativo. Nos dias 1, 2, 4, 8, 16 e 32, o sangue foi coletado da órbita de camundongos. 8 soros de camundongos foram misturados com 4 soros em cada grupo de experimento e determinado o título de RVNA do soro. No dia 1, dia 2 e dia 4, os títulos de RVNA do soro eram elevados nos camundongos que receberam coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2, foram menores em camundongos que receberam 20 IU/kg de HRIG (apenas 2 soros podem cumprir a exigência de WHO, 0,5 IU/mL) e não podem ser detectados em camundongos que foram apenas vacinados. O título de RVNA em camundongos que receberam coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 manteve alto nível durante 8-32 dias, mais alto do que ou equivalente ao título de RVNA em camundongos que receberam HRIG. Este resultado indicou que o coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 não interferiu na vacina para induzir anticorpos de neutralização. Além disso, o título de RVNA em camundongos que receberam o coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 mostrou um efeito dependente da dose óbvio durante 8-32 dias: quanto maior a dose do coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 recebido, maior o título de RVNA induzido nos camundongos.

[00237] Estes resultados mostram que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia fornecem proteção pós-exposição contra a infecção rábica, e que são úteis em métodos em relação à essa proteção, incluindo

métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra o vírus rábico a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 17 - Desempenho neutralizante *in vivo* de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 em comparação com o HRIG policlonal.

[00238] Para avaliar o desempenho neutralizante *in vivo* do coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2, um estudo de hamster sírio foi realizado. Os hamsters ($n = 10$ por grupo) foram infectados com RV de rua de cão (BD06) no dia 1. Os animais foram vacinados com vacina antirrábica (Rabipur, Chiron Behring) no dia 0 e, em seguida, tratados com 1000, 500, 200 IU/kg de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 ou 20 IU/kg de imunoglobulina rábica humana (Shuanglin Pharmaceutical) com declínio de 24 horas, administrados no sítio de inoculação do vírus (isto é, gastrocnêmio). Doses adicionais de vacina foram administradas no músculo gastrocnêmio esquerdo nos dias 3, 7, 14, e 28. Os grupos de controle receberam vacina sozinha ou não tratados. Os hamsters foram examinados diariamente, e se eles mostrassem sinais clínicos de infecção rábica eles seriam sacrificados. A sobrevivência dos hamsters sírios foi observada (figura 20). O grupo de controle negativo tinha uma taxa de sobrevivência de 20%, provando que o experimento foi eficaz. Com o declínio de 24 horas, as taxas de sobrevivência fechadas podem ser observadas em que o tratamento de hamsters com vacina e coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 resultou na taxa de sobrevivência de 100% (10/10), e a taxa de sobrevivência dos hamsters que foram tratados com vacina e HRIG foi de 90% (9/10). Este resultado ilustrou que a potência neutralizante *in vivo* do coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 era muito forte.

[00239] Estes resultados mostram que uma combinação de anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico, e que são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em

necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 18 - Desempenho de proteção pós-exposição dos dois RVNAs humanizados em sujeitos humanos

[00240] Este exemplo demonstrará o desempenho da proteção pós-exposição dos 2G11 e 1A9 humanizados em seres humanos expostos ao vírus da raiva. Seres humanos expostos a ou com suspeita de serem expostos ao vírus rábico são administrados com 2G11 ou 1A9 quiméricos ou humanizado (1 mg/kg) com declínio de 16 horas, administrados no sítio de inoculação do vírus (isto é, o sítio da mordida de um animal). Espera-se que os sujeitos tratados exibirão uma taxa de sobrevivência de 100%, exibirão menos ou nenhum sintoma clínico da raiva do que sujeitos não tratados, e exibirão uma recuperação mais rápida e mais completa a partir da exposição à raiva do que sujeitos não tratados.

[00241] Estes resultados mostrarão que os anticorpos antirrábicos da presente tecnologia fornecem proteção pós-exposição contra a infecção rábica em seres humanos, e que são úteis em métodos em relação à essa proteção, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra o vírus rábico a um sujeito em necessidade disso.

Exemplo 19 - Desempenho neutralizante *in vivo* de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 em comparação com o HRIG policlonal.

[00242] Este exemplo demonstrará o desempenho neutralizante *in vivo* do coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 em seres humanos expostos ao vírus rábico. Seres humanos expostos a ou com suspeita de serem expostos ao vírus rábico são administrados com 1000, 500, 200 IU/kg de coquetel de Hu2G11-1/Hu1A9-2 com declínio de 24 horas, administrados no sítio de inoculação do vírus (isto é, o sítio da mordida de um animal). Espera-se que os sujeitos tratados exibirão uma taxa de sobrevivência de 100%, exibirão menos ou

nenhum sintoma clínico da raiva do que sujeitos não tratados, e exibirão uma recuperação mais rápida e mais completa a partir da exposição à raiva do que sujeitos não tratados.

[00243] Estes resultados mostrarão que uma combinação de anticorpos antirrábicos da presente tecnologia neutralizam a infectividade do vírus rábico, e que são úteis em métodos em relação à neutralização do vírus rábico, incluindo métodos para tratar ou prevenir infecção rábica em um sujeito em necessidade disso, e métodos para fornecer proteção pós-exposição contra infecção rábica a um sujeito em necessidade disso.

EQUIVALENTES

[00244] A presente tecnologia não deve ser limitada em termos das modalidades específicas descritas neste pedido, que são destinadas como simples ilustrações dos aspectos individuais da presentes tecnologia. Muitas modificações e variações desta tecnologia podem ser feitas sem se afastar de seu espírito e escopo, como será evidente para aqueles versados na técnica. Métodos e aparelhos funcionalmente equivalentes dentro do escopo da presente tecnologia, além daqueles enumerados neste documento, serão evidentes para aqueles versados na técnica a partir das descrições mencionadas acima. Tais modificações e variações são destinadas a estar dentro do escopo das reivindicações acrescentadas. A presente tecnologia deve ser limitada somente pelos termos das reivindicações acrescentadas, juntamente com o escopo completo de equivalentes aos quais tais reivindicações são intituladas. Deve ser entendido que esta tecnologia não é limitada a métodos, reagentes, composições de compostos ou sistemas biológicos específicos, que podem, naturalmente, variar. Além disso, deve ser entendido que a terminologia usada neste documento tem o propósito de descrever modalidades específicas apenas, e não é destinada a ser um fator limitante. Outras modalidades são estabelecidas dentro das seguintes reivindicações.

[00245] Todas as referências citadas neste documento são incorporadas neste documento por referência em suas totalidades e para todos os fins na mesma extensão como se cada publicação individual, patente, ou pedido de patente fosse especificamente e individualmente incorporado por referência em sua totalidade para todos os fins.

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo isolado que se liga à glicoproteína do vírus rábico, caracterizado pelo fato de que:

a. o anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: DYIML (CDR1; SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTS YNLKF KG (CDR2; SEQ ID NO:57), e QGGDGNYVLF DY (CDR3; SEQ ID NO:58) e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KASQNVGTTVA (CDR1; SEQ ID NO:62), SASYRYS (CDR2; SEQ ID NO:63), e QQYNSYPFT (CDR3; SEQ ID NO:64), ou

b. o anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: GFAMS (CDR1; SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (CDR2; SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSM DY (CDR3; SEQ ID NO:61), e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KSTKSLLNSDGFTYLD (CDR1; SEQ ID NO:65), LVSNRFS (CDR2; SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (CDR3; SEQ ID NO:67).

2. Anticorpo isolado, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é selecionado a partir de um grupo consistindo em um anticorpo monoclonal, um anticorpo murino, um anticorpo quimérico, e um anticorpo humanizado.

3. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que comprehende o anticorpo, como definido na reivindicação 1 ou 2 e um veículo farmaceuticamente aceitável.

4. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que comprehende um coquetel de anticorpos em que um primeiro anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: DYIML (CDR1; SEQ ID NO:56), DIYPYYGSTS YLKFKG (CDR2; SEQ ID NO:57), e QGGDGNYVLF DY (CDR3; SEQ ID NO:58), e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KASQNVGTTVA (CDR1; SEQ ID NO:62), SASYRYS (CDR2; SEQ ID NO:63), e QQYNSYPFT (CDR3; SEQ

ID NO:64); e em que um segundo anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: GFAMS (CDR1; SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (CDR2; SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSMY (CDR3; SEQ ID NO:61), e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KSTKSLLNSDGFTYLD (CDR1; SEQ ID NO:65), LVSNRFS (CDR2; SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (CDR3; SEQ ID NO:67).

5. Uso do anticorpo, como definido na reivindicação 1 ou 2, caracterizado pelo fato de que é na fabricação de um medicamento para tratar infecção rábica em um indivíduo em necessidade disso.

6. Kit para tratar infecção rábica em um indivíduo em necessidade disso ou detectar vírus rábico em uma amostra, caracterizado pelo fato de que comprehende um ou mais anticorpos que se ligam à glicoproteína do vírus rábico; um ou mais recipientes compreendendo um tampão farmaceuticamente aceitável; e instruções de uso do anticorpo, em que o anticorpo é selecionado dentre:

a. o anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada DYIML (CDR1; SEQ ID NO: 56), DIYPYYGSTS YNLKFKG (CDR2; SEQ ID NO:57), QGGDGNYVLFDY (CDR3; SEQ ID NO:58), e comprehende sequências de CDR de cadeia leve KASQNVGTTVA (CDR1; SEQ ID NO: 62), SASYRYS (CDR2; SEQ ID NO:63), QQYNSYPFT (CDR3; SEQ ID NO:64); e

b. o anticorpo comprehende sequências de CDR de cadeia pesada: GFAMS (CDR1; SEQ ID NO:59), TISSGGTYTYSPDSVMG (CDR2; SEQ ID NO:60), e RLRRNYYSMY (CDR3; SEQ ID NO:61) e comprehende sequências de CDR de cadeia leve: KSTKSLLNSDGFTYLD (CDR1; SEQ ID NO:65), LVSNRFS (CDR2; SEQ ID NO:66), e FQSNYLPFT (CDR3; SEQ ID NO:67).

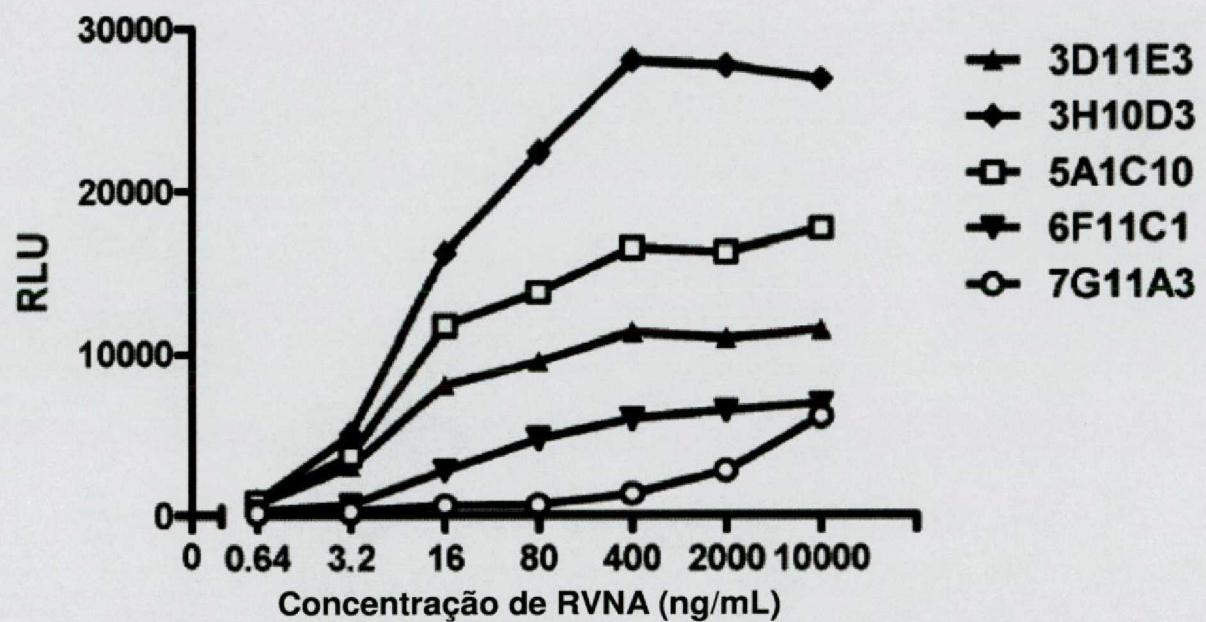


FIG. 2

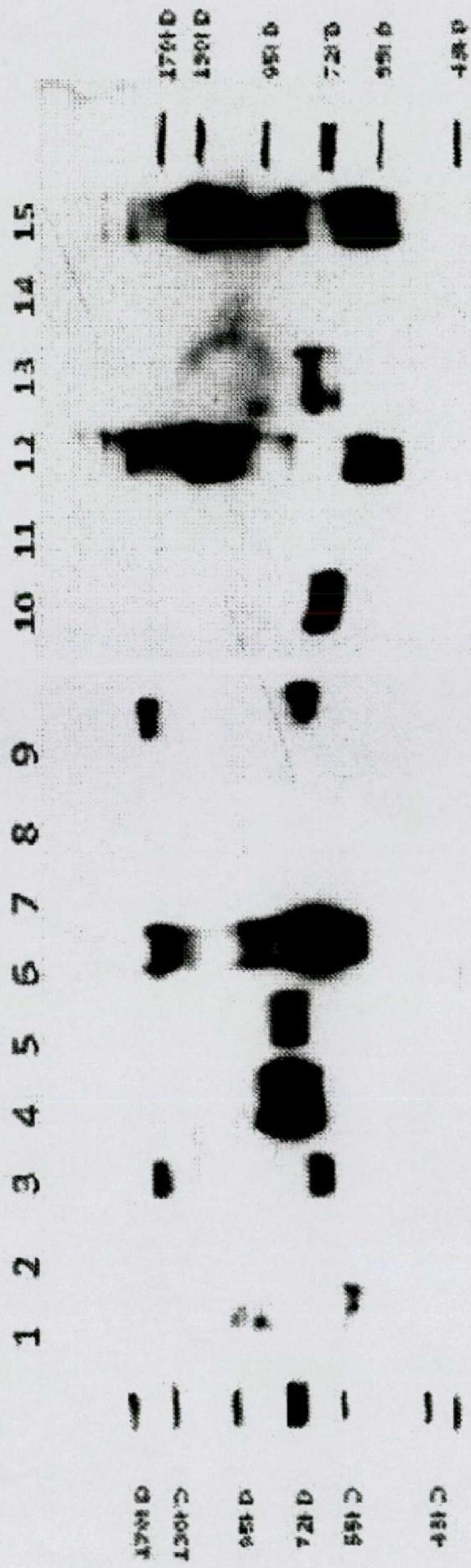
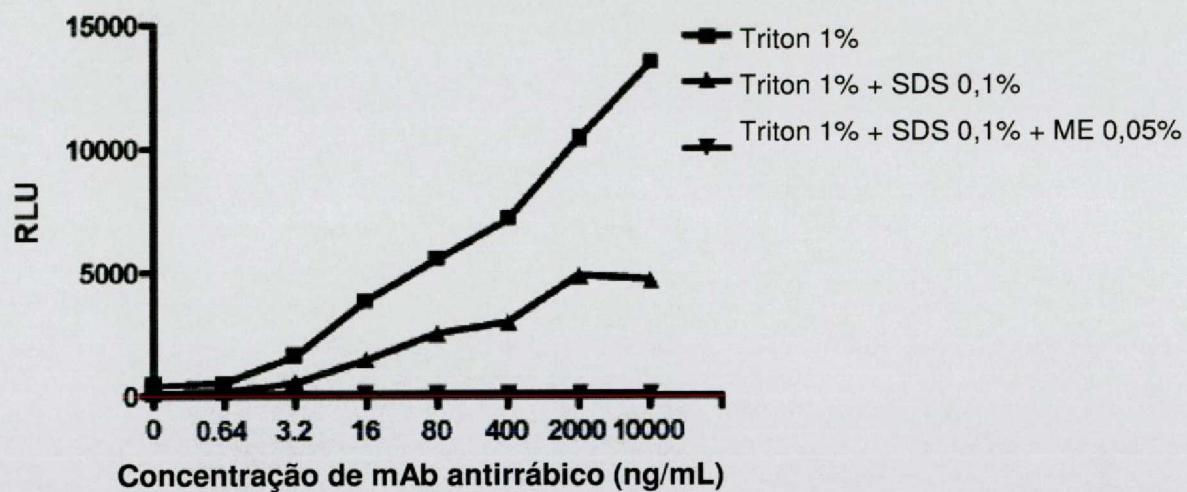


FIG. 3A

Curvas de ligação de 3D11E3 à glicoproteína de RV que foi tratada por diferentes métodos

**FIG. 3B**

Curvas de ligação de 3H10D3 à glicoproteína de RV que foi tratada por diferentes métodos

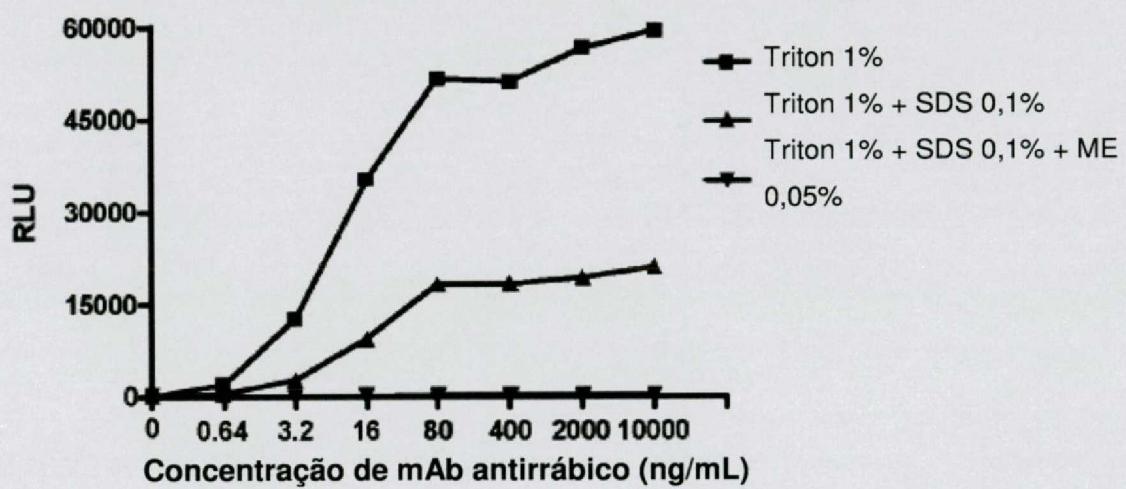
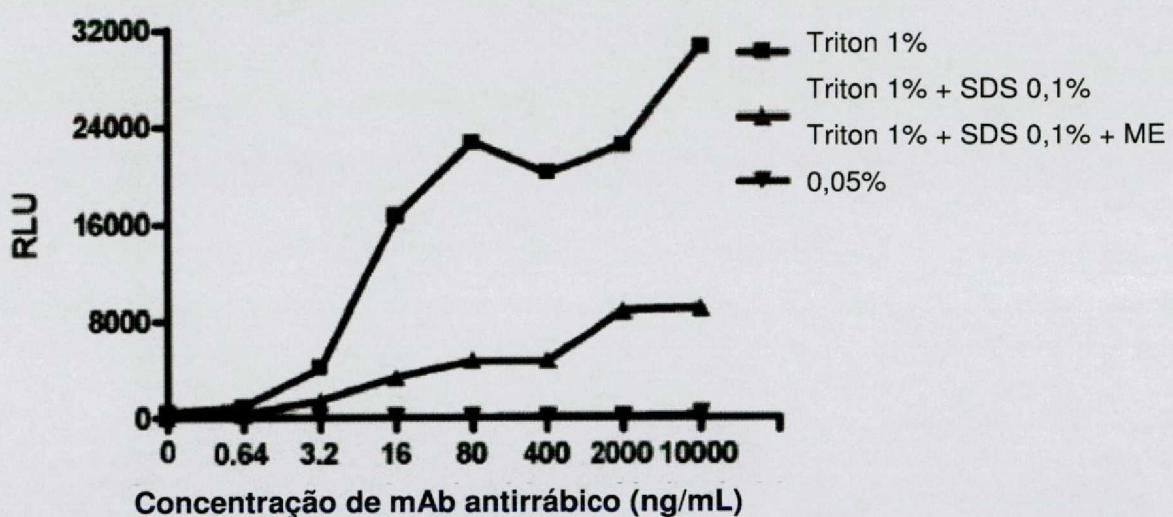


