

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 1997.11.26	(73) Titular(es): UNIVERSITE CATHOLIQUE DE LOUVAIN HALLES UNIVERSITAIRES PLACE DE L'UNIVERSITÉ, 1 1348 LOUVAIN-LA-NEUVE BE
(30) Prioridade(s):	
(43) Data de publicação do pedido: 1999.11.24	
(45) Data e BPI da concessão: 2009.11.18 032/2010	(72) Inventor(es): DANIEL LEGENDRE BE PATRICE SOUMILLION BE JACQUES FASTREZ BE
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS PT RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA

(54) Epígrafe: **MOLÉCULAS ALVO QUIMÉRICAS QUE POSSUEM UMA ACTIVIDADE REGULÁVEL**

(57) Resumo:

RESUMO**"MOLECULAS ALVO QUIMERICAS QUE POSSUEM UMA ACTIVIDADE
REGULÁVEL"**

A presente invenção refere-se a uma molécula alvo quimérica que tem uma actividade que pode ser regulada ou modulada por uma molécula de ligação. A invenção refere-se também a processos para a utilização da molécula alvo quimérica para detectar a presença e/ou a quantidade de um analito desejado numa amostra. O analito é uma molécula de ligação, ou um competidor de uma molécula de ligação, molécula de ligação essa que, após a ligação à molécula alvo, altera a actividade da molécula alvo de uma maneira detectável. Num aspecto da invenção, uma molécula de ligação liga-se à molécula quimérica, inactivando-a. Um analito numa amostra de ensaio compete e/ou desloca a molécula de ligação da quimérica, reactivando-a. O reaparecimento da actividade na presença do analito indica a sua existência na amostra de ensaio, existência e quantidade. Outro aspecto da invenção refere-se a uma molécula de ligação que regula uma molécula alvo quimérica e aos processos para a sua produção.

DESCRIÇÃO

"MOLECULAS ALVO QUIMÉRICAS QUE POSSUEM UMA ACTIVIDADE REGULÁVEL"

O desenvolvimento de ensaios para a medição da presença e da quantidade de substâncias desejadas é altamente desejável para uma série de finalidades, inclusive para utilizações médicas, veterinárias, de investigação e ambientais. É ainda desejável desenhar e isolar moléculas que tenham uma actividade que seja regulável para uma substância desejada. Estas moléculas reguláveis são úteis para detectar a quantidade e a presença de um analito desejado, utilizando a capacidade do analito para regular, directa ou indirectamente (por exemplo, por competição), a actividade da molécula.

Em J. Biol. Chem. 271 (Agosto de 1996), páginas 21251-21256, é descrita a actividade de β -galactosidase de uma sonda molecular para detectar anticorpos específicos.

A P.N.A.S. USA 92 (Junho de 1995), páginas 5783-5787, descreve um sistema sensor molecular baseado em fosfatase alcalina alterada geneticamente.

Em Prot. Eng. 7 (Abril de 1994), páginas 509-514, é descrita a modulação da actividade de enzimas mediante a

ligação de um anticorpo a uma proteína híbrida de epítopo de fosfatase alcalina.

O Documento WO 92/07090 descreve métodos para a modificação e a detecção dos efeitos sobre a interacção de polipeptídeos modificados e substratos alvo.

A presente invenção fornece um processo para a determinação da presença e da quantidade de um analito numa amostra de ensaio, compreendendo: um processo para a determinação da presença e da quantidade de um analito numa amostra de ensaio, compreendendo: (a) a preparação de ácidos nucleicos que codificam para um enzima quimérico, em que a actividade do enzima quimérico é modulada através da ligação de uma molécula de ligação, sendo os referidos ácidos nucleicos preparados por um processo que compreende: (i) o fornecimento de bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos degenerados que codificam para mimótopos; (ii) a expressão de uma biblioteca de enzimas quiméricos candidatos preparados pela inserção dos referidos oligonucleótidos em sequências de ácidos nucleicos que codificam para um enzima de partida para produzir enzimas quiméricos candidatos; (iii) o fornecimento de uma molécula de ligação; (iv) a triagem dos enzimas quiméricos candidatos expressos para determinar se a actividade do enzima quimérico candidato é modulada pela ligação da referida molécula de ligação ao referido enzima quimérico candidato e a identificação de pelo menos um enzima quimérico com actividade modulada; e (v) o isolamento de ácidos nucleicos

que codificam para o referido enzima quimérico a partir da referida biblioteca; (b) a expressão de um ácido nucleico preparado de acordo com a parte (a) para produzir um enzima quimérico; (c) a entrada em contacto do enzima quimérico com (1) a amostra de ensaio, (2) uma molécula de ligação que se liga a um mimótopo do enzima quimérico, e (3) um substrato sobre o qual o enzima quimérico actua cataliticamente, para formar uma mistura reactiva; e (d) a detecção da extensão da catálise do substrato alcançada pelo enzima quimérico, em que a molécula de ligação modula a catálise pelo enzima quimérico, em que o referido analito actua como um competidor directo da interacção do enzima quimérico com a molécula de ligação.