FIG. 3C

Curvas de ligação de 5A1C10 à glicoproteína de RV que foi tratada por diferentes métodos

**FIG. 3D**

Curvas de ligação de 6F11C1 à glicoproteína de RV que foi tratada por diferentes métodos

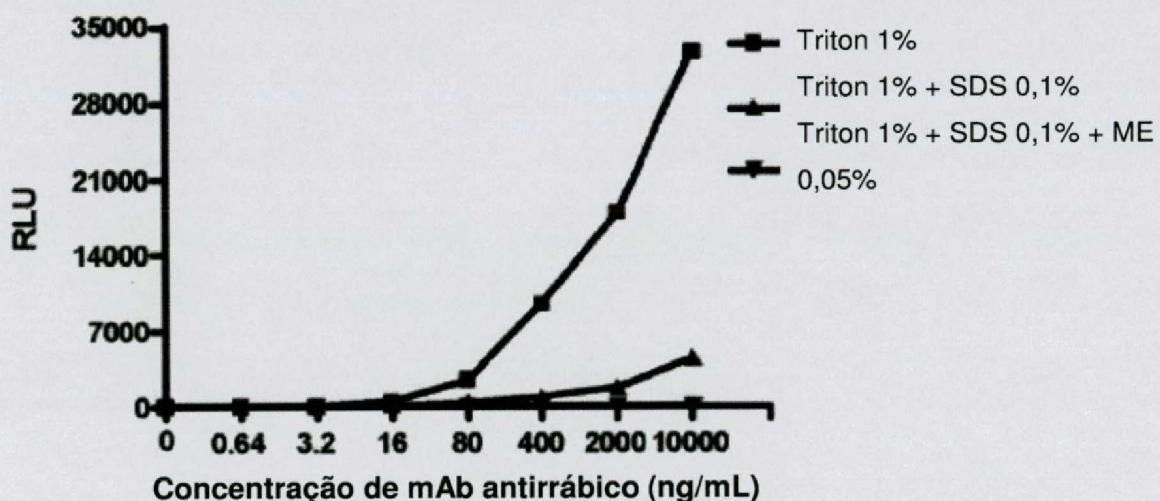


FIG. 3E

Curvas de ligação de 7G11A3 à glicoproteína de RV que foi tratada por diferentes métodos

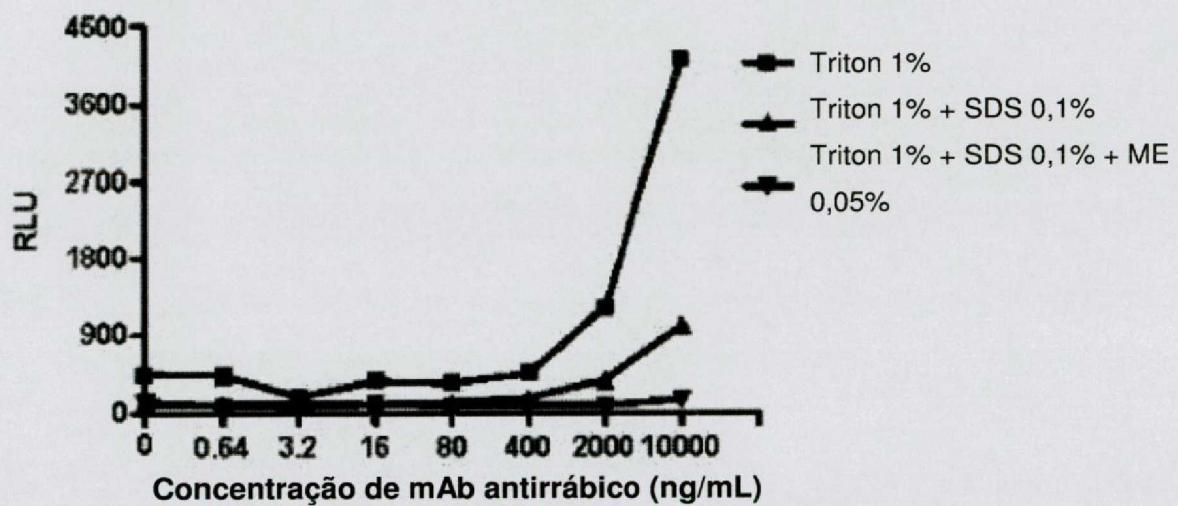


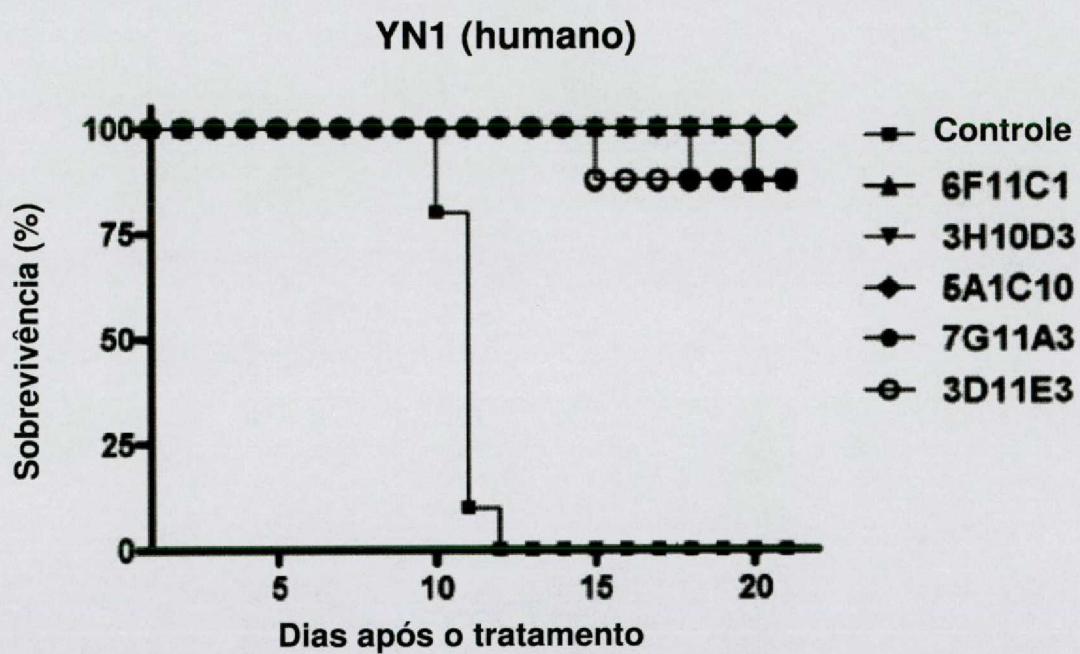
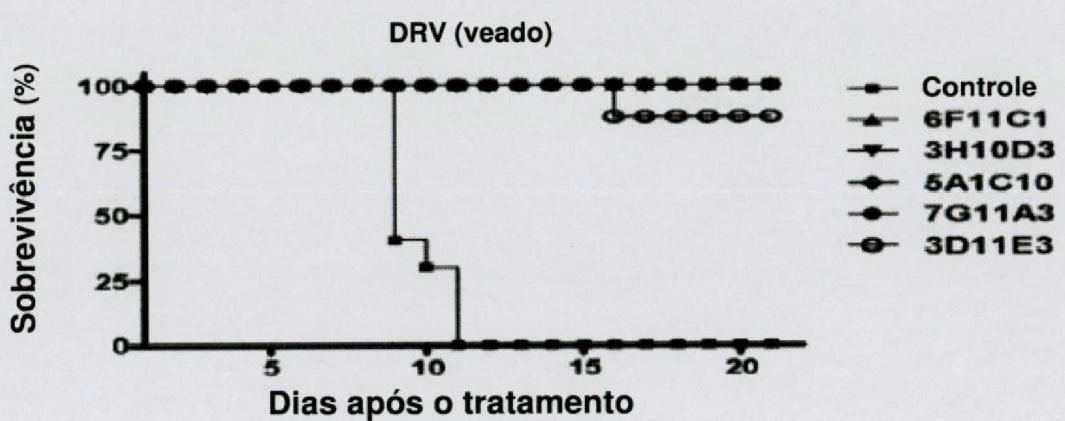
FIG. 4A**FIG. 4B**

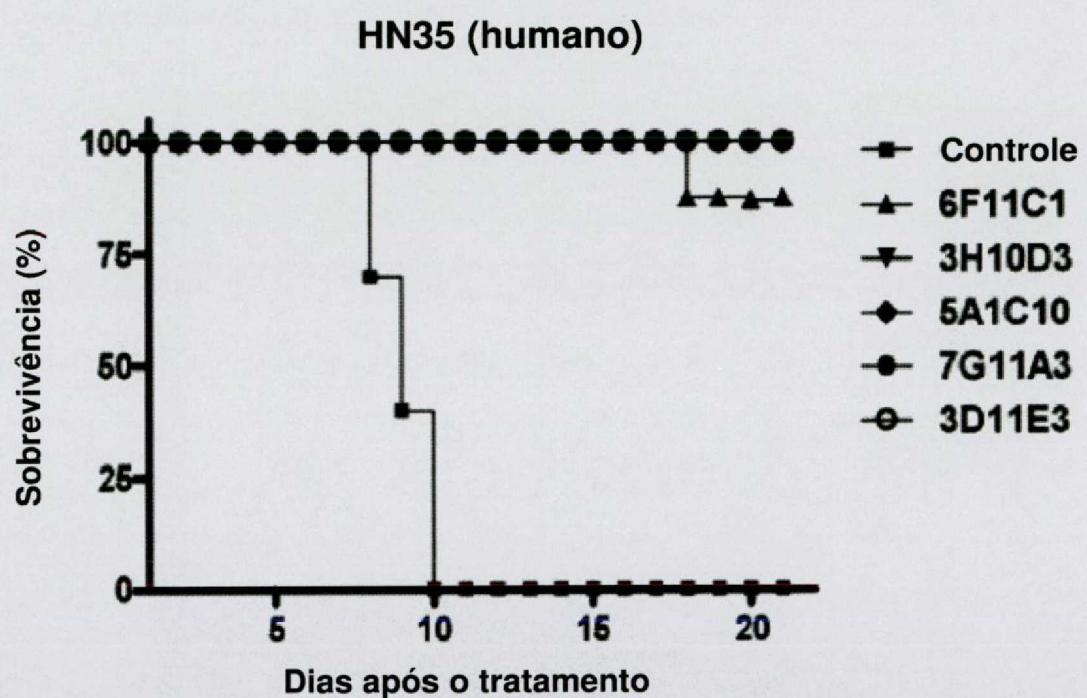
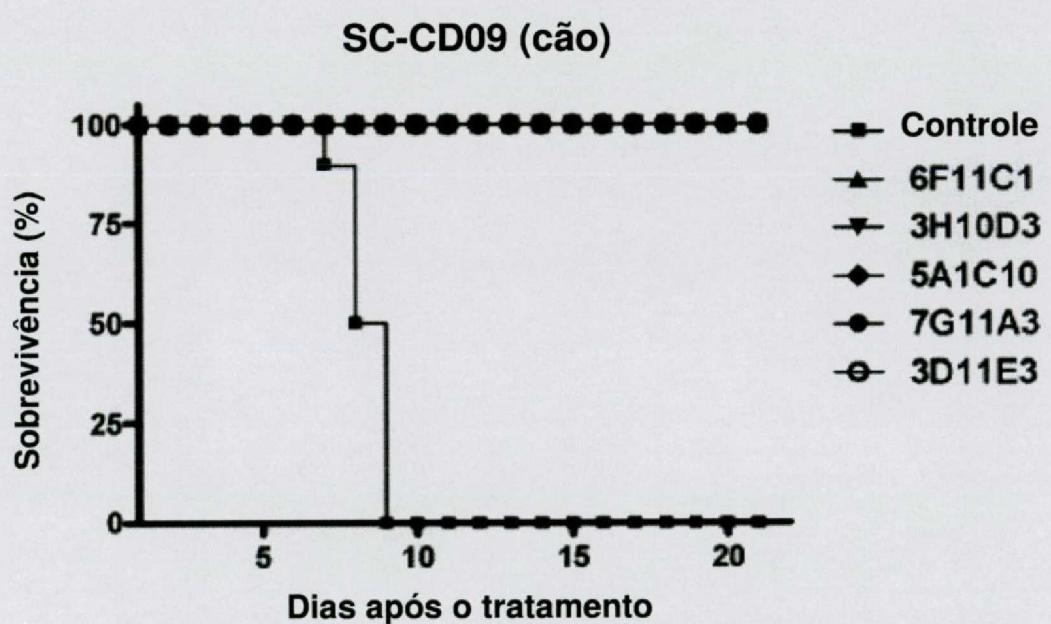
FIG. 4C**FIG. 4D**

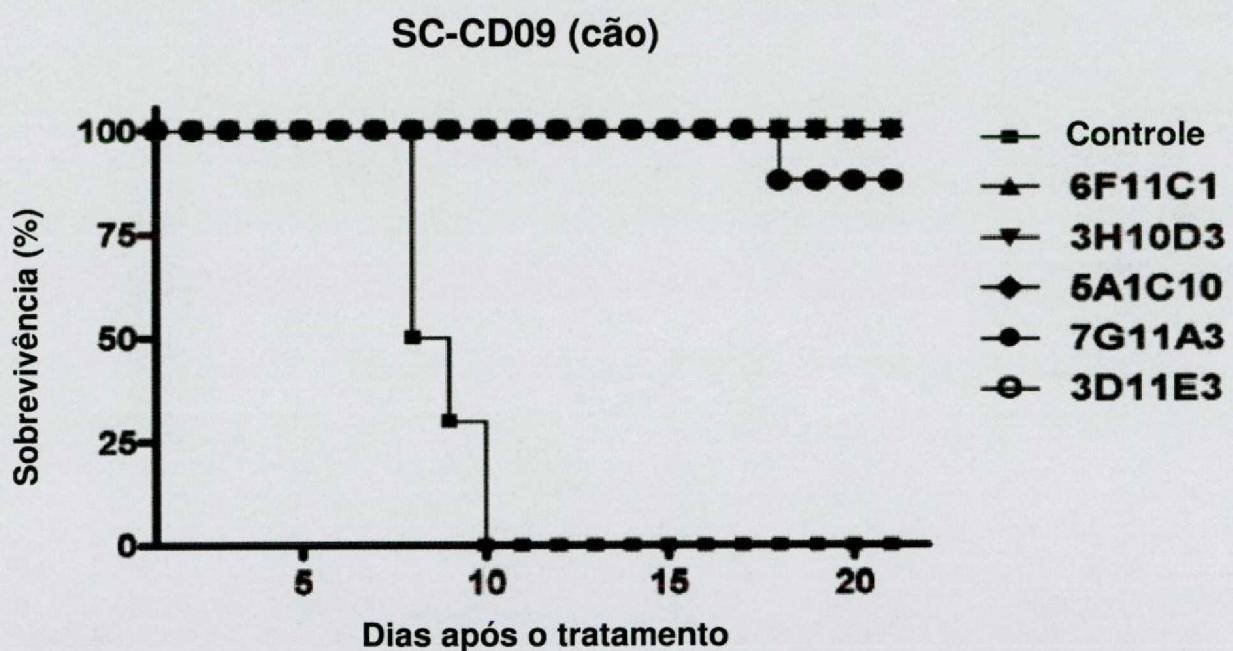
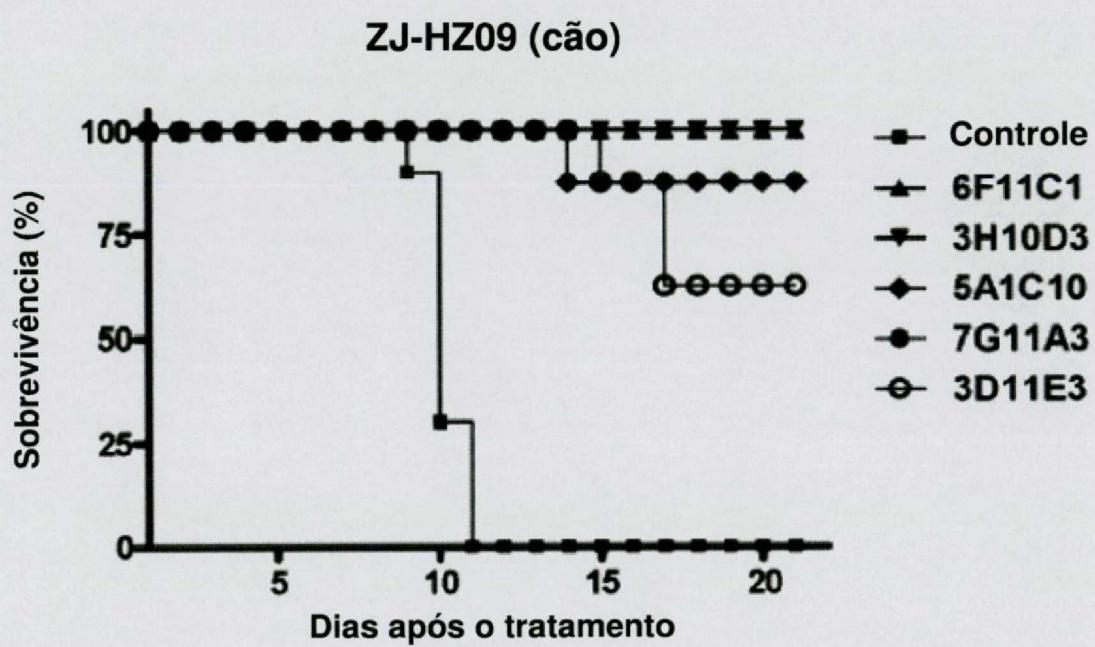
FIG. 4E**FIG. 4F**

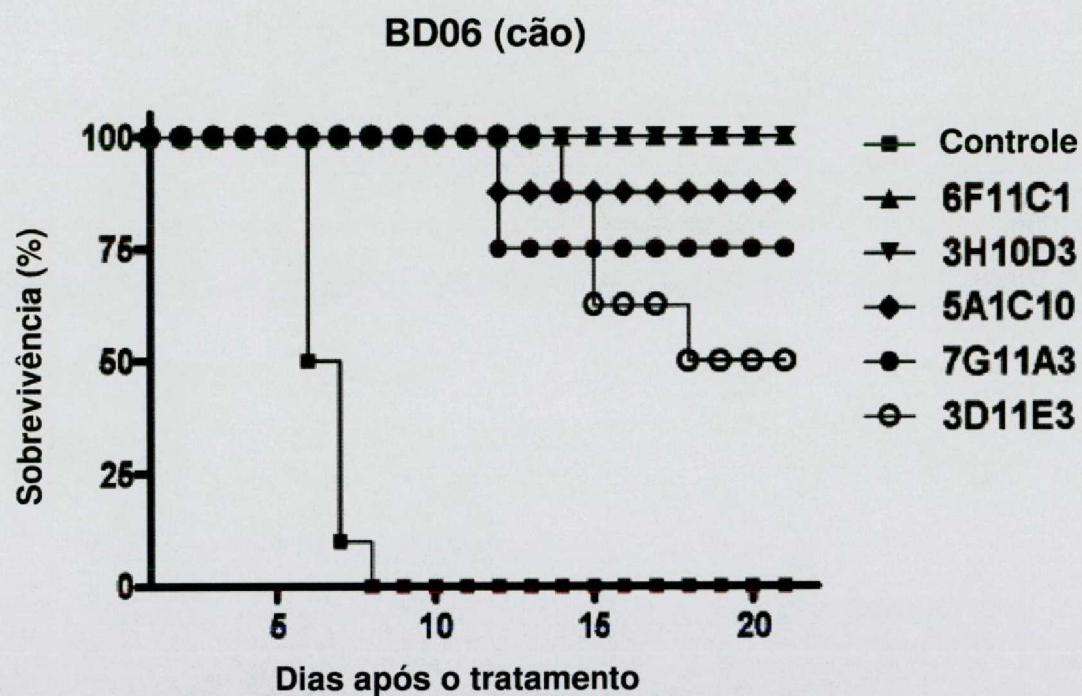
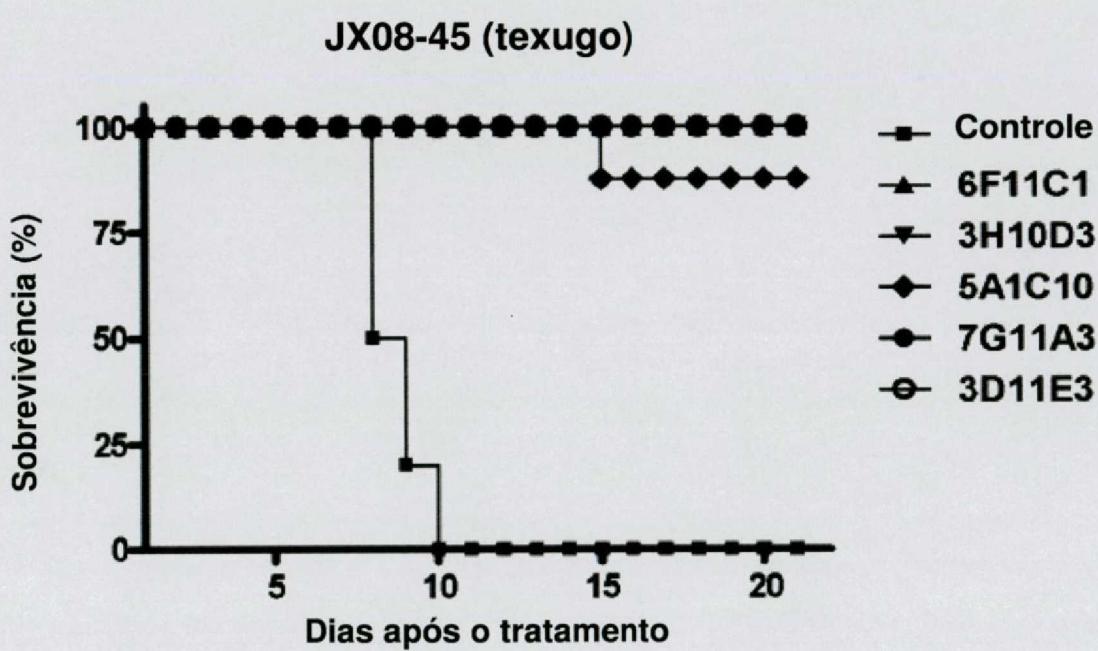
FIG. 4G**FIG. 4H**

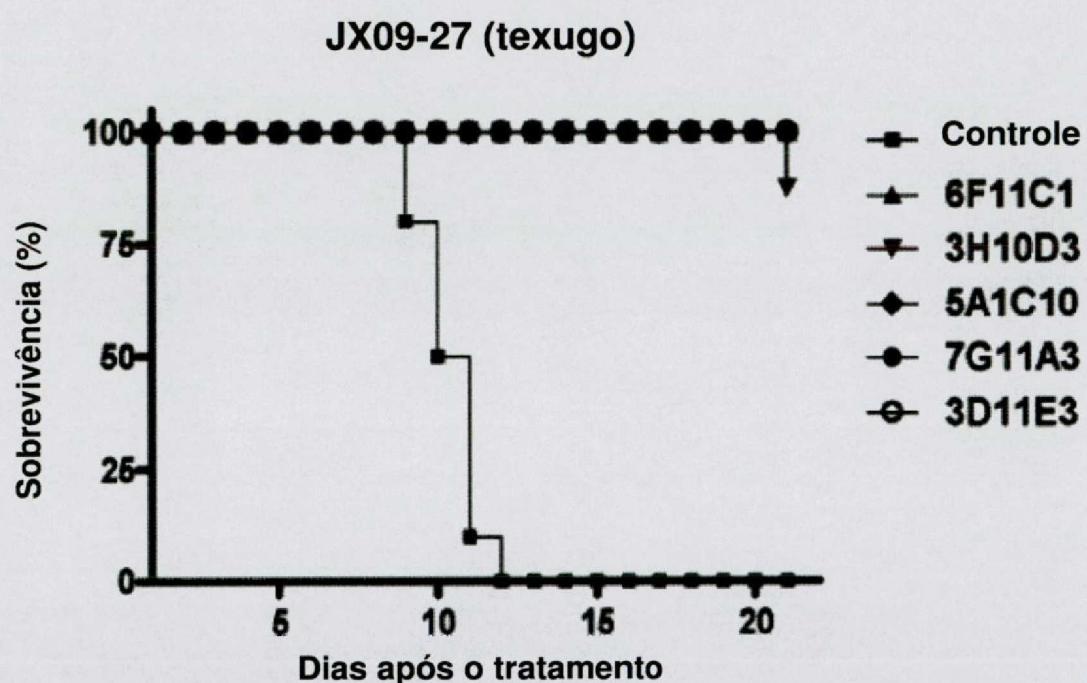
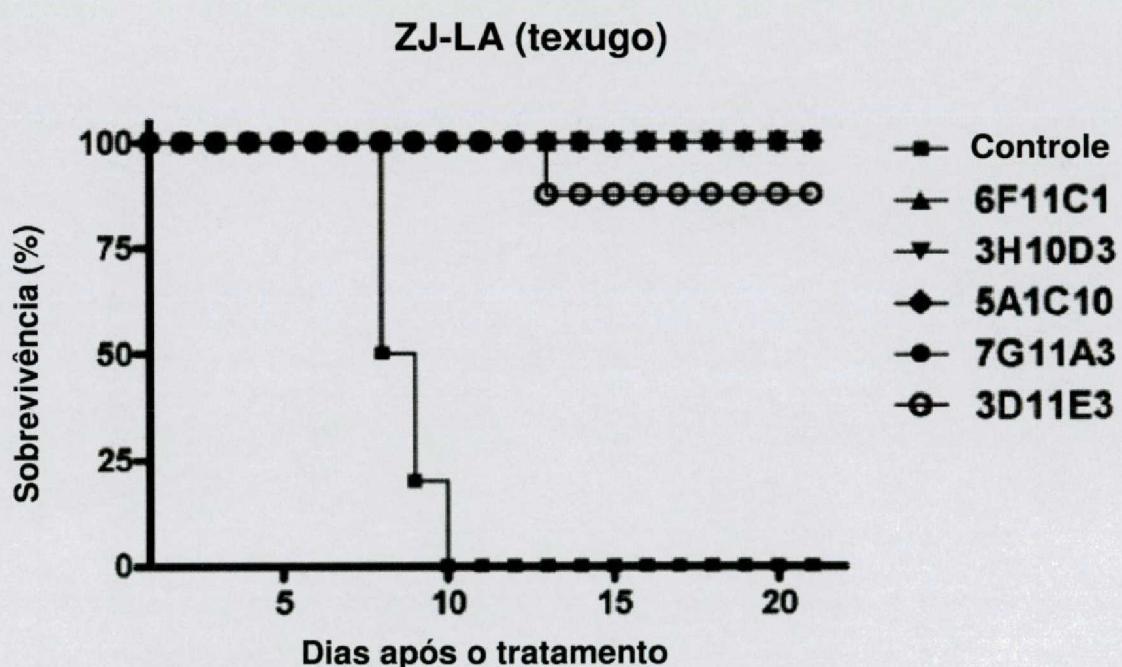
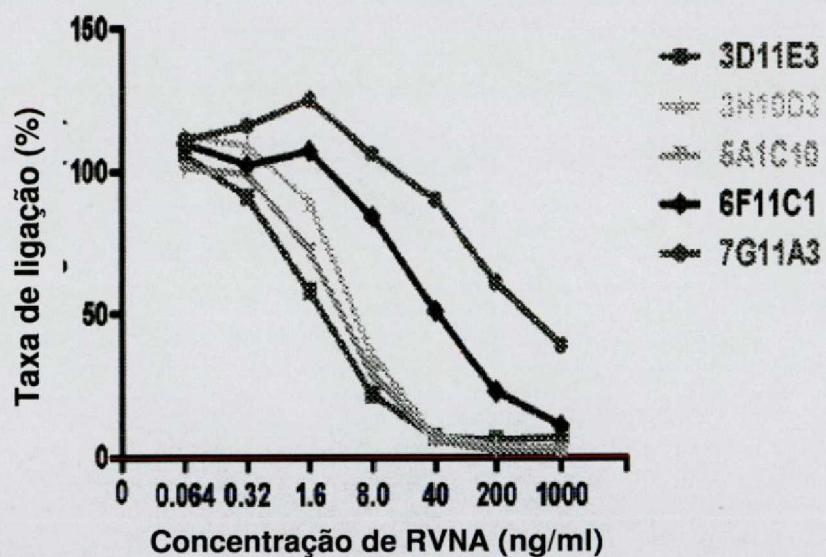
FIG. 4I**FIG. 4J**

FIG. 5A

Ligaçāo competitiva de 3D11E3-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5B**

Ligaçāo competitiva de 3D11E3-HRP à glicoproteína de RV

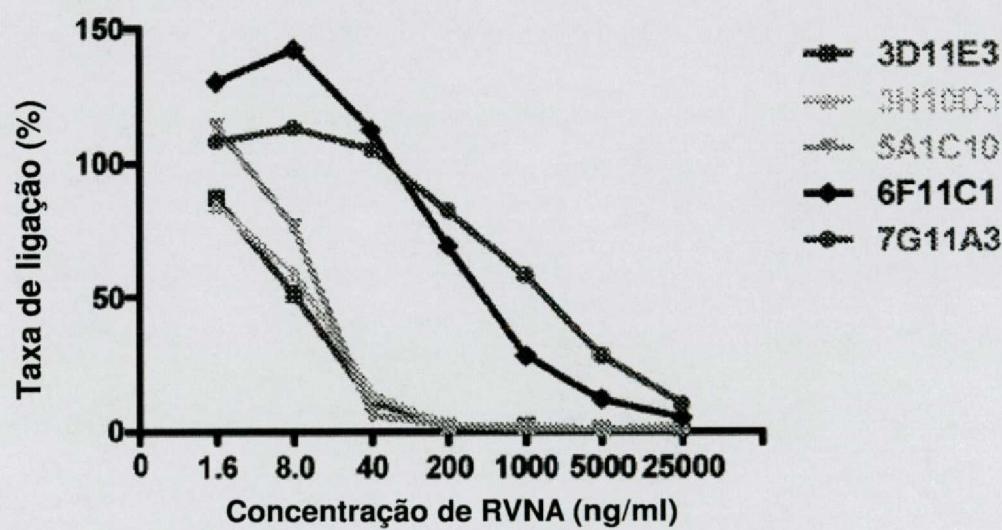
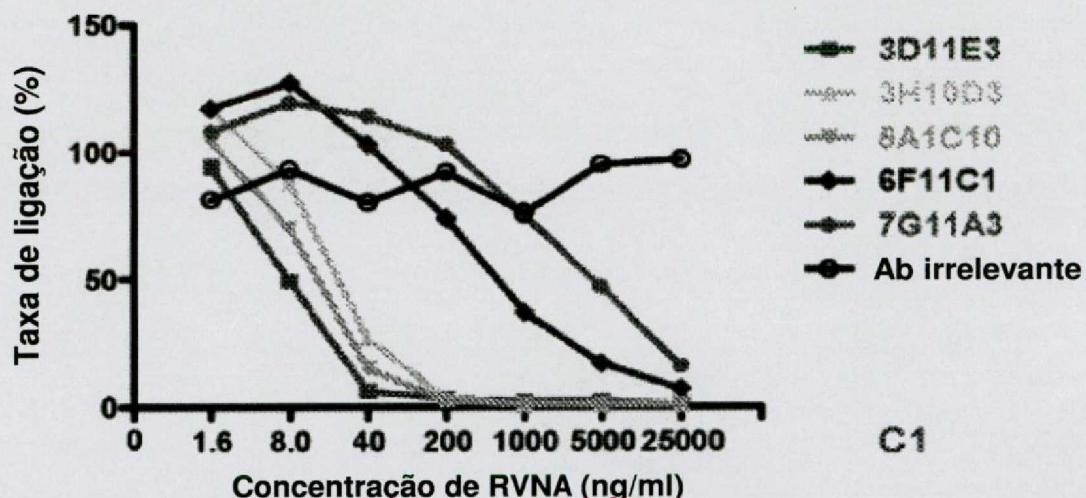


FIG. 5C

Ligaçāo competitiva de 3D11E3-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5D**

Ligaçāo competitiva de 3H10D3-HRP à glicoproteína de RV

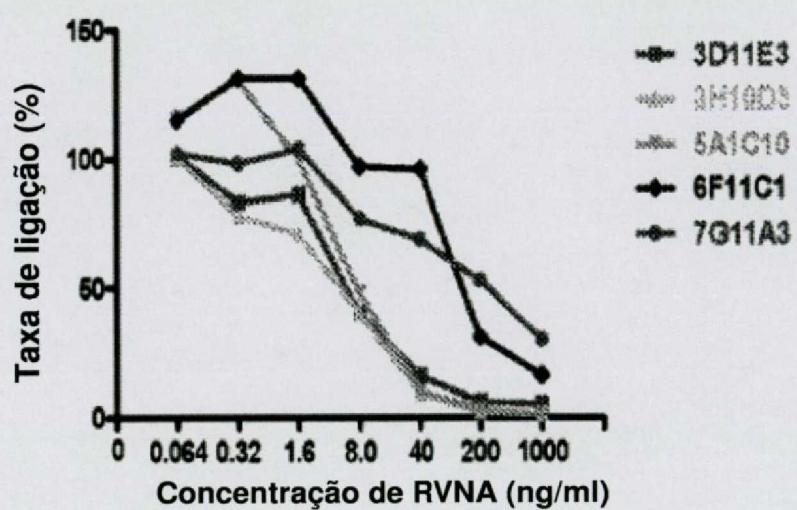
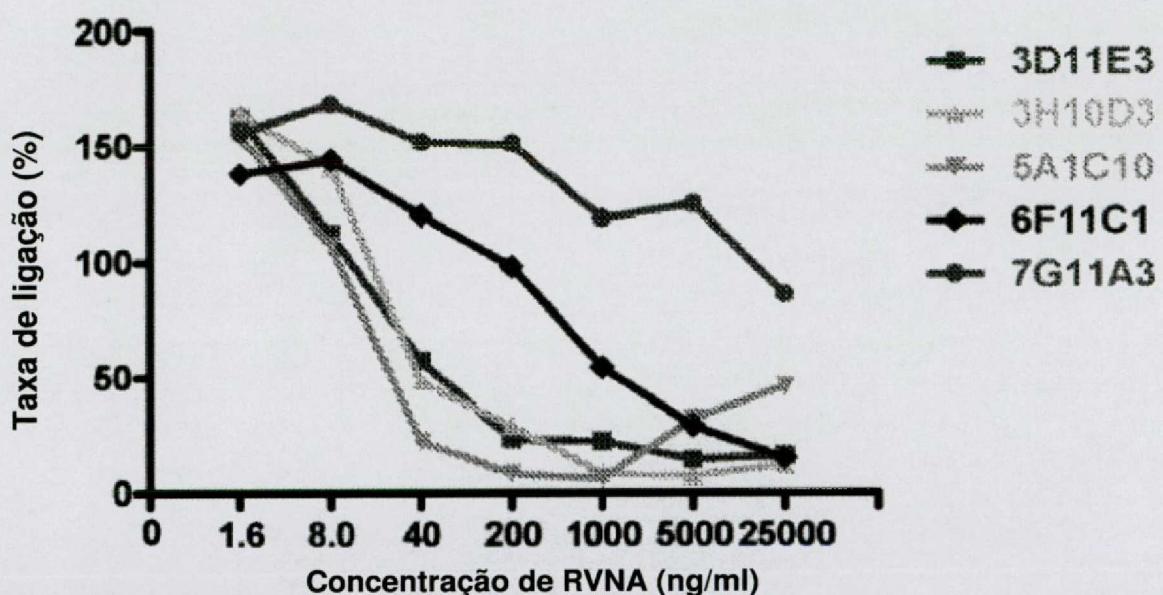


FIG. 5E

Ligaçāo competitiva de 3H10D3-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5F**

Ligaçāo competitiva de 3H10D3-HRP à glicoproteína de RV

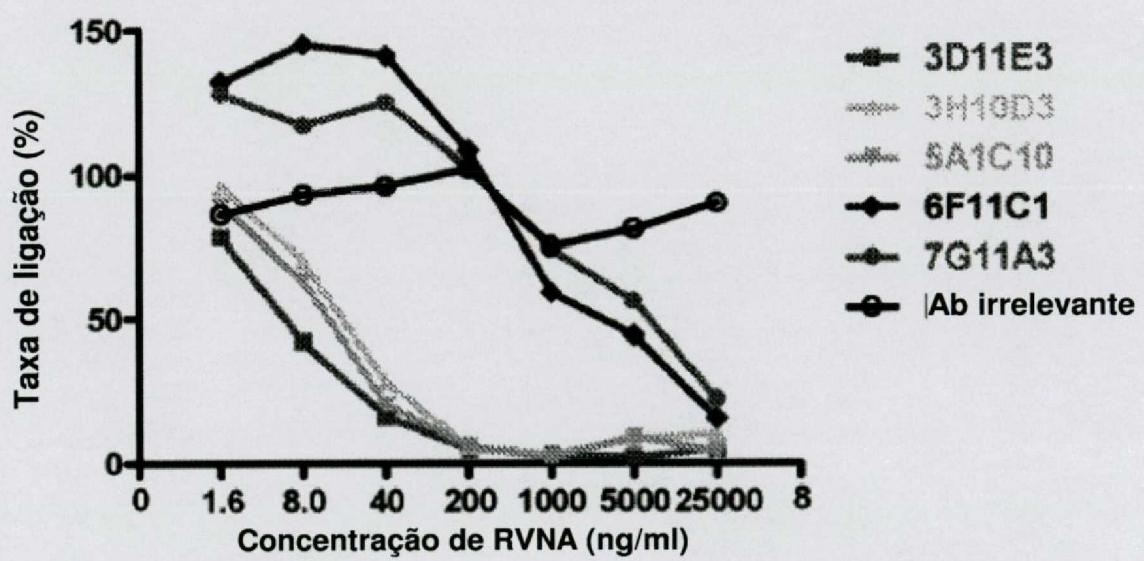
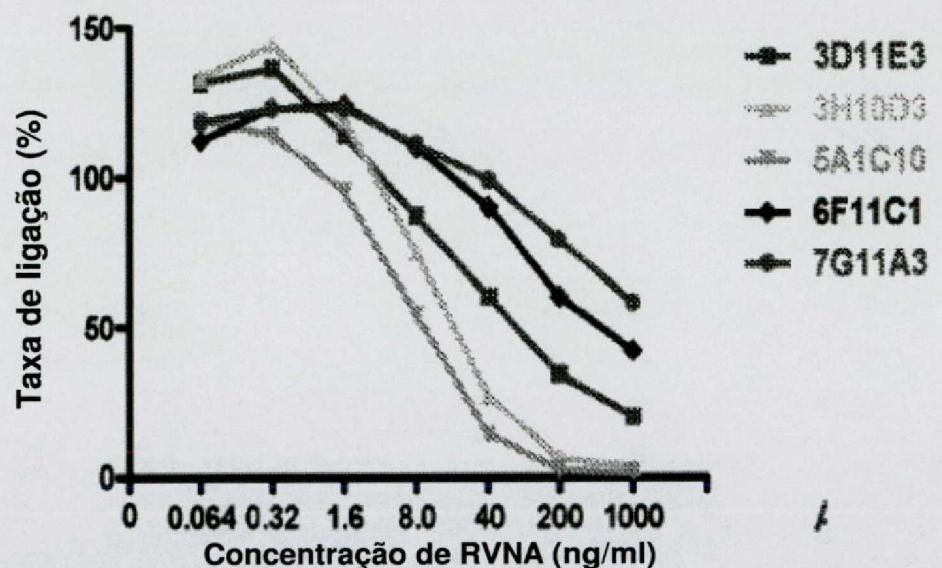


FIG. 5G

Ligaçāo competitiva de 5A1C10-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5H**