A presente invenção também revela um processo para a determinação da presença ou da quantidade de um analito numa amostra de ensaio, compreendendo: (a) a preparação de um enzima quimérico por um processo como foi definido nas partes (a) e (b) da reivindicação 1; (b) a entrada em contacto do enzima quimérico com (1) a amostra de ensaio e (2) com um substrato sobre o qual o enzima quimérico actua cataliticamente, para formar uma mistura reactiva; e (c) a detecção da extensão da catálise do substrato alcançada pelo enzima quimérico, em que o analito modula a catálise pelo enzima quimérico.

O presente pedido descreve uma molécula alvo quimérica que tem uma actividade que pode ser regulada ou modulada por uma molécula de ligação. A invenção refere-se

a processos para a utilização da molécula alvo quimérica para detectar a presença e/ou a quantidade de um analito desejado numa amostra. O analito é uma molécula de ligação, ou um ligante de uma molécula de ligação, molécula essa que, após a ligação à molécula alvo, altera a actividade da molécula alvo de uma maneira detectável. Num aspecto da invenção, uma molécula de ligação liga-se à molécula quimérica, inactivando-a. Um analito numa amostra de ensaio compete e/ou desloca a molécula de ligação da quimérica, reactivando-a. O reaparecimento da actividade na presença do analito indica a sua existência e a quantidade na amostra de ensaio. Outro aspecto da invenção refere-se a uma molécula de ligação, que regula uma molécula alvo quimérica, e aos processos para a sua produção.

De acordo com a presente invenção, uma molécula alvo (TM) desejada pode ser modificada para ter pelo menos uma parte de sítio de ligação (BSM) à qual se pode ligar uma molécula de ligação (BM). Depois da ligação da BM à BSM, uma actividade associada com a TM é alterada de uma forma detectável, por exemplo, aumentando ou reduzindo a actividade da TM. Desta forma, a BSM pode actuar como um comutador de regulação, ligando ou desligando (toda ou em parte) uma actividade de uma TM desejável em resposta à ligação de uma BM. A BSM também pode ser escolhida de forma que a ligação da molécula de ligação regule a activação da molécula alvo. De acordo com a presente invenção, um mimótopo é a BSM preferida. Uma BSM pode ser modificada para uma molécula alvo pela inserção de sequências, pela

substituição de sequências presentes na molécula por novas sequências, por mutagénese de sequências já presentes na molécula, etc. A transformação pode ser realizada de acordo com processos disponíveis para os peritos na técnica.

O termo molécula alvo "quimérica", por exemplo, um enzima quimérico, significa o produto resultante depois da parte de sítio de ligação ter sido inserida na molécula alvo ou depois de uma parte da molécula alvo ter sido substituída pela parte de sítio de ligação. Para clarificação, antes da transformação da BSM, a molécula alvo é designada por molécula alvo de partida. Desta forma, se o material de partida for um enzima, ele será designado por "enzima de partida". Depois da transformação da BSM o enzima de partida é identificado como um "enzima quimérico". Nos exemplos adiante a β -lactamase é utilizada como um enzima de partida, no qual uma parte de sítio de ligação, compreendendo aminoácidos, é transformada de forma a produzir-se um enzima quimérico. É quimérico porque é constituído por aminoácidos do enzima de partida e por aminoácidos de uma parte de sítio de ligação.

O termo "molécula de ligação" significa uma molécula que liga ou se liga especificamente a uma parte de sítio de ligação. Pelo termo "específico" entende-se que a molécula de ligação reconhece a sequência definida de aminoácidos dentro da sequência de aminoácidos da parte de sítio de ligação, ou que a inclui. A especificidade pode ser uma função da sequência linear de aminoácidos da parte

de sítio de ligação, isoladamente ou em combinação com aminoácidos originalmente presentes na molécula alvo ou numa inserção ou substituição noutra localização. Podem ser empregues várias moléculas de ligação, incluindo anticorpos, polipeptídeos, aptâmeros, ácidos nucleicos, medicamentos e ligantes químicos. Os anticorpos podem ser monoclonais, policlonais, de cadeia simples, anticorpos modificados geneticamente, etc., como são conhecidos na técnica. Ver, por exemplo, Reiter et al., *Nature Biotechnology*, 14: 1239-1245, 1996; Bird et al., *Science*, 242: 423-426, 1988.

Uma molécula de ligação pode ligar-se a uma parte específica de uma macromolécula denominada um epítopo ou um determinante. O epítopo pode ser um determinante linear ou um determinante conformacional. Ver, por exemplo, Abbas et al., *Cellular and Molecular Immunology*, Second Edition, W. B. Saunders Co., 1991, em especial as páginas 47-49. Um "mimótopo" é um determinante que é reconhecido pela mesma molécula de ligação que um "epítopo" particular, mas que tem uma composição diferente da do "epítopo". Por exemplo, uma molécula de ligação pode ser um anticorpo que reconhece (isto é, que se liga a) um epítopo que compreende uma sequência linear de aminoácidos. Um "mimótopo" deste epítopo compreende uma sequência linear de aminoácidos diferente, mas que ainda é reconhecida pelo mesmo anticorpo. O "mimótopo" difere do "epítopo" em pelo menos um aminoácido. Um mimótomo pode mimetizar um hapteno e outras moléculas, incluindo moléculas não proteicas ou