Ligaçāo competitiva de 5A1C10-HRP à glicoproteína de RV

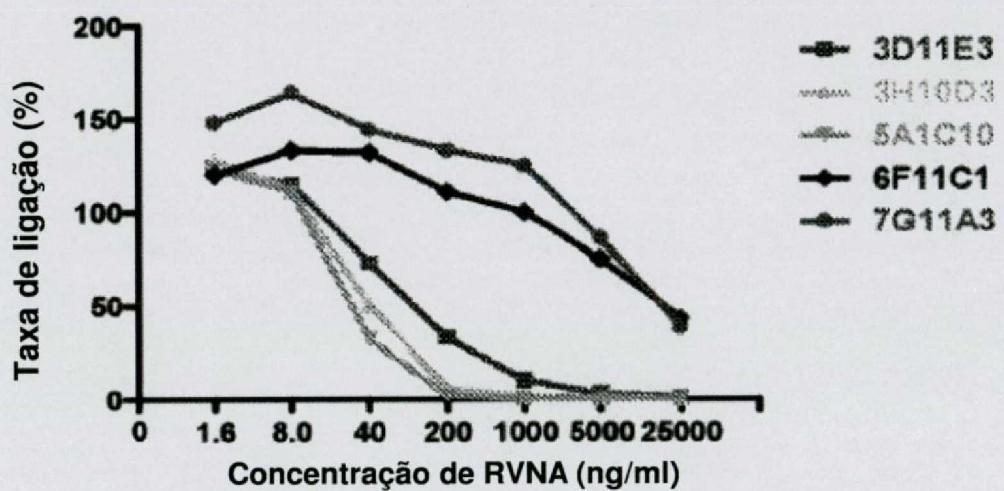
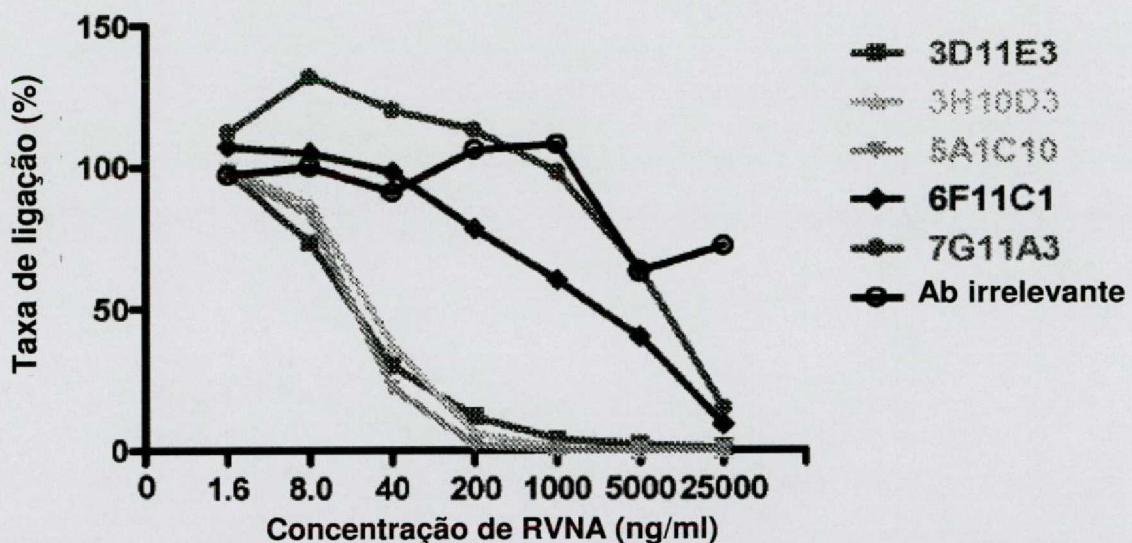


FIG. 5I

Ligaçāo competitiva de 5A1C10-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5J**

Ligaçāo competitiva de 6F11C1-HRP à glicoproteína de RV

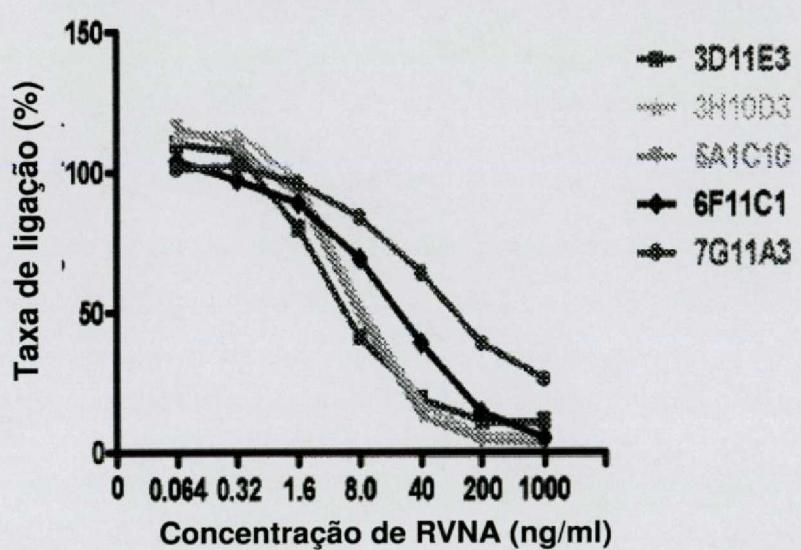
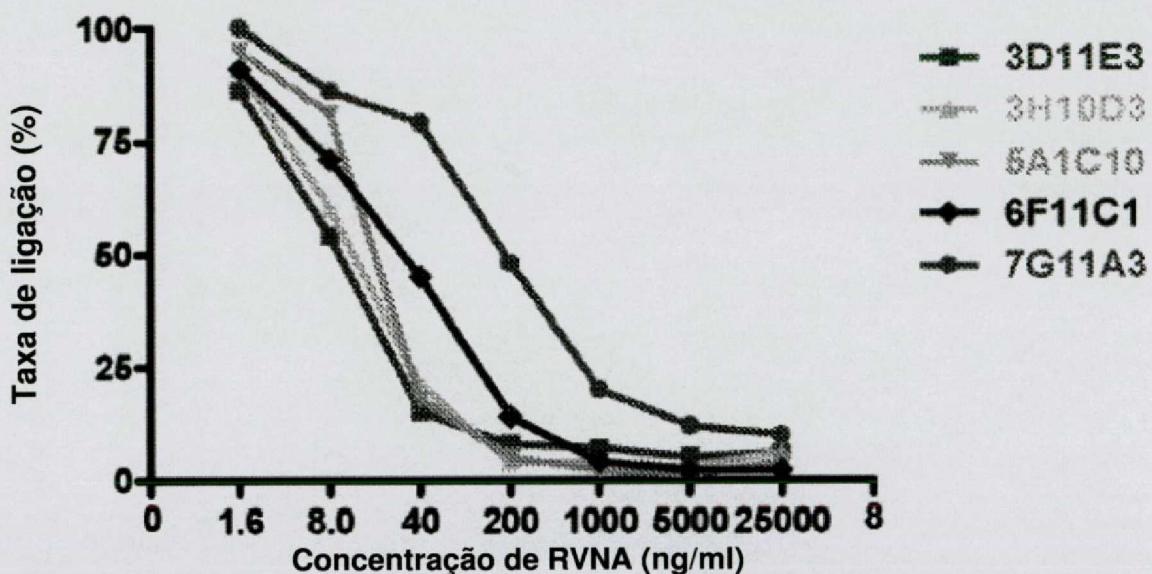


FIG. 5K

Ligaçāo competitiva de 6F11C1-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5L**

Ligaçāo competitiva de 6F11C1-HRP à glicoproteína de RV

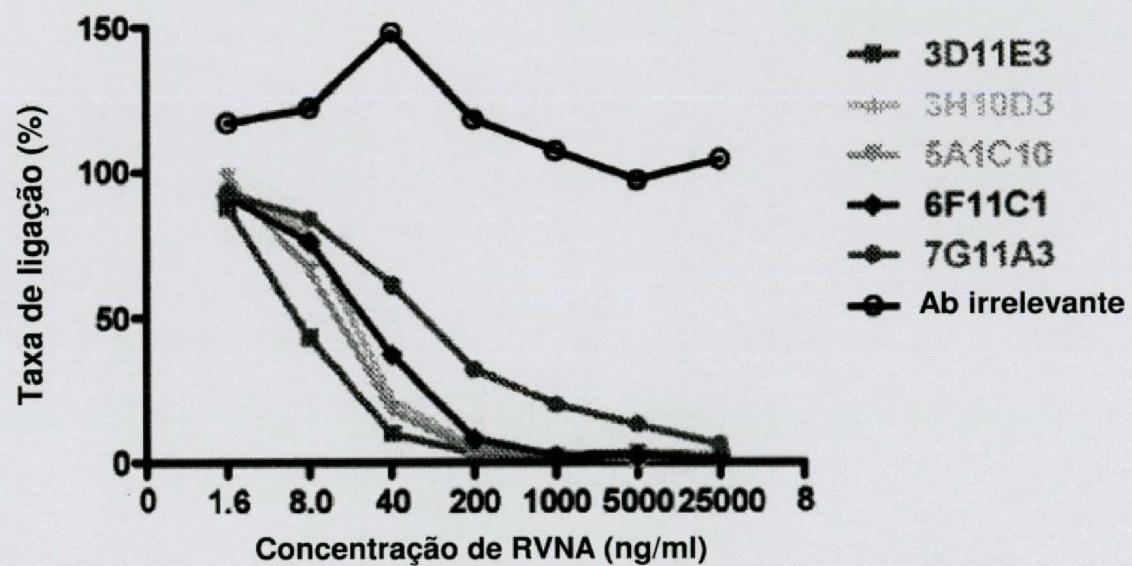
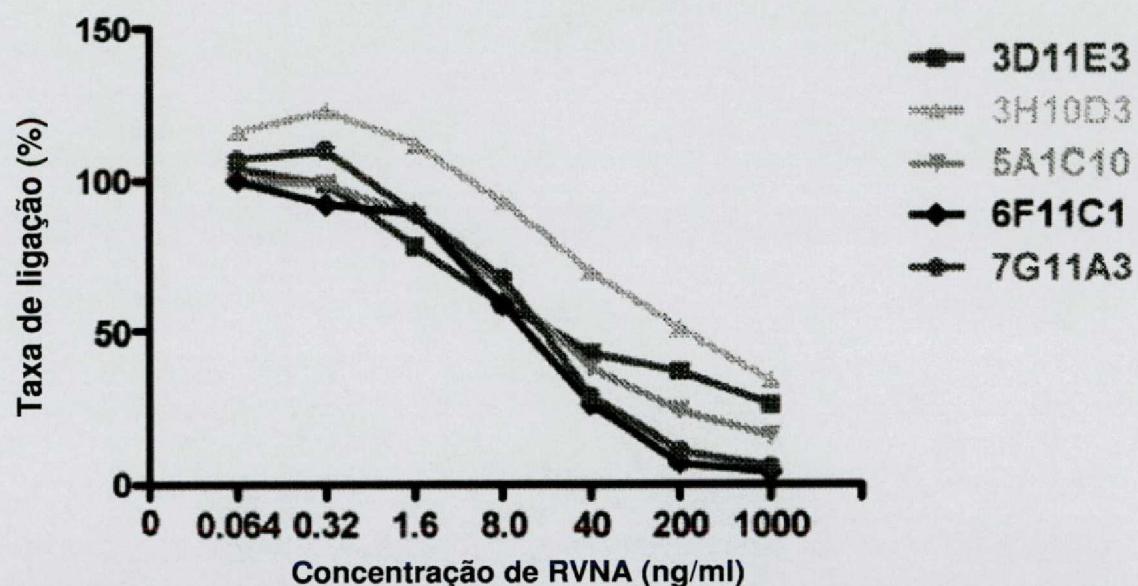


FIG. 5M

Ligação competitiva de 7G11A3-HRP à glicoproteína de RV

**FIG. 5N**

Ligação competitiva de 7G11A3-HRP à glicoproteína de RV

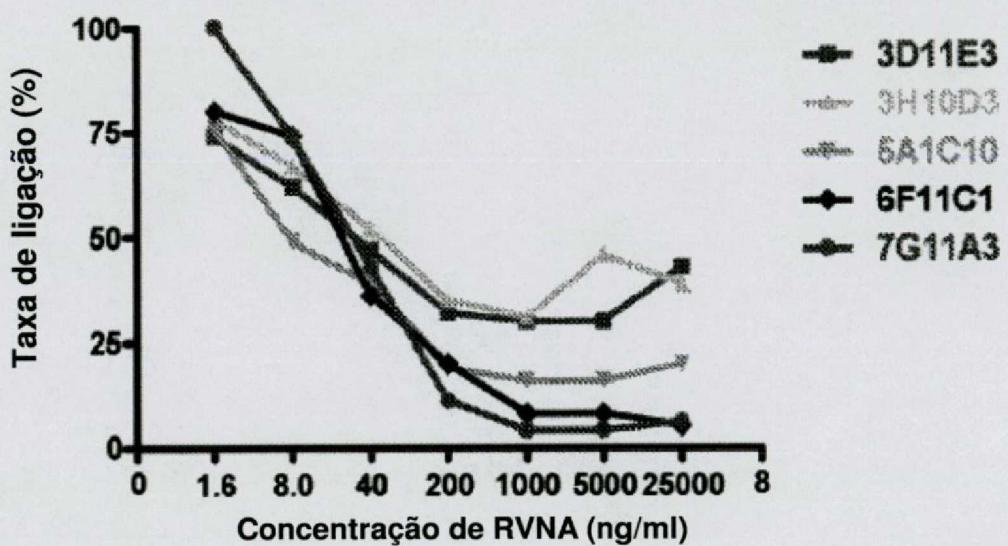


FIG. 50

Ligaçāo competitiva de 7G11A3-HRP à glicoproteína de RV

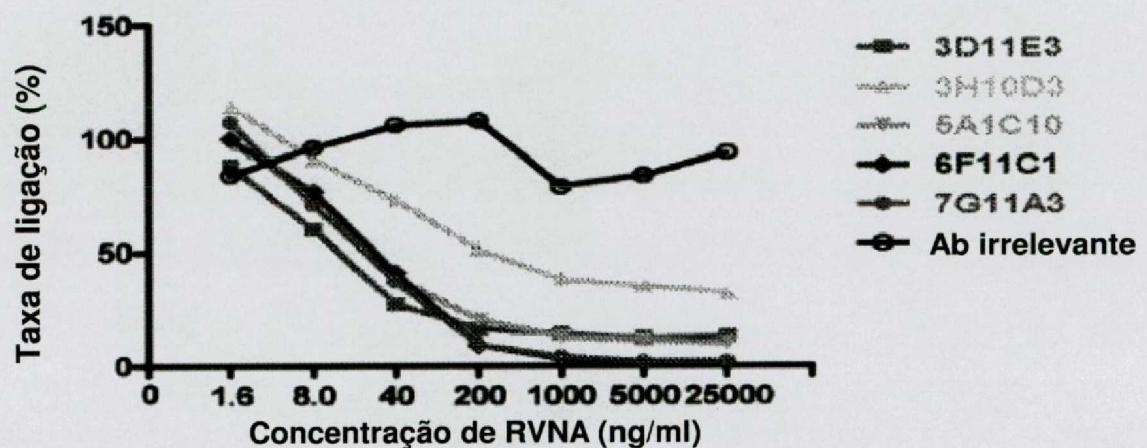


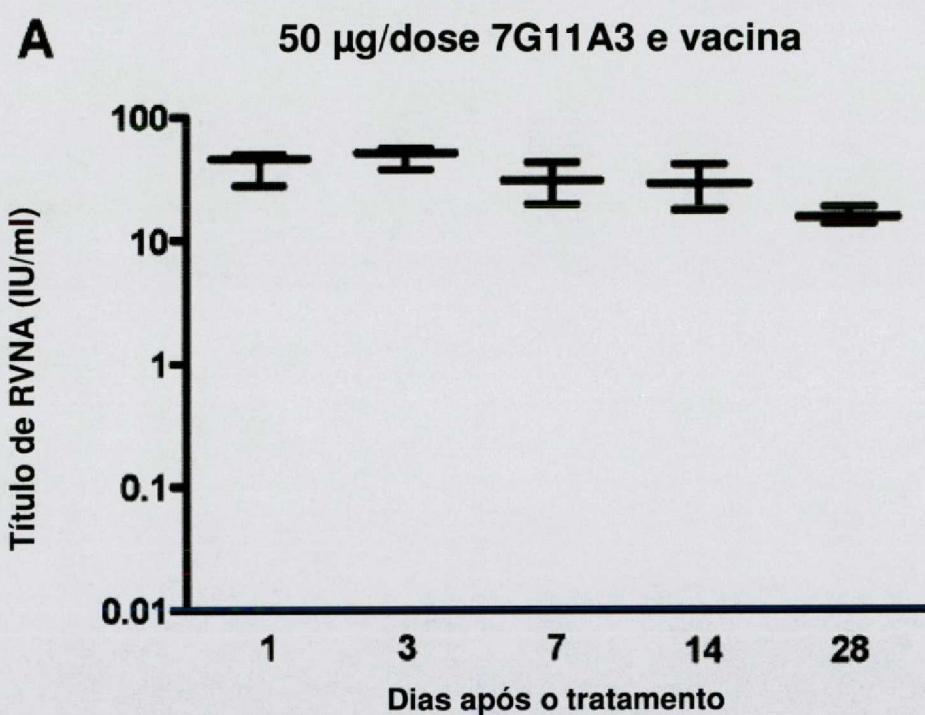
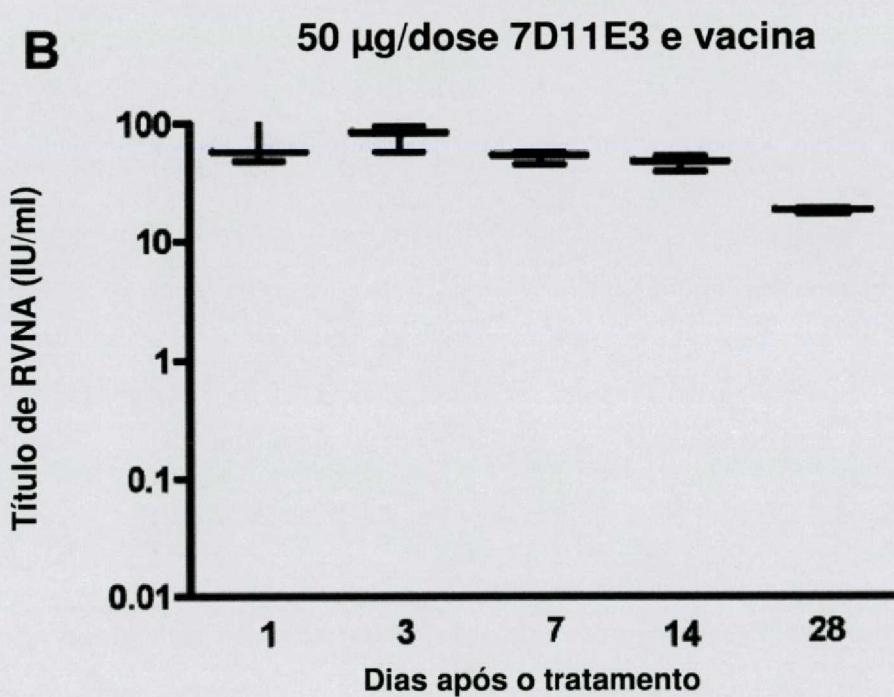
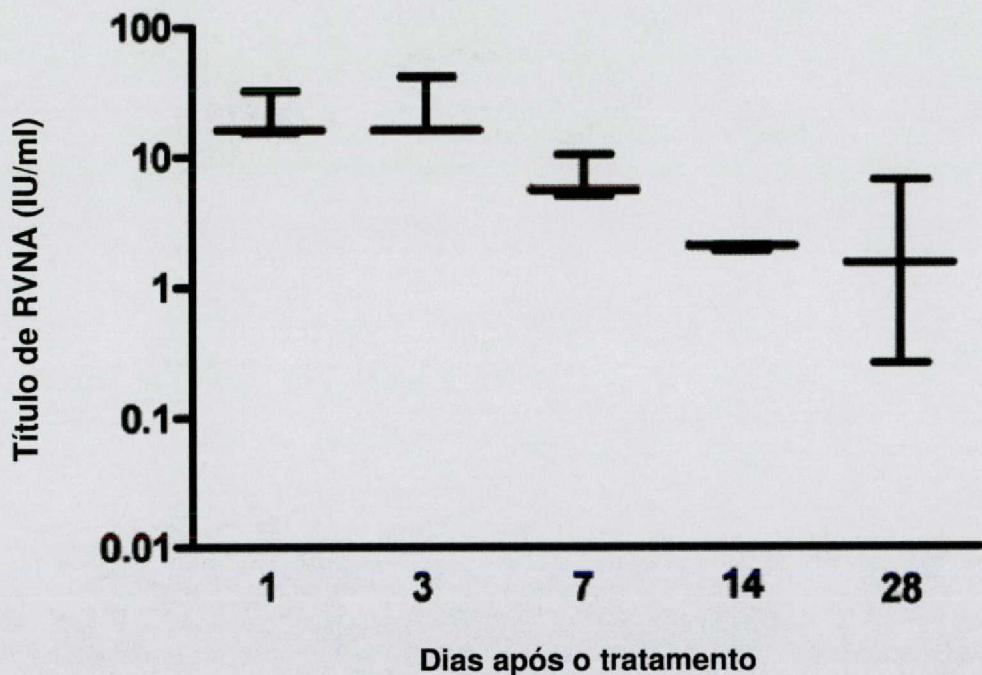
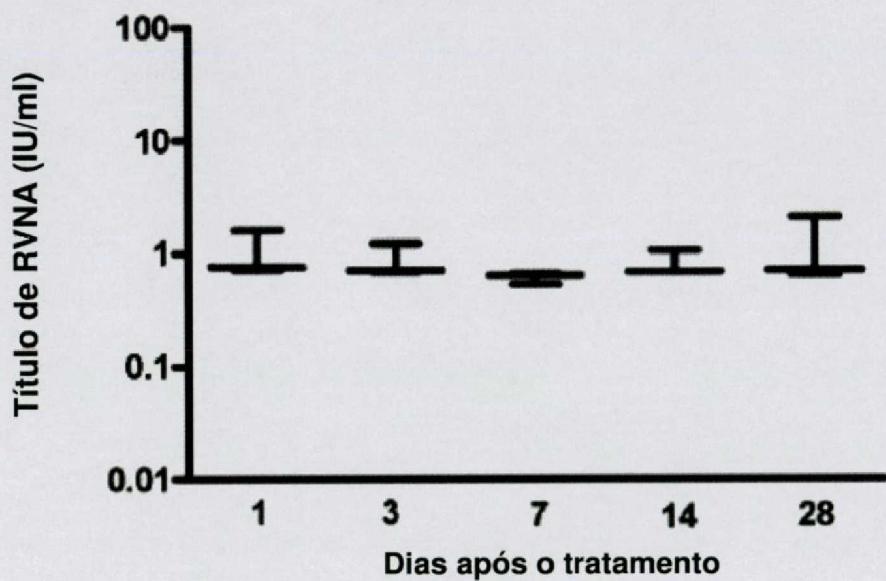
FIG. 6A**FIG. 6B**

FIG. 6C**C** 50 µg/dose 3H10D3 e vacina**FIG. 6D****D** 20 IU/kg HRIG e vacina

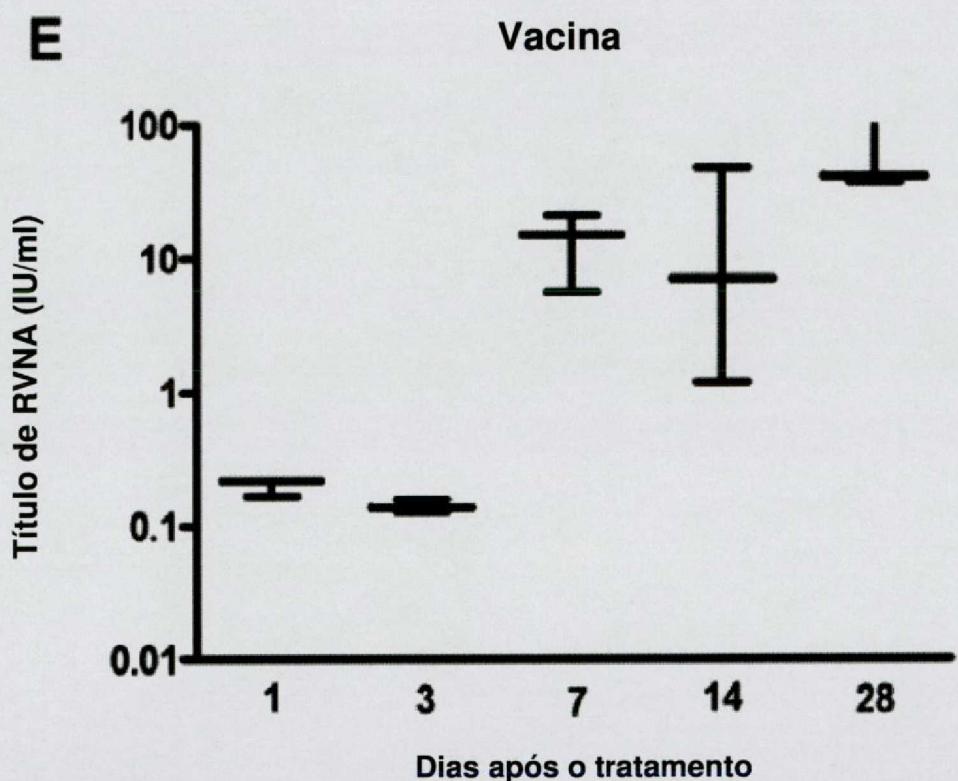


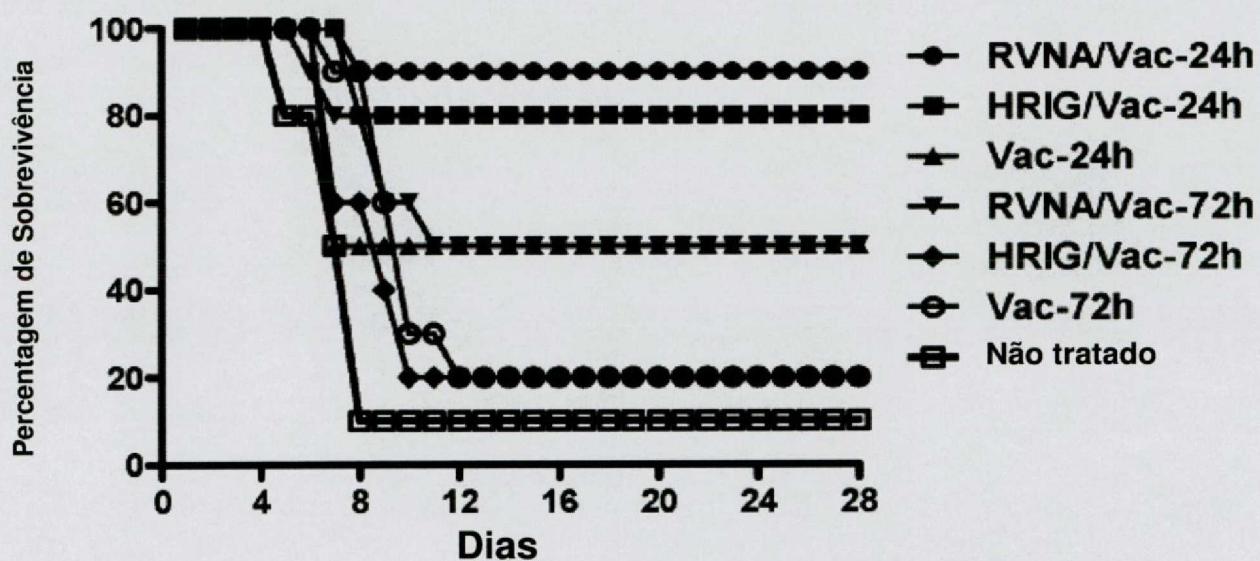
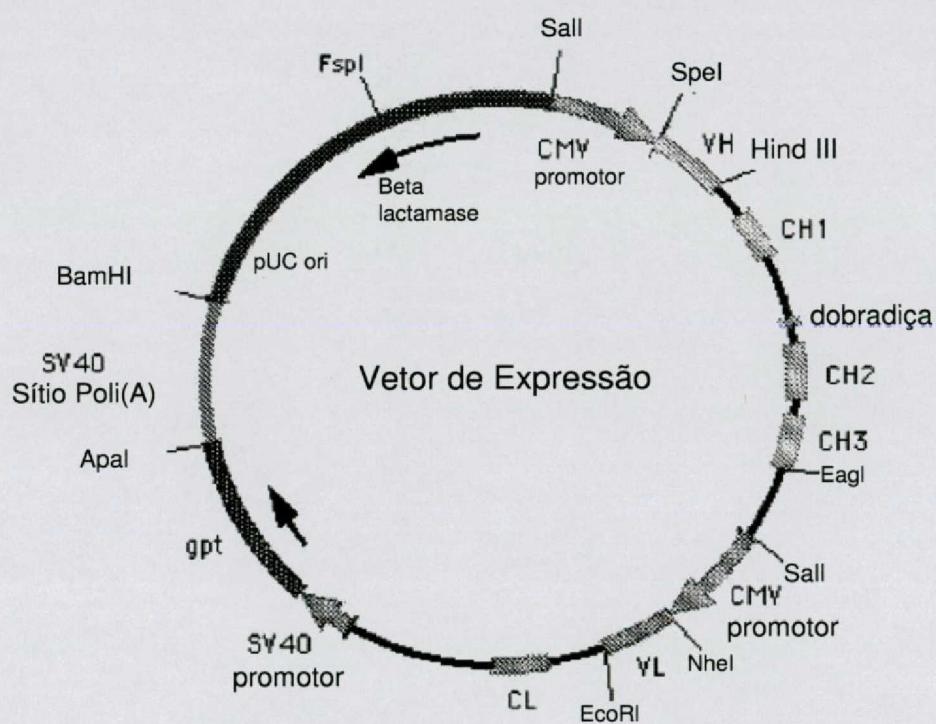
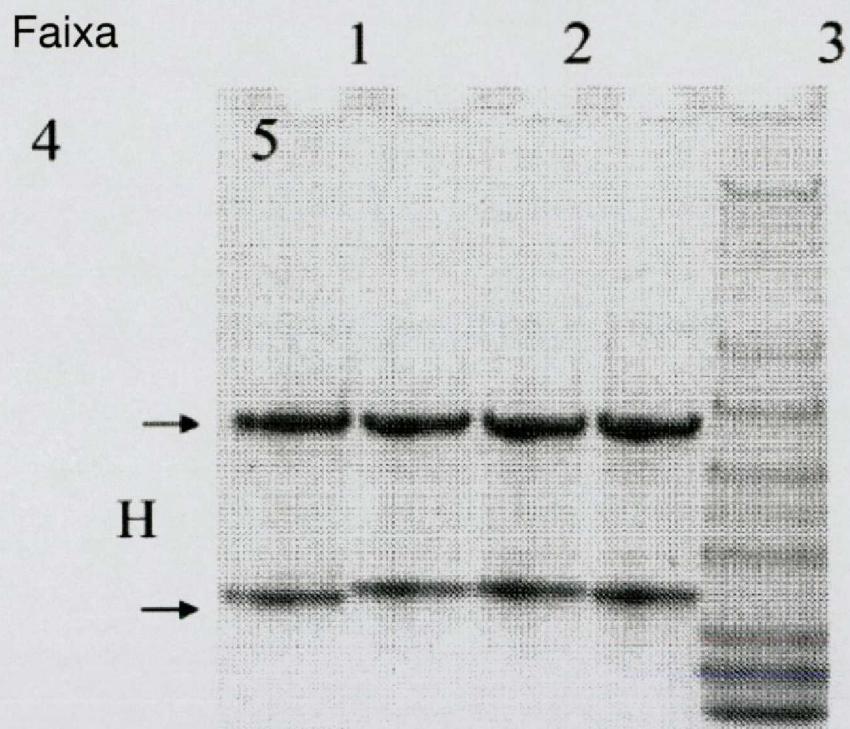
FIG. 7**FIG. 8**

FIG. 9**FIG. 10**

Ligaçāo Rabipur®ELISA

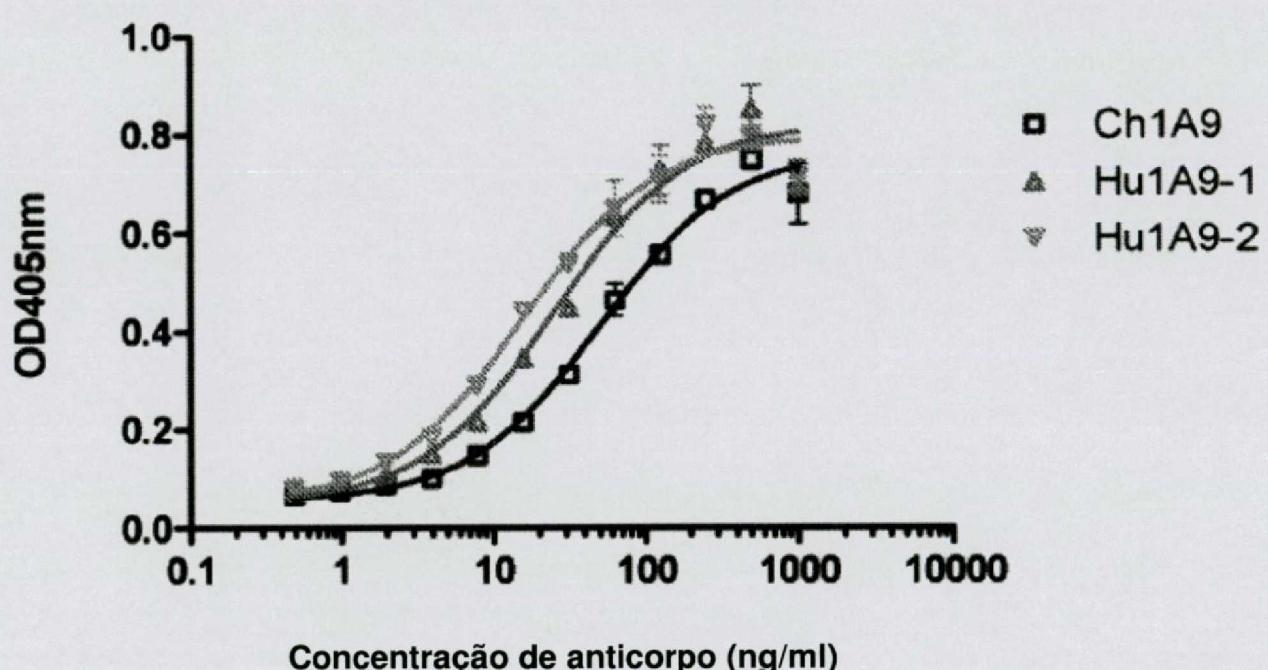


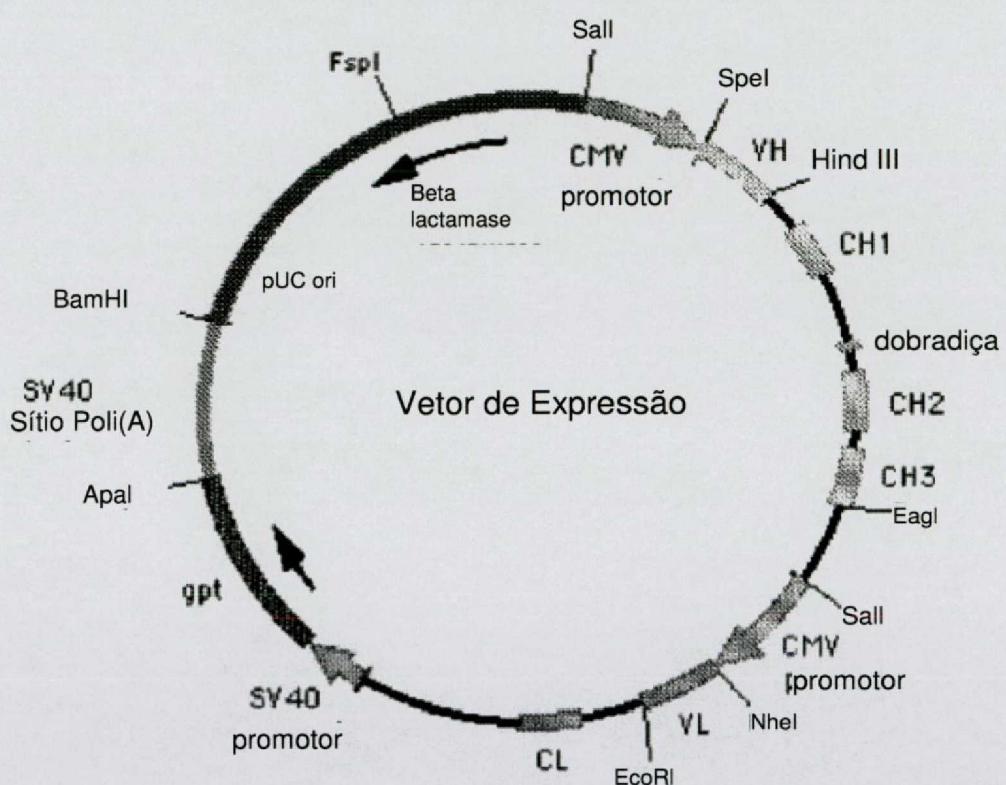
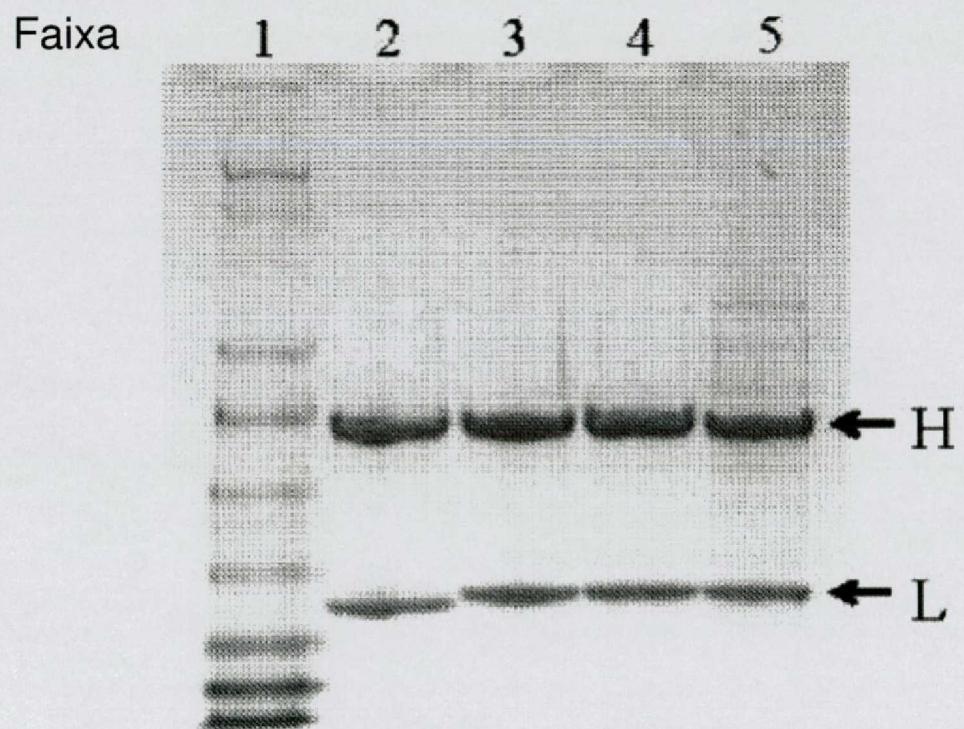
FIG. 11**FIG. 12**