partes das mesmas, por exemplo, carboidratos, biotina, etc. Como se disse, o mimótopo também pode ser um determinante conformacional, formado por resíduos de aminoácidos ou outros constituintes de partes separadas da molécula quimérica. Além disso, o mimótopo pode compreender constituintes (por exemplo, aminoácidos) já presentes na TM de partida e que permaneceram (isto é, não foram substituídos) na TM quimérica. Um mimótopo pode ser escolhido como será discutido adiante, por exemplo, nos exemplos, por transformação de aminoácidos aleatórios num alvo e separando ou seleccionando para reconhecimento por uma molécula de reconhecimento desejada.

Uma vantagem do emprego de um mimótopo é o facto de não ser necessário um conhecimento da estrutura do epítopo. Em geral é difícil adquirir este conhecimento, em particular se o epítopo for não linear. Num aspecto da invenção é criada uma biblioteca de mimótopos, e é transformada, por exemplo, é inserida numa molécula alvo, de preferência numa molécula em anel. A molécula quimérica resultante é então procurada ou seleccionada por retenção da actividade. O mimótopo pode ser extraído de uma sequência ao acaso, por exemplo, contendo cinco aminoácidos, de preferência seis aminoácidos (um hexapeptídeo aleatório), ou sete, oito, nove, dez aminoácidos de comprimento. Neste aspecto da invenção, após a identificação das moléculas alvo quiméricas que têm actividade retida, estas são então escolhidas para o reconhecimento na molécula de ligação desejada. A molécula de ligação pode ser um anti-

corpo a um carbohidrato ou outro hapteno ou não-hapteno não proteico, ou uma sequência de aminoácidos. Em especial no último caso não é necessária qualquer informação de sequências para se implementar a invenção.

A molécula alvo pode ser escolhida por uma actividade detectável desejada. Por exemplo, a TM pode ser: β -lactamase: P. Soumillion et al., J. Mol. Biol., 237: 415-422, 1994; plasmina: L. Jespers et al., comunicação de conferência; antigene específico da próstata: R. Eerola et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 200: 1346-1352, 1994; subtilisina: P. Soumillion et al., Appl. Biochem. Biotechnol., 47: 175-190, 1994; tripsina: D.R. Corey et al., Gene, 128: 129-134, 1993; fosfatase alcalina: J. McCafferty et al., Prot. Enging., 4: 955-961; β -galactosidase: I.N. Maruyama et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 8273-8277, 1994; nuclease estafilocócica: J. Ku & P.G. Schultz, Bioorg. Med. Chem., 2:1413-5, 1994; e J. Light & R.A. Lerner, Bioorg. Med. Chem., 3: 955-67, 1995; glutationa-transferase: M. Widersten & B. Mannervick, J. Mol. Biol., 250: 115-122, 1995; lisosima: K. Maenaka et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 218: 682-687, 1996; e anticorpos catalíticos: K.D. Janda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 2532-2536, 1994.

As moléculas alvo mencionadas acima foram exibidas sobre fagos. São directamente acessíveis ao método de selecção de uma BSM. Outros enzimas também podem ser exibidos sobre fagos e são úteis para a presente invenção,

por exemplo, esterases, piruvato-cinase, glucose-oxidase, lactato-desidrogenase, glucose-6-fosfato-desidrogenase, luciferase. A TM também pode ser uma proteína que possui uma actividade fluorescente (por exemplo, a proteína verde fluorescente, GFP; Chalfie et al., 1994, Science, 263:802; Cheng et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:606; Levy et al., 1996, Nature Biotechnology, 14:610), que é modulada por ligação de uma BM a uma BSM contida no interior da proteína fluorescente. A TM também pode ser uma molécula reguladora que activa/desactiva uma segunda molécula que tem uma actividade detectável. Por exemplo, uma proteína activadora de GTPase (GAP) estimula uma proteína G, tal como "ras". A capacidade de uma GAP para activar uma proteína G pode ser modulada transformando uma BSM numa GAP. Por ligação de uma BM à BSM de uma GAP modificada pode ser modulada a actividade estimulante da GAP. O seu efeito a montante sobre proteínas G pode ser acompanhado, por exemplo, medindo-se uma actividade de GTPase da proteína G. Ver, por exemplo, Trahey e McCormick, Science, 238: 542-545, 1987. A TM também pode ser uma subunidade de outra proteína que possua, ela própria, actividade enzimática ou outra actividade detectável. Adicionalmente, a TM pode ser um enzima de ácido nucleico, por exemplo, uma ribozima, um enzima "cabeça de martelo", RNase P, ou um enzima "gancho". Se for utilizado um ácido nucleico como a molécula alvo, a parte do sítio de ligação modificada deveria compreender habitualmente nucleótidos, tanto modificados como de ocorrência natural. A TM também pode ser um activador ou repressor de activação envolvido em sistemas de transcrição

e translação *in vitro*; a detecção da actividade pode ser realizada ao nível da actividade do enzima expresso ou da molécula fluorescente.