FIG. 13

Ligaçāo de 7G11A3 1H5 a Rapibur®

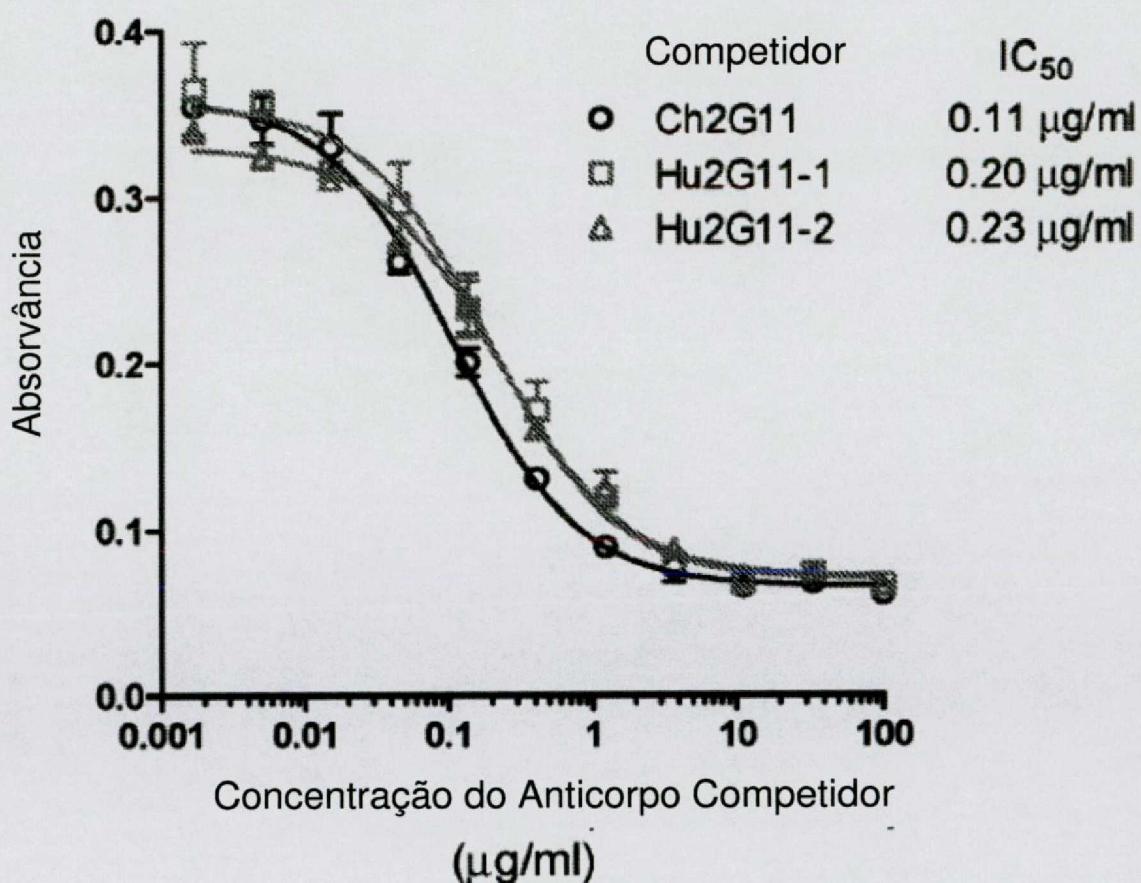
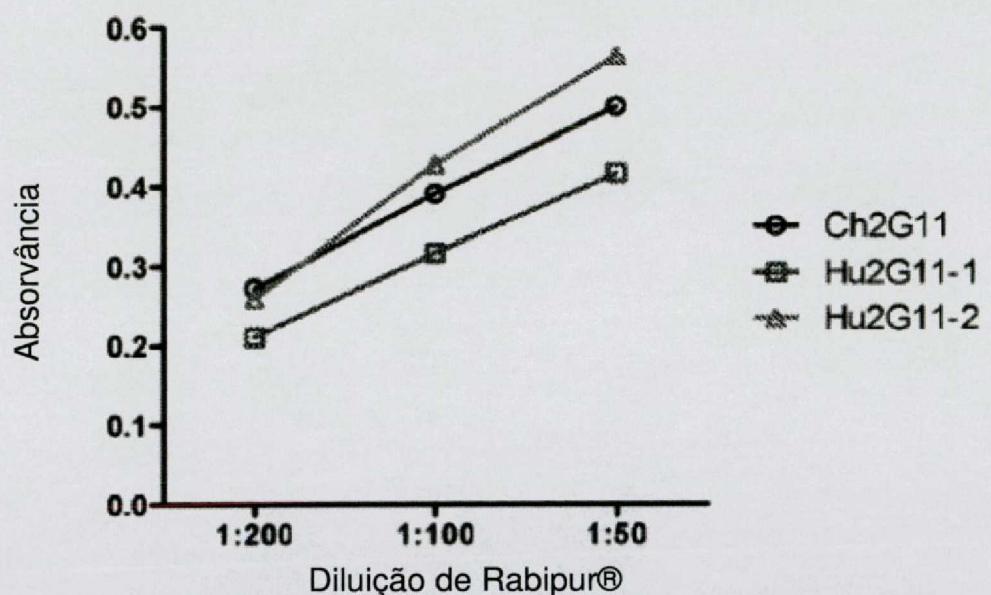


FIG. 14A

Revestimento com 2,5 µg/ml de anticorpo

**FIG. 14B**

Revestimento com 1 µg/ml de anticorpo

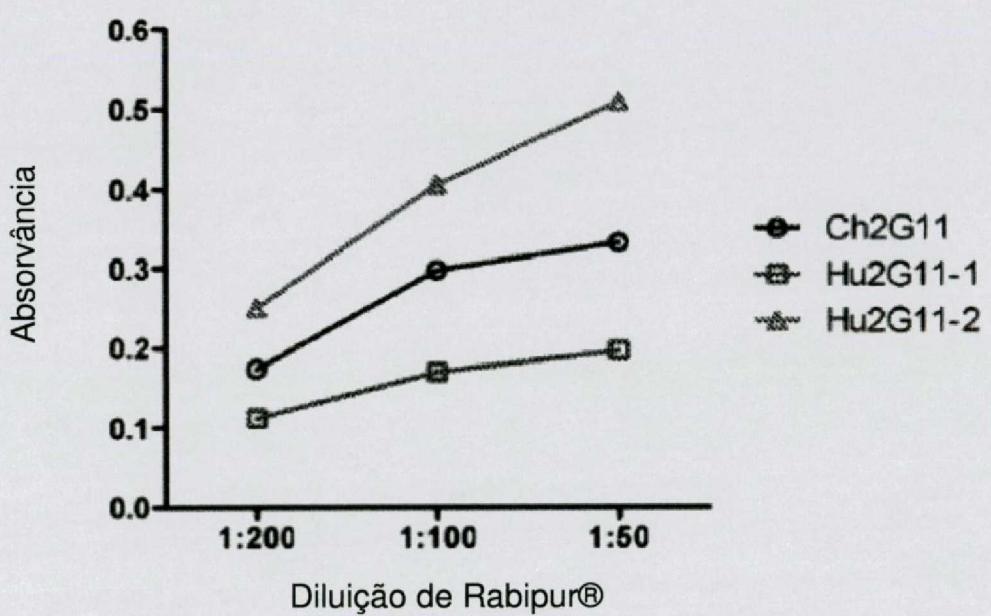


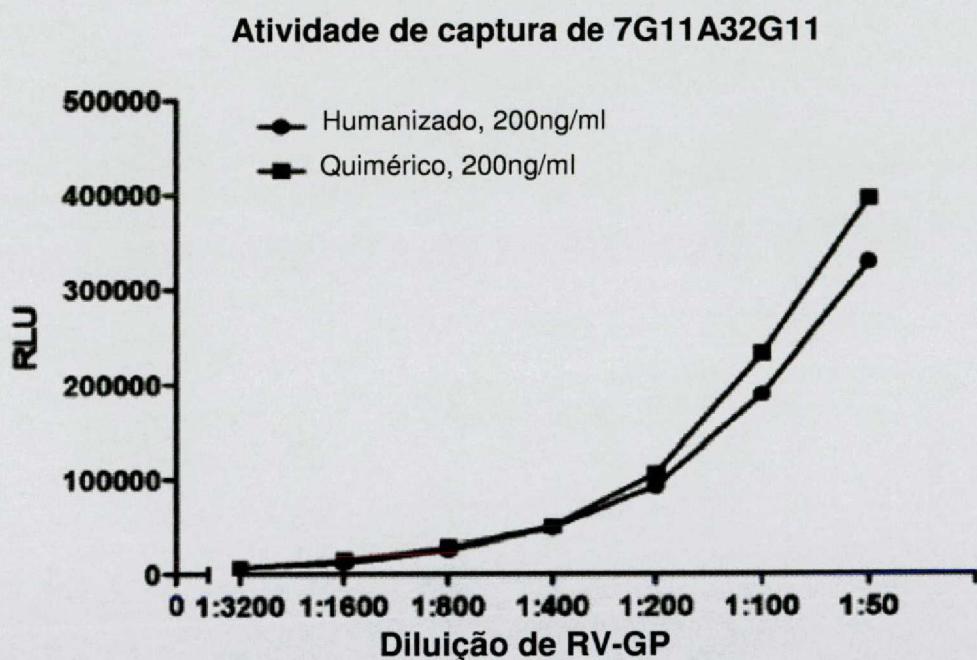
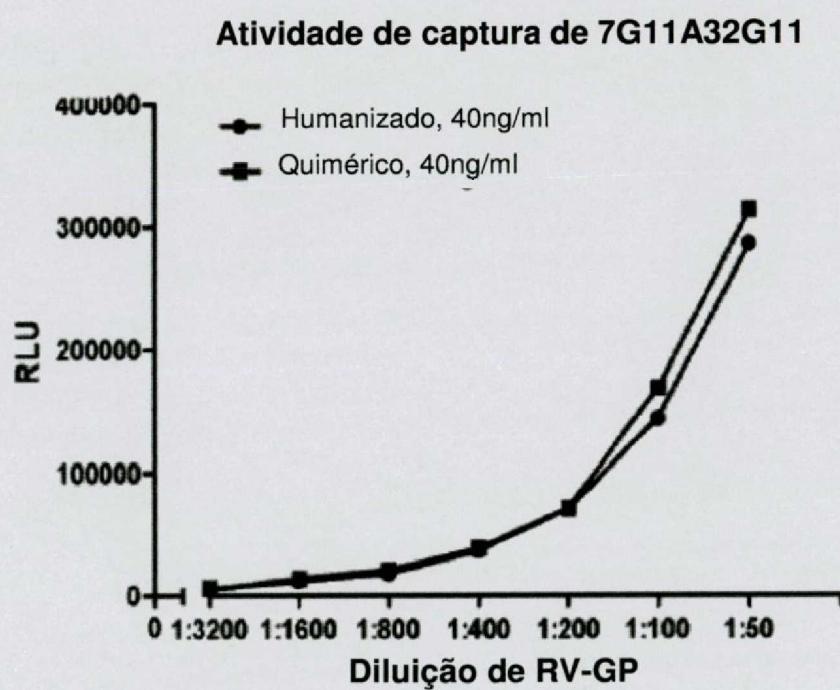
FIG. 15A**FIG. 15B**

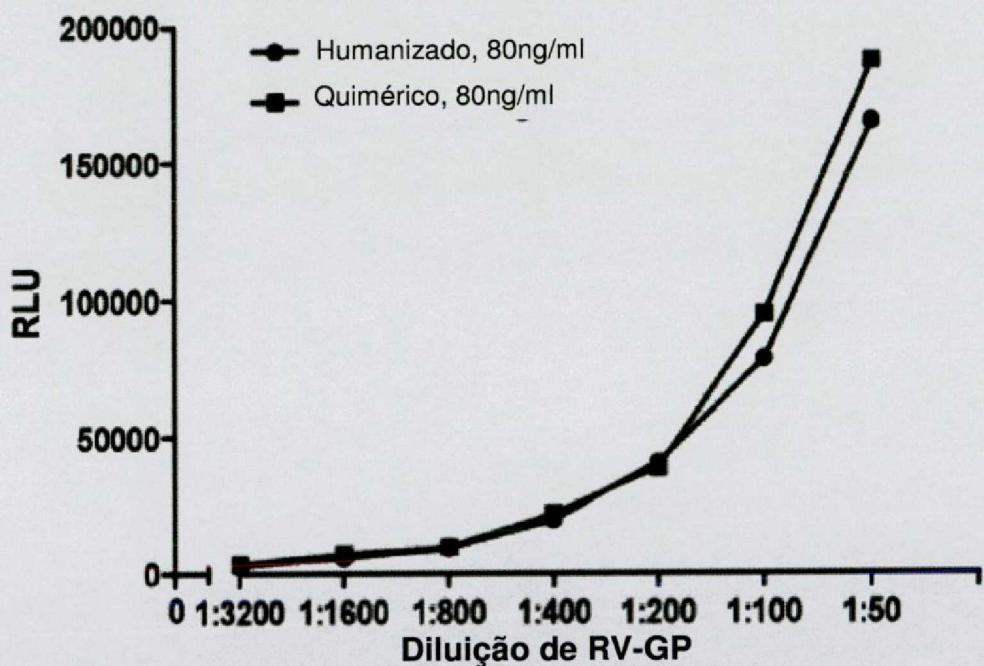
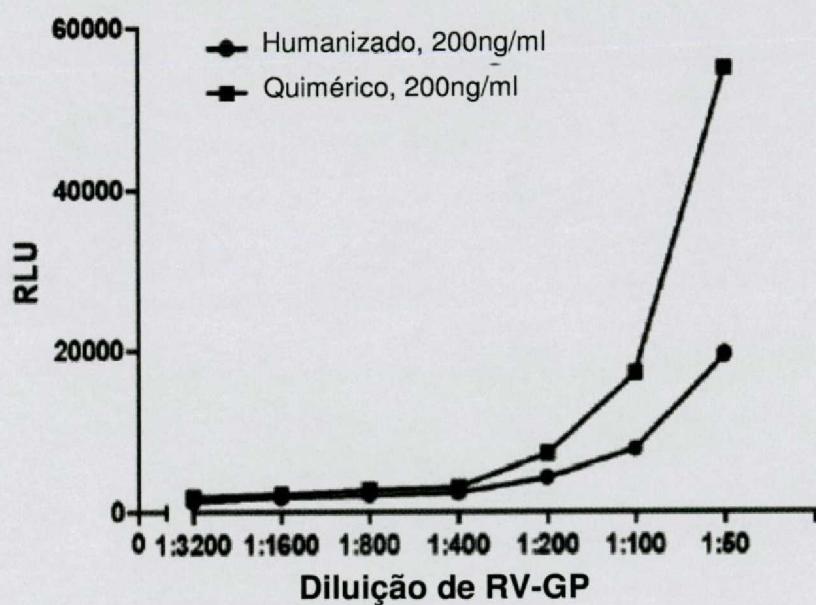
FIG. 15C**Atividade de captura de 7G11A32G11****FIG. 15D****Atividade de detecção de 7G11A32G11**

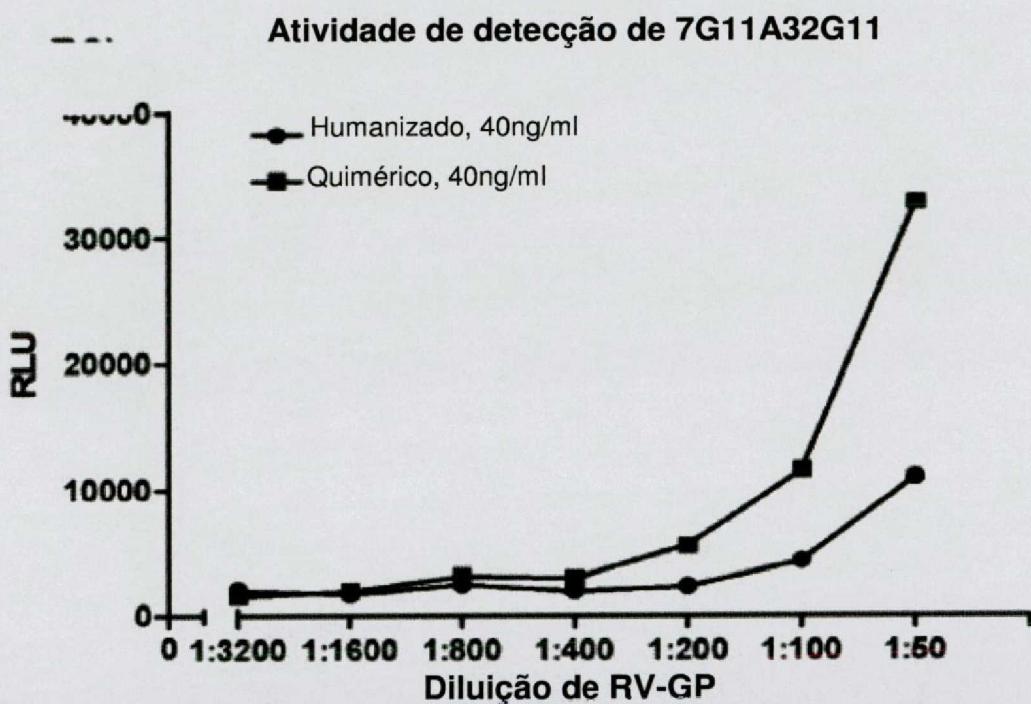
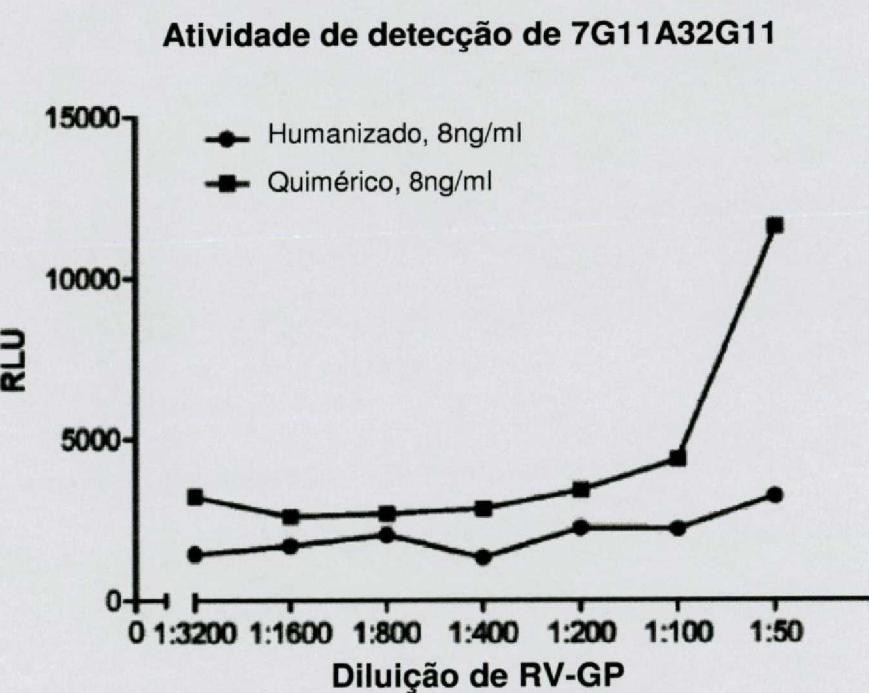
FIG. 15E**FIG. 15F**

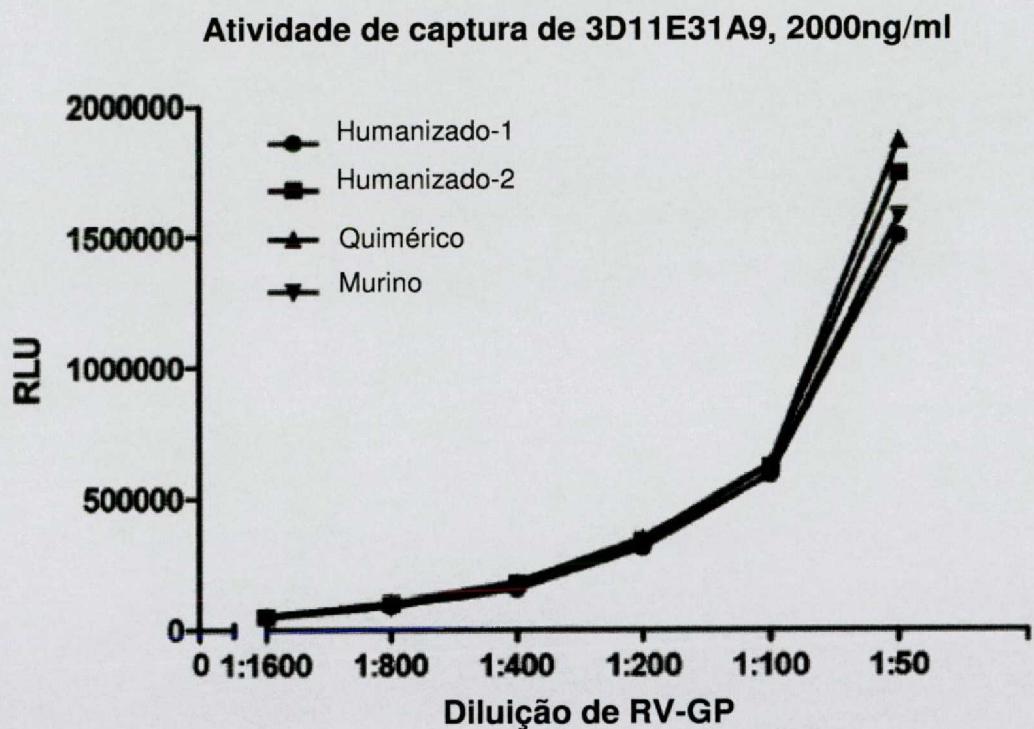
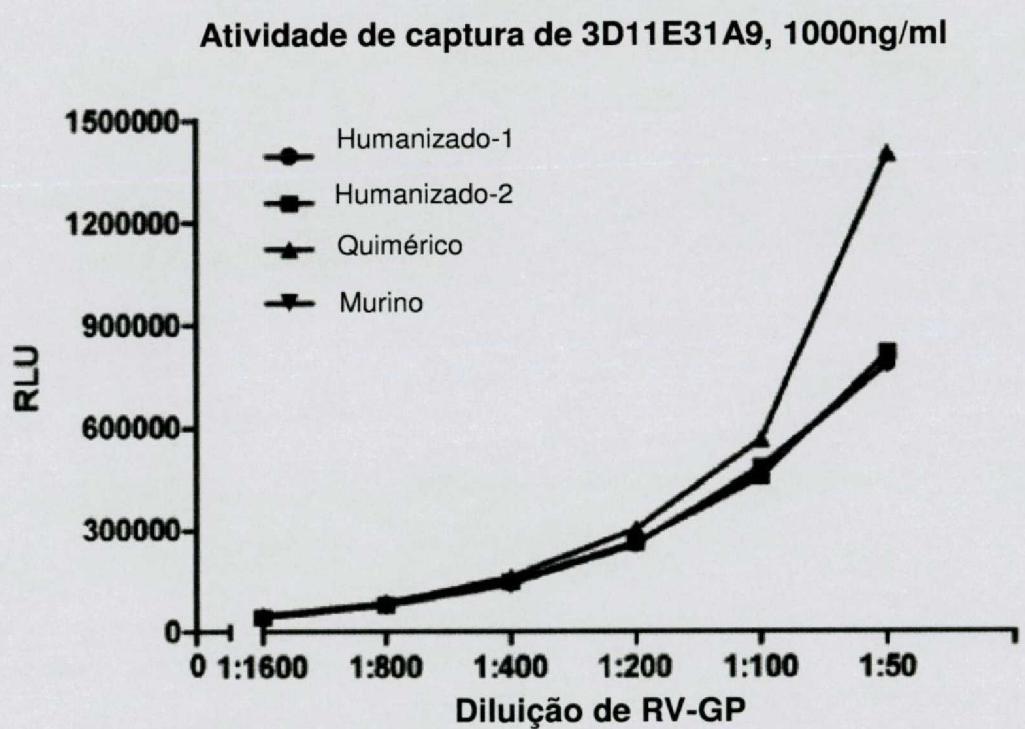
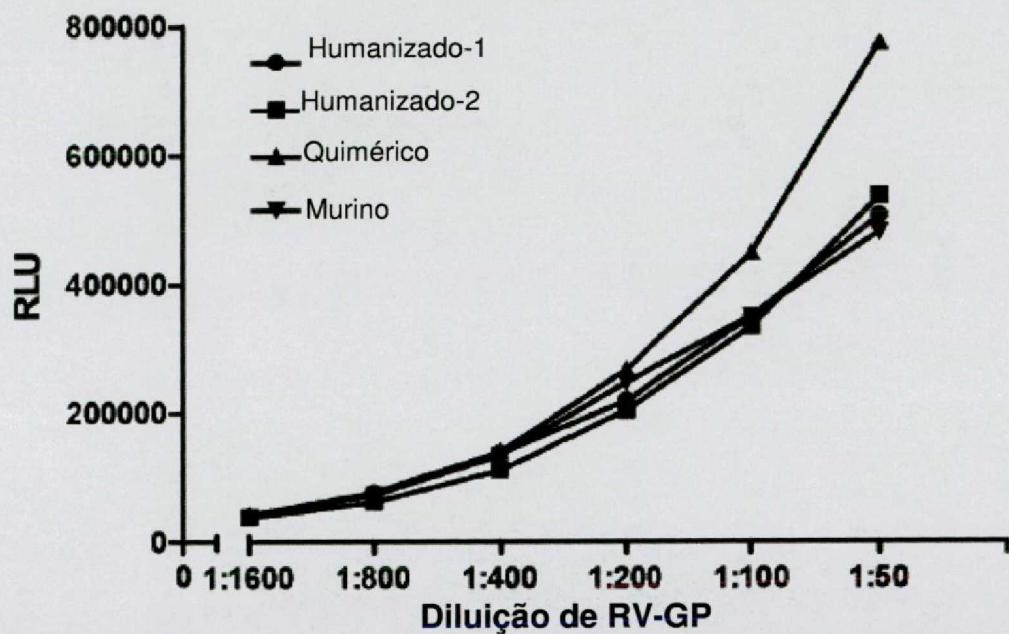
FIG. 16A**FIG. 16B**