A ligação da BM à molécula quimérica, de preferência à BSM, pode afectar a actividade de várias formas. A molécula de ligação pode inactivar a TM quimérica. Pelo termo "inactivar" entende-se que a actividade da TM quimérica é reduzida ou enfraquecida. A molécula de ligação pode inactivar completamente a TM quimérica, de forma que esta não possua actividade, ou possua uma actividade desprezível, ou pode inactivar somente parte da sua actividade, por exemplo, a K_{cat} é reduzida ou a K_m é aumentada. Uma TM quimérica pode existir em pelo menos duas conformações, uma conformação activa e uma inactiva. No equilíbrio, uma população de TMs quiméricas deverá conter uma mistura de moléculas, algumas na conformação activa e algumas na conformação inactiva de uma TM. Pode ser escolhida uma BM que se ligue a uma conformação inactiva de uma TM. Quando é adicionada à população da TM quimérica, a ligação da BM às TMs inactivas pode deslocar o equilíbrio da mistura para a conformação inactiva. Como consequência, a mistura terá menor actividade na presença da BM do que na sua ausência. Desta forma, a molécula de ligação modula a actividade da TM quimérica, desviando a população de TMs quiméricas para uma conformação inactiva, reduzindo desta forma a actividade da população no seu todo. Um enzima de partida seleccionado pode ser a serina-protease, que pode existir em duas conformações diferentes: uma activa e uma

inactiva. A conformação inactiva é semelhante à do correspondente zimogénio. O equilíbrio pode ser deslocado da conformação activa para a inactiva destruindo uma ponte salina que mantém o enzima na sua conformação activa; isto pode ser realizado através de um aumento do pH, que conduz à eliminação do protão do terminal amino da cadeia peptídica envolvida na ponte salina, ou por modificação química deste terminal amino. A energética da ponte salina é tal que a conformação activa não é estabilizada fortemente (2,9 kcal/mol, ver: A.R. Fersht, J. Mol. Biol., 64:497-509, 1972), de modo que o equilíbrio pode ser deslocado de forma relativamente fácil para a forma inactiva. A ligação de uma BM, por exemplo, de um anticorpo monoclonal, para o terminal de aminoácido pode deslocar o equilíbrio por várias ordens de grandeza.

A activação de uma molécula quimérica também pode ser regulada por uma BM. O exemplo mais simples de activação é a clivagem proteolítica de uma ligação peptídica num zimogénio, para o transformar num enzima. Um exemplo clássico é a activação de uma serina-protease, ou mais especificamente a activação de quimotripsinogénio em quimotripsina, por clivagem proteolítica da ligação peptídica Arg 15-Ile 16 pela tripsina. Um anticorpo, ou outra BM, que se ligue a um epítopo ou a um mimótopo modificado na região da ligação peptídica clivada pode inibir a activação. Outro exemplo é a inibição da fosforilação ou da desfosforilação de um enzima cuja actividade é regulada pelo seu estado de fosforilação. A

glicogénio-fosforilase é um exemplo: quando é fosforilada em Ser 14 está essencialmente na sua forma activa, e a desfosforilação desactiva o enzima. A ligação de um anticorpo, ou de outra BM, a um epítopo ou mimótopo modificado na vizinhança do sítio de fosforilação vai interferir com o mecanismo de activação/desactivação pela fosforilase-cinase e pela fosfoproteína-fosfatase, respectivamente.

Mais geralmente, pode interferir-se com qualquer modificação pós-translação de um enzima, que contribua para modular a sua actividade, por ligação de uma molécula estranha a uma BSM (por exemplo, um anticorpo).

A parte de sítio de ligação pode ser modificada para qualquer posição desejada na molécula alvo, inclusive como uma fusão com os terminais N e C. Uma ou mais BSMs, por exemplo, 2, 3, 4 ou 5 BSMs podem ser modificadas para a parte alvo em regiões adjacentes ou diferentes. Podem ser feitas modificações múltiplas, por exemplo, inserções ou substituições, na molécula alvo por uma série de razões, por exemplo, para contribuir para o mimótopo (por exemplo, o mimótopo pode ser constituído por aminoácidos alterados por modificação em dois sítios diferentes na molécula alvo), para fornecer mais do que um sítio ao qual se possa ligar uma molécula de ligação, para fornecer um sítio no qual uma BM activa o enzima e outro sítio no qual uma segunda BM inactiva um enzima, etc. Uma vantagem de se inserirem ou substituírem sequências de aminoácidos com um mimótopo em dois (ou mais) sítios é o facto de poder ser

construído um mimótopo descontínuo, proporcionando sítios de alta afinidade aos quais se pode ligar uma molécula de ligação. De preferência, como foi discutido acima, a TM quimérica resultante retém pelo menos alguma da sua actividade depois da modificação da BSM. Além disso, a ligação de uma BM à BSM tem como resultado a regulação da actividade acima mencionada da molécula alvo quimérica. Os últimos dois aspectos, a retenção de uma actividade e a regulação da actividade retida da molécula quimérica resultante por uma molécula de ligação, são aspectos preferidos da invenção. Desta forma, um sítio preferido de modificação, por exemplo, inserção, é uma posição em que a actividade da TM não é eliminada, mas que, quando substituída ou modificada pela adição de resíduos de aminoácidos, pode actuar como um comutador de regulação para a actividade da TM.