FIG. 16C

Atividade de captura de 3D11E31A9, 500ng/ml

**FIG. 16D**

Atividade de captura de 3D11E31A9, 250ng/ml

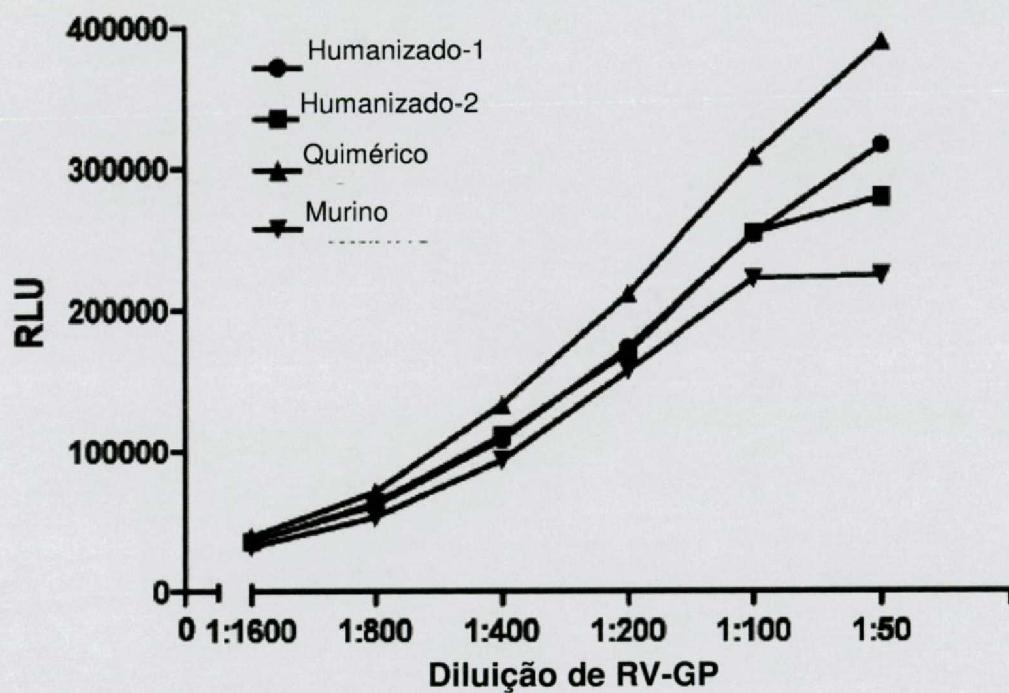


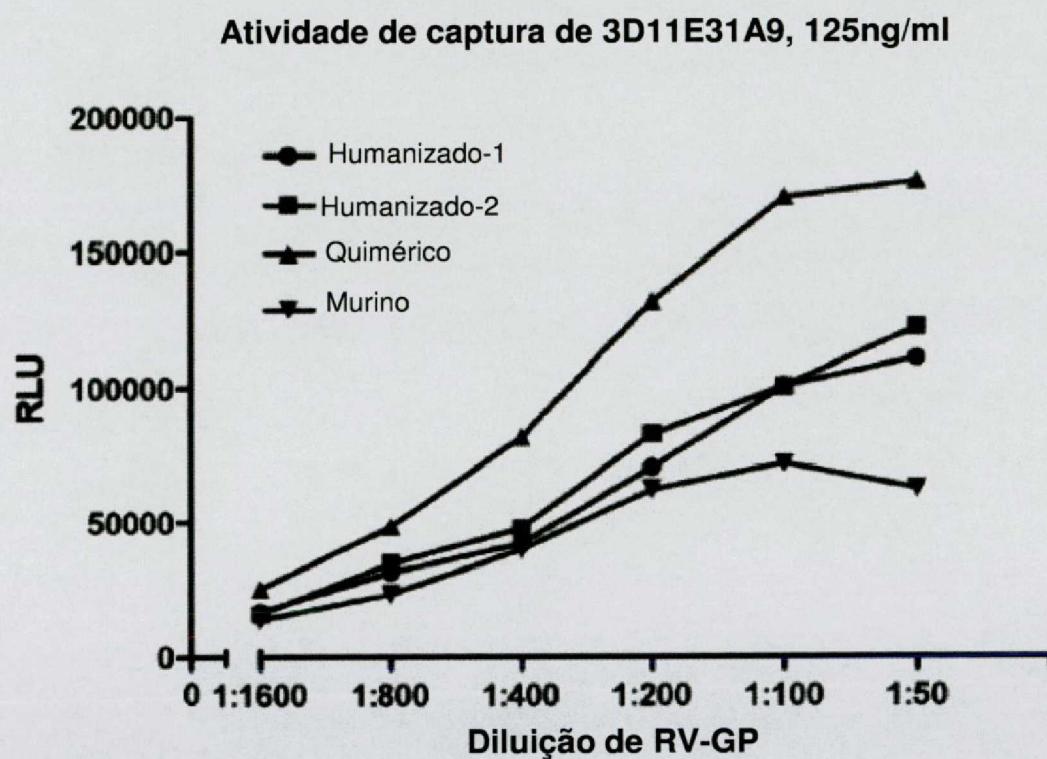
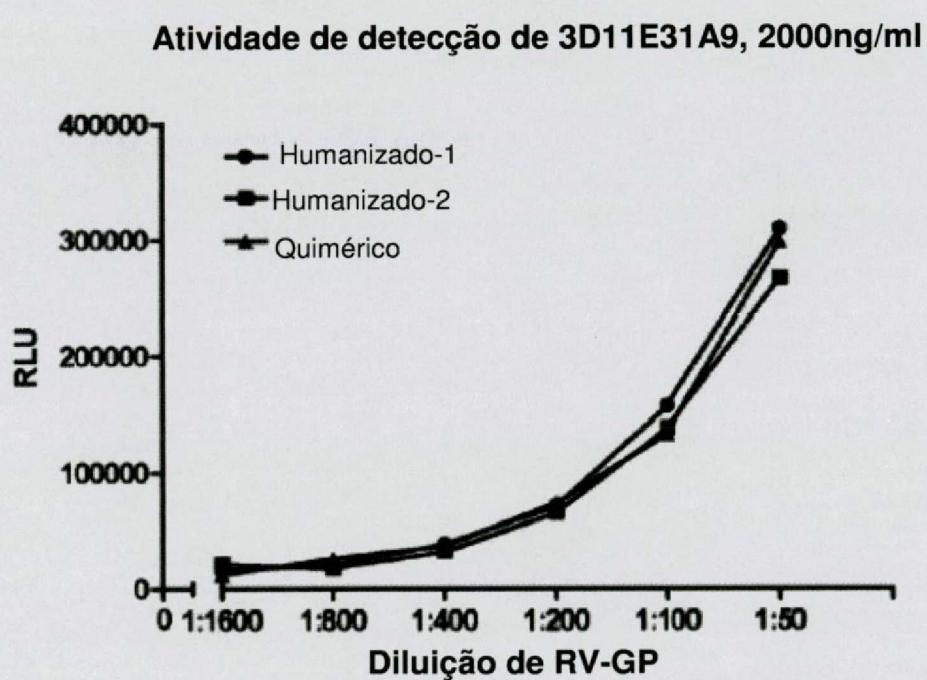
FIG. 16E**FIG. 16F**

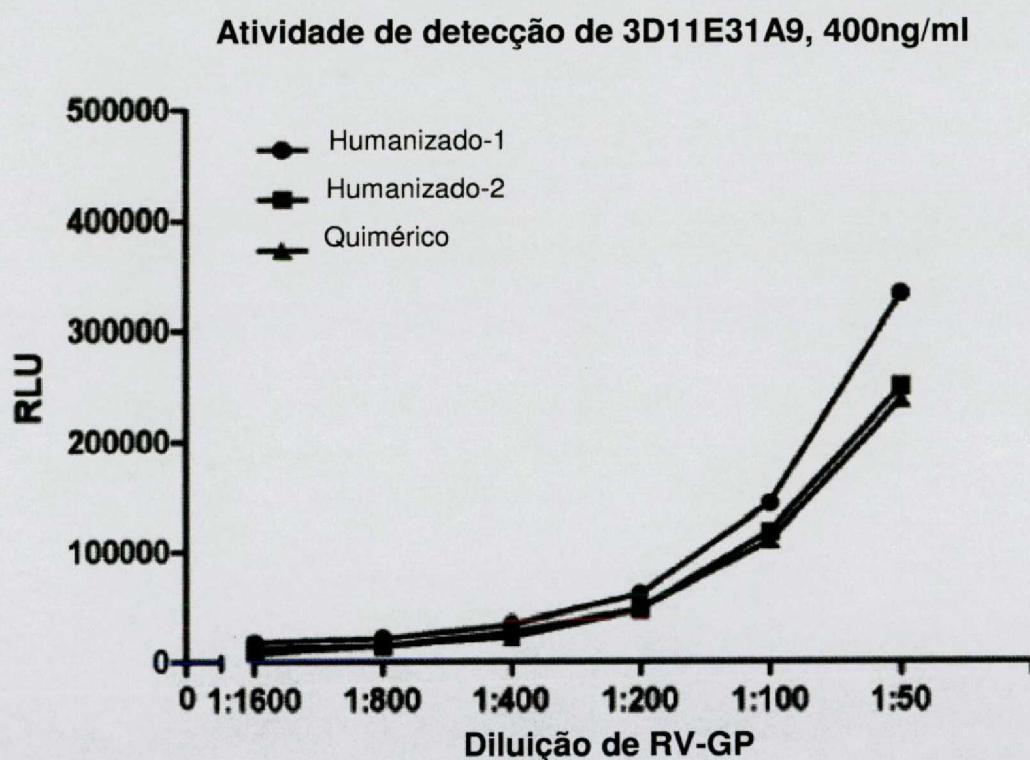
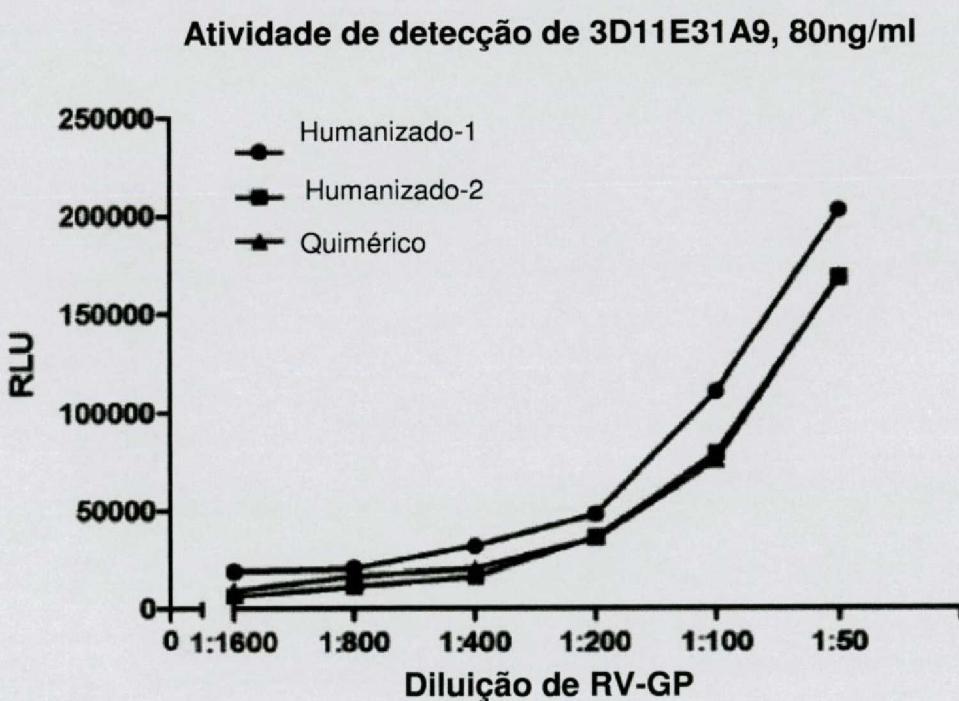
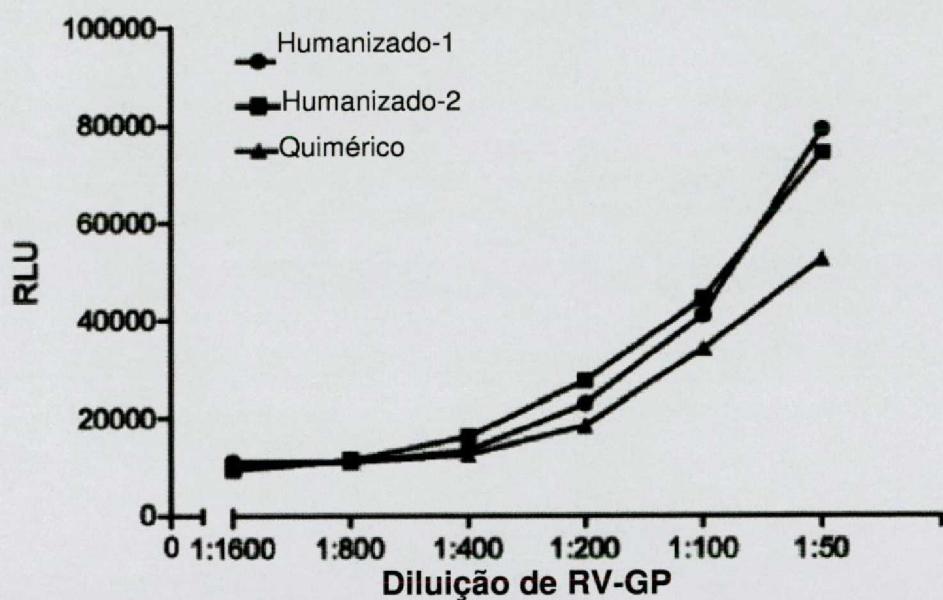
FIG. 16G**FIG. 16H**