O sítio em que uma BSM é modificada, por exemplo, em que é inserida e/ou modificada, na TM, pode ser escolhido por várias vias, como os peritos na técnica sabem. Por exemplo, se for conhecida a estrutura tridimensional (3D) da TM, pode ser seleccionado um sítio identificando-se especificamente uma localização desejada na molécula a modificar. Para algumas finalidades pode ser desejável seleccionar um sítio exposto na superfície da molécula alvo, em que o sítio esteja disponível para a ligação pela molécula de ligação. A estrutura 3D pode ser determinada de acordo com meios empíricos, por exemplo, por cristalografia, e/ou pode ser deduzida a partir de

estruturas conhecidas e de dados de sequências de amino-ácidos. Ver, por exemplo, Holm e Sander, *Science*, 273: 595-602, 1995. Se a estrutura 3D não for conhecida, o sítio da modificação pode ser escolhido com base noutra informação, por exemplo, quando a estrutura da proteína não é conhecida, os sítios susceptíveis a uma proteólise ilimitada, ou os sítios bastante previsíveis para serem anéis pela previsão de uma estrutura secundária ou por análise de configurações hidrófobas são apropriados para a modificação, por exemplo, a inserção ou substituição. Em alternativa, uma BSM pode ser modificada em posições aleatórias dentro da TM.

O sítio modificado de preferência não é o sítio activo, mais preferivelmente situa-se numa localização afastada do mesmo, por exemplo, a cerca de 1, 5, 15, 20 ou 25 Å daquele. A actividade da molécula quimérica deve ser regulável por ligação à sequência inserida ou modificada, independentemente do facto de a modificação estar próxima ou afastada do sítio activo.

As moléculas alvo e quiméricas podem ser preparadas por processos que estão disponíveis na técnica. Por exemplo, a modificação genética pode ser empregue para se prepararem moléculas alvo e quiméricas que compreendem resíduos de aminoácidos ou de nucleótidos. Numa variante de realização é empregue um gene clonado como material de partida para a molécula alvo de partida e a molécula alvo quimérica resultante. Nos exemplos descritos adiante, o

gene clonado para o enzima de partida β -lactamase serve de material de partida para se preparar o enzima quimérico. A BSM pode ser modificada na TM de partida utilizando-se os diversos processos disponíveis para os peritos na técnica, por exemplo, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 488-492, 1985; Sayers e Eckstein em "Directed Mutagenesis; a practical approach", McPherson, Ed. IRL Press 1991, pp. 49-69; Munir et al., J. Biol. Chem., 267: 6584-6589, 1992; Brennan et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 92: 5783-5787, 1995. Também pode ser realizada a modificação utilizando-se um vector de substituição através da recombinação homóloga. Para os fins da presente invenção, quando uma sequência contida num gene de partida foi submetida a mutagénese ao ponto de a sequência de aminoácido diferir da sequência de partida, o polipeptídeo que codifica para o gene resultante é quimérico. É quimérico, uma vez que foi modificada na molécula alvo de partida uma sequência de aminoácido diferente, isto é, uma parte do sítio de ligação. No exemplo concreto em que o material de partida é um enzima, e o enzima é sujeito a mutagénese por modificação da sua sequência de nucleótidos, um enzima quimérico resultante deverá compreender uma parte de sítio de ligação de aminoácido que substituiu as sequências de aminoácidos de ocorrência natural. Numa forma de realização, a sequência do gene que codifica para um enzima de tipo selvagem (ou outro polipeptídeo) é modificada por mutagénese dirigida ao sítio de acordo com os protocolos de Kunkel ou Eckstein para introduzir dois sítios de restrição a montante e a jusante da região do gene marcado para a

modificação; de preferência, uma mutação é introduzida ao mesmo tempo na sequência de codificação, de forma que o enzima codificado fique inactivo; o plasmídeo, fagemídeo ou fago que contém o gene modificado será designado como o "vector". Este vector é digerido nos novos sítios de restrição com os correspondentes enzimas de restrição e o fragmento pequeno que codifica para a sequência entre os sítios é eliminado. Em paralelo, são preparadas bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos degenerados, de acordo com o processo de Munir et al., J. Biol. Chem., 267: 6584-6589, 1992; aquelas contêm, entre os sítios de restrição adequados, sequências de nucleótidos degenerados que codificam substituições aleatórias dos correspondentes resíduos na sequência da proteína. Em alternativa, a sequência tipo selvagem é substituída por uma sequência de nucleótidos mais longa que codifica a inserção de um polipeptídeo aleatório na posição correspondente na sequência da proteína. Após a restrição, os oligonucleótidos sintéticos são ligados com o fragmento grande purificado do vector digerido e a mistura de ligação é usada para se transformarem células de *E. coli*. São produzidas, tipicamente, bibliotecas que contêm cerca de 10^6 e 10^8 transformantes. Os clones que produzem enzimas activos são seleccionados a partir destes (ver adiante). É realizada a recombinação, em duas bibliotecas, dos clones que produzem enzimas activos, em que são introduzidas mutações aleatórias em diferentes partes da sequência, para se produzirem enzimas com mimótopos descontínuos.

Numa forma de realização em que é utilizada a tecnologia genética, um gene que codifica para uma molécula alvo, por exemplo, um enzima, pode ser clonado num vector de expressão apropriado para a expressão de um polipeptídeo num hospedeiro pretendido. São contemplados diversos hospedeiros, incluindo células de mamíferos (por exemplo, humanas, de macaco ou de roedores, tais como HeLa, COS, Ltk-, ou CHO), células de insectos (por exemplo, Sf9 ou *Drosophila*), bactérias (por exemplo, *E. coli*, *Streptococcus*, ou *bacillus*), leveduras, fungos, ou plantas. Ver, também *Methods in Enzymology*, Volume 185, ed., D.V. Goeddel. A expressão em Sf9 pode ser realizada por analogia com Graziani et al., *Oncogene*, 7: 229-235, 1992. Têm sido usados sistemas de fagos filamentosos para exprimir e seleccionar peptídeos em bactérias que se ligam a moléculas de ligação, incluindo anticorpos (Scott e Smith, 249: 386-390, 1990; Grihalde et al., *Gene*, 166: 185-195, 1995), estreptavidina (Kay et al., *Gene*, 128: 59-65, 1993; Devlin et al., *Science*, 249: 404-406, 1990), ADN de ribonuclease (Rebor e Pabo, *Science*, 263:671-673, 1994). Ver também Jespers et al., *Biotechnology*, 13: 378-382, 1995. Ver também Parmley e Smith, *Gene*, 76: 305-318, 1985; de la Cruz et al., *J. Biol. Chem.*, 263: 4318-4322, 1988; Bass et al., *Proteins*, 8: 309-314, 1990; Cwirla et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6378-6382, 1990; McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554, 1990; Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628, 1991; Lowman et al., *Biochemistry*, 30: 10823-10838, 1991; J. McCafferty et al., *Prot. Eng.*, pp. 955-961, 1991; Kang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:4363-

4366, 1991; Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982, 1991; Roberts et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2429-2433, 1992. Os polipeptídeos preferidos para os sistemas de expressão de fagos filamentosos são aqueles que estão convenientemente inseridos no fago, ou pelo menos apresentados no fago numa forma completamente activa. Para se identificar se uma molécula de partida desejada é apropriada, um ácido nucleico que codifica para a molécula é clonado no fago de uma maneira apropriada para a expressão. A molécula expressa é então ensaiada quanto a uma actividade de acordo com processos convencionais. A modificação de uma BSM na molécula de partida pode ser então realizada de acordo com os processos mencionados acima. Ver, por exemplo, Grihalde et al. As sequências de controlo da expressão são seleccionadas quanto à compatibilidade como o hospedeiro e uma finalidade desejada, por exemplo, elevado número de cópias, grandes quantidades, indução, amplificação, expressão controlada, etc. Outras sequências que também podem ser empregues incluem intensificadores, tais como de SV40, CMV, promotores indutíveis, ou outros elementos que permitam a expressão selectiva ou específica de células.

A invenção também se refere a ácidos nucleicos que codificam para uma molécula alvo quimérica. O referido ácido nucleico pode compreender ainda várias sequências, por exemplo, uma ou mais sequências de controlo de expressão ligadas em termos operacionais a uma sequência de nucleótidos que codifica para a molécula alvo quimérica.

A frase "sequência de controlo de expressão" significa uma sequência de ácido nucleico que regula a expressão de um ácido nucleico ao qual está ligado em termos operacionais. A expressão pode ser regulada ao nível do ARNm ou do polipeptídeo. Assim, a sequência de controlo de expressão inclui elementos relacionados com o ARNm e elementos relacionados com a proteína. Estes elementos incluem promotores, intensificadores (virais ou celulares), sequências que ligam ribossomas, terminadores de transcrição, etc. Uma sequência de controlo de expressão está ligada, em termos operacionais, a uma sequência de codificação de nucleótido quando a sequência de controlo de expressão está posicionada de forma a efectuar ou a conseguir a expressão da sequência de codificação. Por exemplo, quando um promotor está 5' ligado, em termos operacionais, a uma sequência de codificação, a expressão da sequência de codificação é dirigida pelo promotor. Um ácido nucleico que codifica para uma molécula quimérica também inclui ácidos nucleicos que hibridizam com ela, por exemplo, em condições estritas, tais como condições que permitam a selecção de pelo menos 95% a 99% da identidade do nucleótido. Para uma TM quimérica que seja um poli-peptídeo, um ácido nucleico que a codifica inclui, por exemplo, a degeneração do nucleótido. Os ácidos nucleicos incluem o ADN e o ARN.

Podem ser também utilizados processos químicos e/ou sintéticos para criar a molécula quimérica, por exemplo, os processos de construção de compostos por química combinatória, como é conhecido dos peritos na técnica.