FIG. 16I

Atividade de detecção de 3D11E31A9, 16ng/ml

**FIG. 16J**

Atividade de detecção de 3D11E31A9, 3.2ng/ml

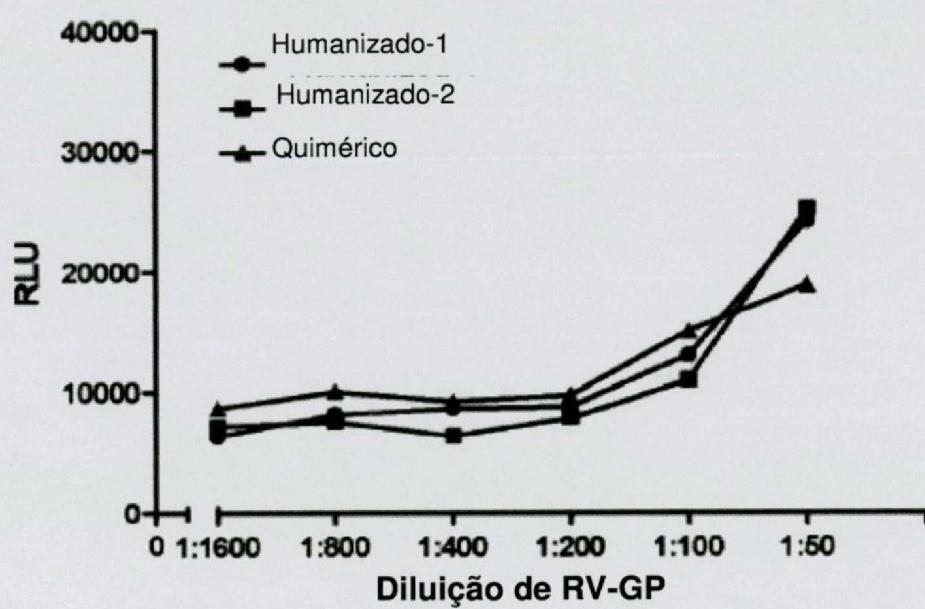


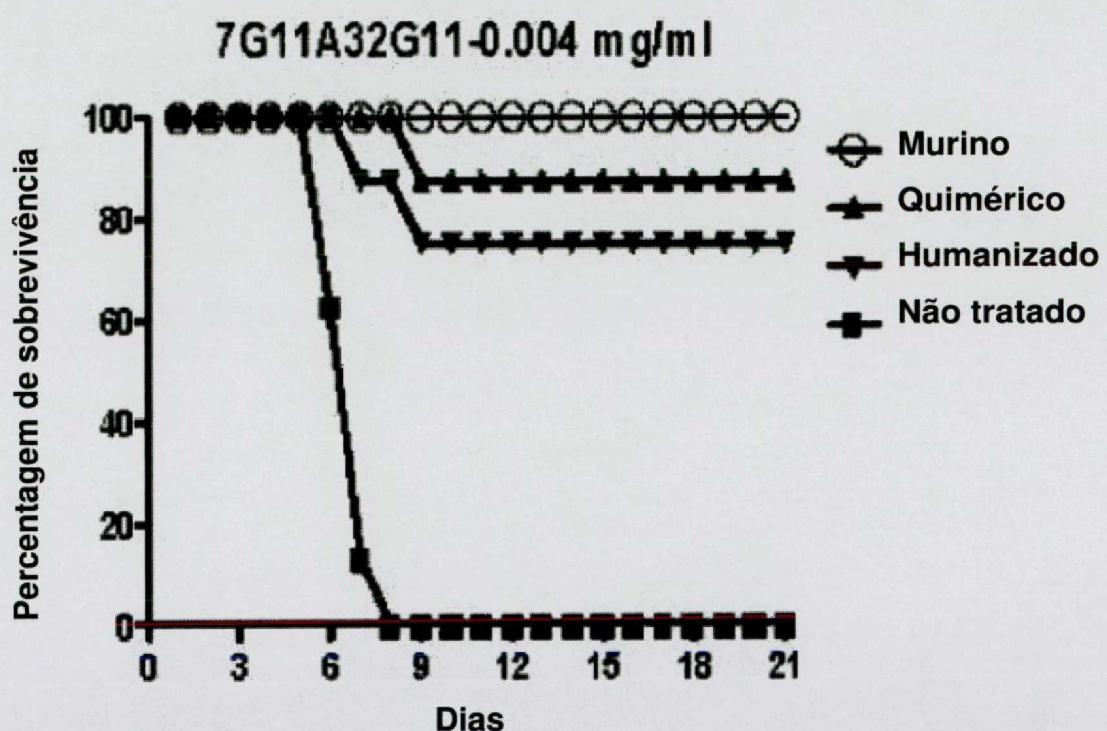
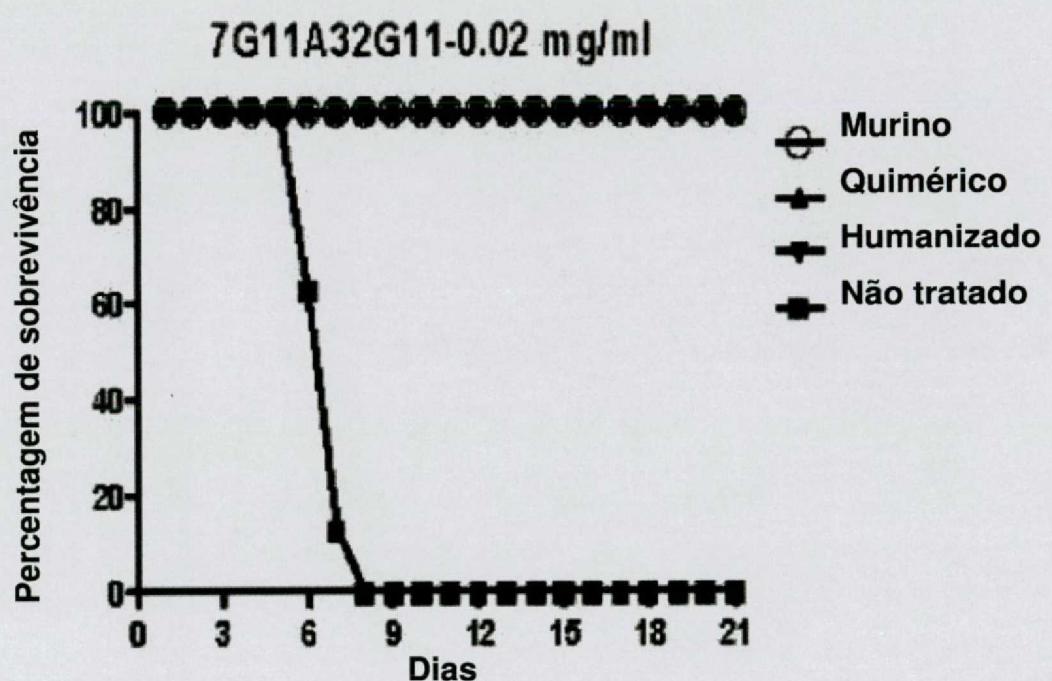
FIG. 17A**FIG. 17B**

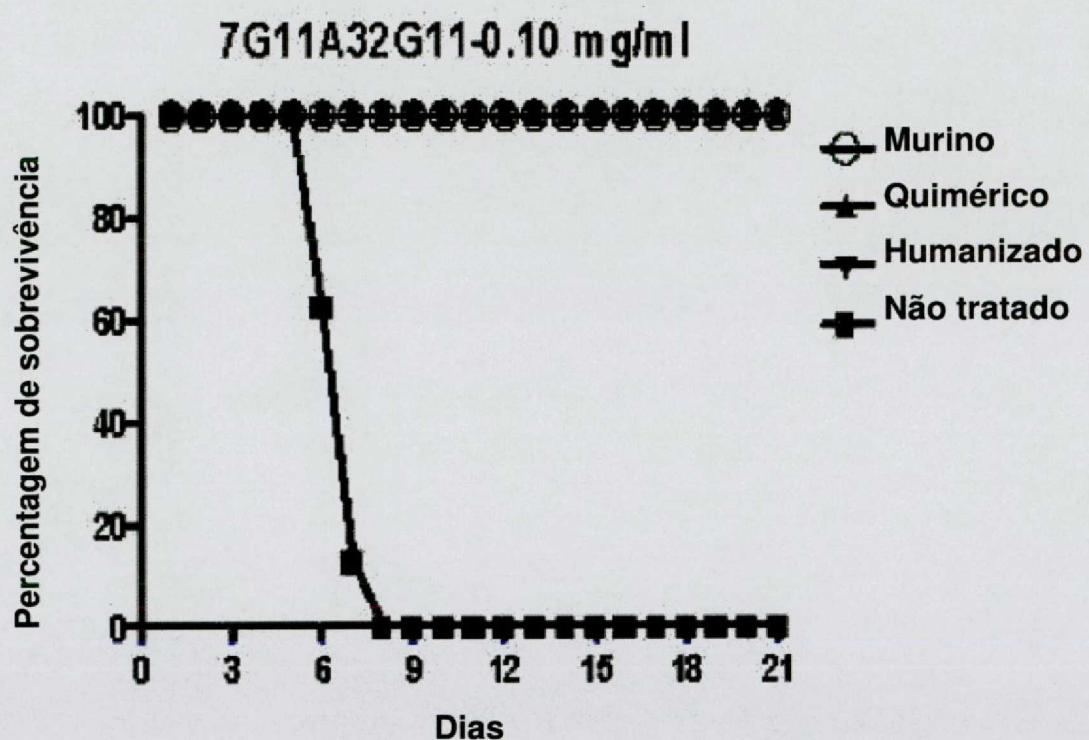
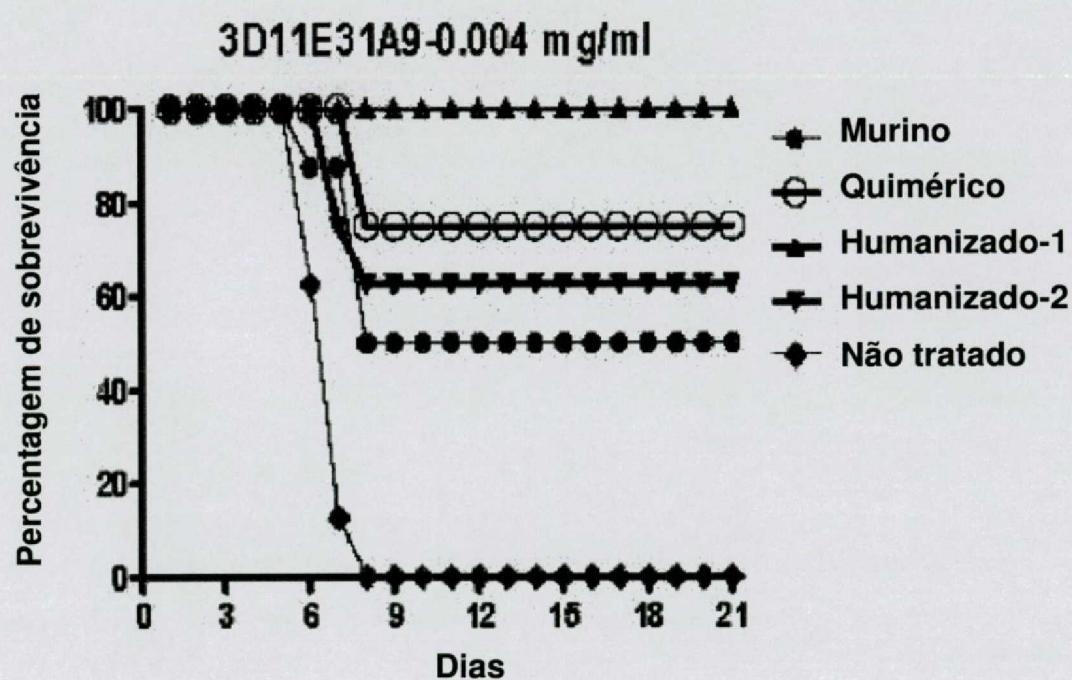
FIG. 17C**FIG. 17D**

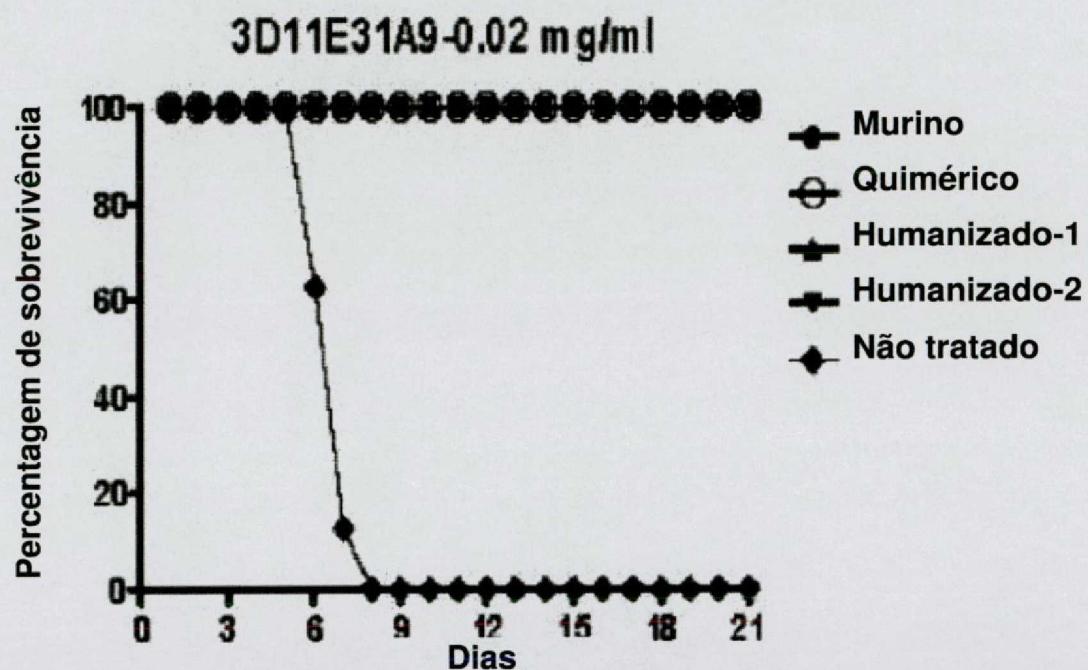
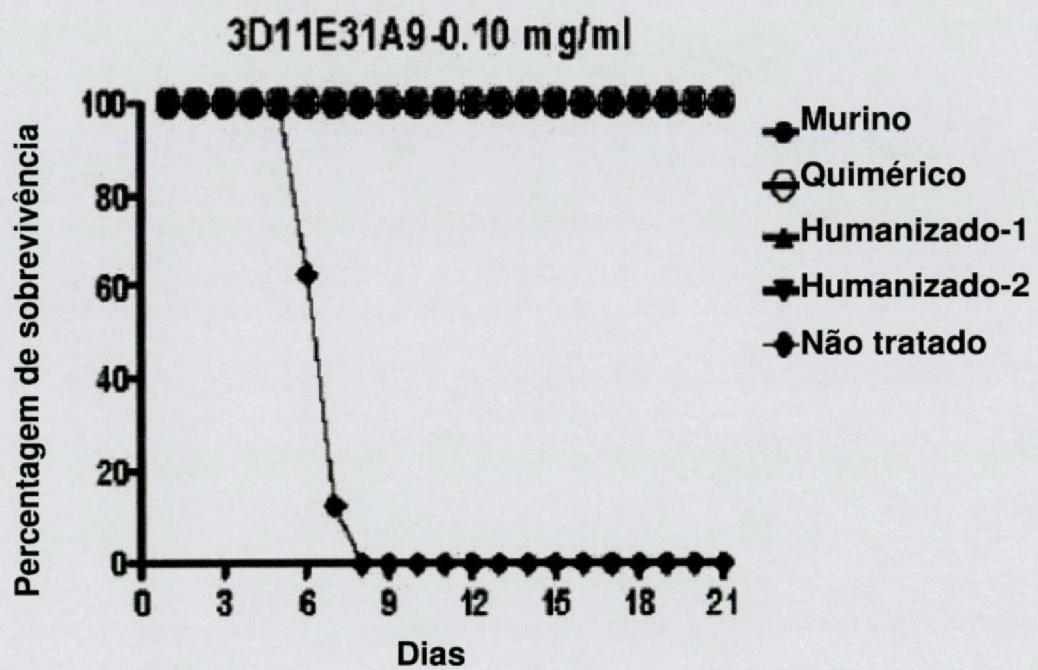
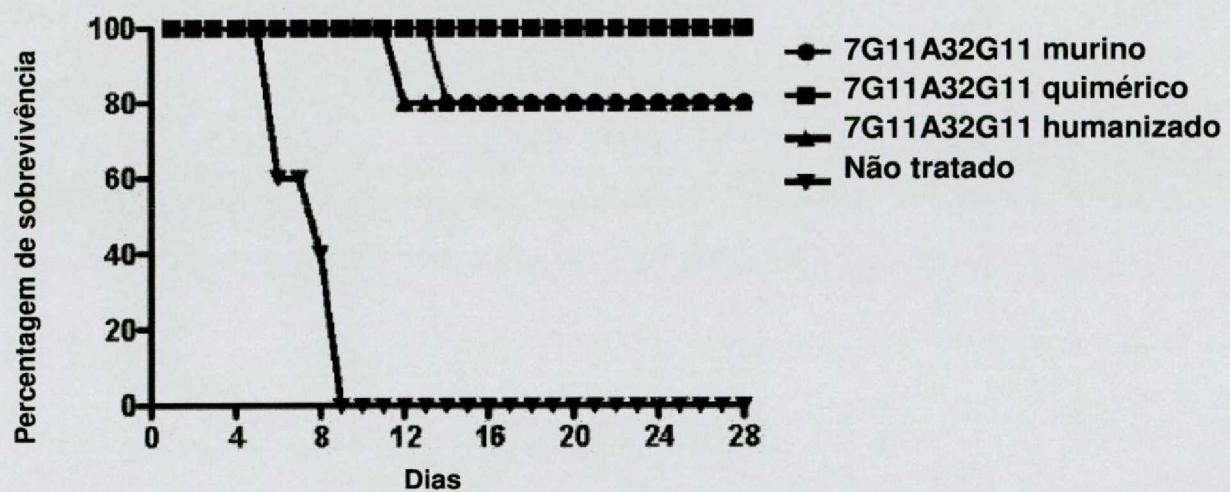
FIG. 17E**FIG. 17F**

FIG. 18A

Proteção pós-exposição de 7G11A32G11 murino, quimérico e humanizado, em hamsters sírios

**FIG. 18B**

Proteção pós-exposição de 3D11E31A9 murino, quimérico e humanizado, em hamsters sírios

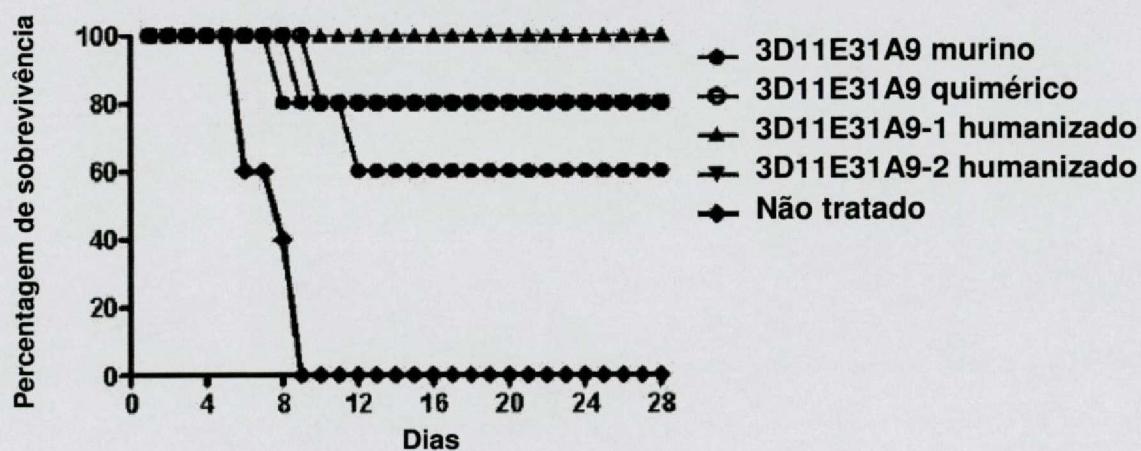


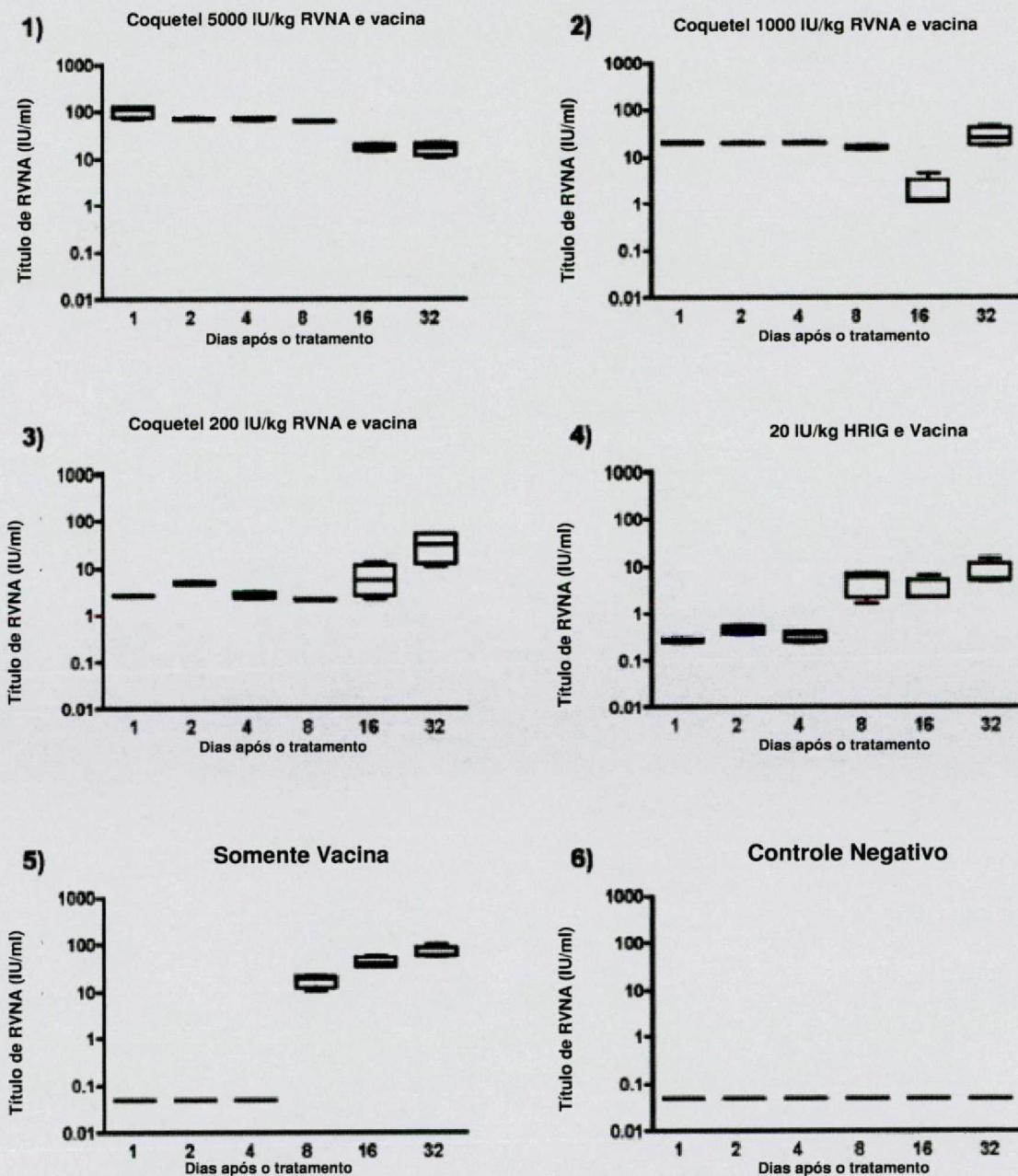
FIG. 19

FIG. 20

Comparação pós-exposição de coquetel de RVNA e HRIG, com vacina, em hamsters sírios