Tal como foi mencionado acima, um aspecto da presente invenção envolve moléculas alvo quiméricas, que têm uma actividade que pode ser regulada ou modulada por uma molécula de ligação. Pela frase "sendo assim a actividade da molécula alvo quimérica modulada por meio da ligação de uma molécula de ligação", entende-se que a ligação da molécula de ligação à TM quimérica, de preferência à BSM, afecta a actividade da TM quimérica de uma forma detectável. Se a TM quimérica for um enzima, tal como uma β -lactamase, a molécula de ligação vai afectar a sua actividade, hidrolisando a ligação de β -lactame. O efeito da molécula de ligação pode ser reduzir ou mesmo eliminar a actividade, por exemplo, reduzir ou eliminar a sua capacidade para clivar a ligação de β -lactame. A molécula de ligação também pode afectar a actividade por outras vias, por exemplo, aumentando-a, alterando a sua especificidade, activando-a, etc.

Numa variante de realização preferida, as sequências peptídicas aleatórias são modificadas num sítio escolhido ou numa molécula alvo, por exemplo, um enzima. Depois da modificação da molécula alvo de partida para se produzir uma biblioteca que contém a molécula alvo quimérica resultante, com uma BSM modificada por inserção ou substituição, é desejável escolher as moléculas quiméricas que têm retida uma actividade da molécula alvo de partida. Pela frase "a molécula alvo quimérica tem uma actividade da molécula alvo de partida" entende-se que a TM

de partida tem uma actividade e a TM quimérica resultante tem também uma actividade. A actividade da TM quimérica pode ser diferente qualitativamente ou quantitativamente da TM de partida. A título de ilustração, nos exemplos adiante o enzima de partida é a β -lactamase. A β -lactamase é um enzima que hidrolisa a ligação de β -lactame. Podem ser utilizados como substratos vários compostos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, ampicilina, etc. Uma β -lactamase quimérica que tem uma parte de sítio de ligação, quer por substituição, quer inserida adicionalmente aos aminoácidos de ocorrência natural, possui a capacidade de hidrolisar uma ligação de β -lactame. Esta actividade na β -lactamase quimérica pode ser, por exemplo, maior ou menor do que o enzima de partida (por exemplo, possuindo um K_{cat} diferente ou um K_m diferente), e/ou ter uma especificidade de substrato diferente.

O primeiro passo é seleccionarem-se moléculas quiméricas resultantes que retenham a actividade desejada. Se uma actividade do enzima for a actividade desejada, poderá então ser criado um ensaio de selecção para a mesma. A selecção da molécula desejada pode ser realizada por vários processos, como é do conhecimento dos peritos na técnica. Por exemplo, a selecção pode ser realizada pela cor (por exemplo, quando a clivagem pelo enzima produz um produto final que tem uma cor detectável), conferindo resistência aos clones que exprimem um enzima activo (por exemplo, resistência a medicamentos), etc. Numa forma de realização, a escolha é realizada aplicando numa placa uma

biblioteca sobre meio sólido, adicionando-se um substrato cromogénico ou fluorogénico, e observando-se o desenvolvimento do produto em colónias individuais. A selecção *in vivo* pode ser aplicada quando a molécula é necessária para o crescimento na presença de antibióticos (resistência a antibióticos; esta técnica é utilizada com a beta-lactamase nos exemplos), ou quando a actividade é empregue para a complementação de um gene essencial em falta em bactérias auxotróficas (por exemplo, auxotrofia para um aminoácido). A selecção *in vitro* também pode ser utilizada quando o enzima é exibido no fago; por exemplo, WO 93/11242.

Para se medir a actividade dos enzimas seleccionados, pode ser utilizada qualquer técnica espectrofotométrica, fluorométrica, potenciométrica (pHstat) clássica. Em particular, pode ser utilizada a tecnologia ORIGENTM (IGEN Gaithersburg, MD) para a detecção da formação do produto (Liang et al., J. Am. Chem. Soc., 118: 9198-9199, 1996; Liang et al., Anal. Chem. 68: 2426-2431, 1996). Um próximo passo de selecção é identificar clones que se ligam à molécula de ligação. Numa forma de realização, a molécula alvo quimérica é expressa sobre um fago. A selecção pode ser realizada por técnica de batear de anticorpo, cromatografia em coluna, etc. Ver, por exemplo, Grihalde et al., Gene, 166: 187-195, (1995); McNally et al., J. Bio. Chem., 270: 19744-19751, 1995; O'Neil e Hoess, Curr. Opin. Struct. Biol., 5:443-449, 1995. Num outro aspecto da invenção, é utilizada a eluição do substrato para identificar uma actividade de uma molécula alvo quimérica

que é inibida por ligação de um anticorpo. Por exemplo, um enzima quimérico (por exemplo, exibido sobre um fago) que tem um mimótopo desejado é seleccionado pela sua capacidade para ser reconhecido por um anticorpo específico para o mimótopo. Para se identificar um enzima quimérico cuja actividade é inibida pelo anticorpo, o enzima quimérico é eluido do anticorpo pela adição de um substrato apropriado. Numa outra forma de realização, a molécula alvo quimérica é expressa sobre a superfície sobre a célula hospedeira (por exemplo, uma bactéria, uma célula de insecto, uma célula de mamífero) e a selecção pode ser realizada sem a lise das células. A molécula alvo quimérica também pode ser expressa dentro da célula hospedeira e a selecção ser realizada depois, por exemplo, permeabilizando ou lisando as células, ou, por qualquer outra forma, tornando o produto expresso acessível à molécula de ligação.

Pode ser usada uma molécula alvo quimérica para detectar a presença ou a quantidade de um analito na amostra de ensaio. Numa forma de realização, uma TM quimérica é um enzima quimérico. O enzima quimérico é posto em contacto com uma (1) amostra de ensaio que contém um analito, e (2) um substrato sobre o qual o enzima quimérico da TM actua cataliticamente, para formar uma mistura reactiva. A quantidade do analito presente na mistura reactiva é determinada monitorizando ou detectando a quantidade de catálise sobre o substrato alcançada pelo enzima quimérico, em que o analito modula a catálise pelo enzima quimérico. Uma amostra de ensaio pode ser qualquer amostra que contém

um analito cuja presença ou quantidade se pretende conhecer, por exemplo, fluidos corporais, tais como sangue, soro, urina, fezes ou linfa, homogeneizados de tecidos, biopsias, fluidos de órgãos, meio de cultura de tecidos, etc. Por analito entende-se uma molécula cuja presença numa amostra de ensaio está a ser detectada. Numa forma de realização, o analito é um anticorpo, tal como um anticorpo específico para o antigene específico da próstata (PSA), um antigene embriónico de carcinoma (CEA), c-erbB2, produtos de oncogenes, viral (HIV ou hepatite), bacteriano (de estafilococco), e a TM quimérica é um enzima quimérico. A ligação ou a fixação do anticorpo ou da BM ao enzima quimérico pode modular a catálise sobre o substrato pelo enzima quimérico. A modulação da actividade foi discutida acima. Num exemplo preferido, a actividade enzimática do enzima quimérico é reduzida (inactivada) pelo anticorpo. Desta forma, a presença do anticorpo do analito na amostra de ensaio pode ser determinada por monitorização ou detecção da redução da actividade manifestada pelo enzima quimérico, quer como moléculas individuais, quer como uma população. Em alternativa, o analito é um polipeptídeo, tal como qualquer das proteínas mencionadas anteriormente, ou fragmentos das mesmas. Quando a molécula quimérica é combinada com uma molécula de ligação apropriada, a sua actividade é modulada.

Num outro aspecto da presente invenção, a actividade de uma mistura reactiva que compreende um enzima quimérico e uma molécula de ligação (BM), que modula a

actividade do enzima quimérico, pode ser ainda afectada por um analito (um ligante da molécula de ligação). O analito pode actuar como um competidor directo da interacção do enzima quimérico com a BM: a adição do analito compete ou desloca a molécula de ligação da TM, invertendo o seu efeito modulador sobre a actividade detectável. Numa forma de realização, a molécula de ligação inactiva a TM quimérica; a adição do analito terá como resultado a restauração da actividade na mistura reactiva.

O ensaio enzimático pode ser realizado de acordo com processos conhecidos. Por exemplo, a actividade pode ser monitorizada temporalmente, cineticamente, ou por ponto final. O enzima quimérico pode estar em solução ou sobre um suporte sólido, por exemplo, acoplado directamente ou através de um acoplamento de biotina-estreptavidina, a materiais tais como a celulose, *Sephadex*, plásticos, polipropileno, poliestireno, polivinilo, nitrato de celulose, polietileno, nylon, polimetacrilato de metilo, etc. O acoplamento pode ser realizado como é do conhecimento dos peritos na técnica. Ver, por exemplo, *Methods in Enzymology*, Volume 73, para várias técnicas sobre substratos, acoplamento, e ensaios em geral. Pelo termo "pôr em contacto" a molécula quimérica com uma amostra de ensaio que contém o analito ou a molécula de ligação, entende-se que o analito ou a molécula de ligação é levado ao contacto com a molécula quimérica por um meio desejado. O contacto pode ser realizado por: a adição de uma amostra de ensaio a uma solução que contém a TM quimérica, a imersão de um suporte sólido que contém o enzima quimérico numa solução

que contém o analito ou a BM, a adição gota a gota de uma solução que contém um analito a um suporte sólido que contém a TM quimérica, etc. Se for utilizado um substrato, por exemplo, em que uma TM quimérica é um enzima, o substrato pode ser posto em contacto com o enzima quimérico ao mesmo tempo que o analito, ou antes ou depois, isto é, simultaneamente ou em sequência.

Como foi mencionado, a TM quimérica pode ser qualquer molécula que tenha uma actividade desejada, por exemplo, enzimática, fluorescente, activante, complementar, etc. Os ensaios para a detecção de um analito podem ser adaptados, como os peritos na técnica sabem, para a monitorização ou a detecção da alteração na actividade da TM quimérica seleccionada.

Num outro aspecto da presente invenção, um analito é um competidor de uma molécula de ligação. A presença ou a extensão da competição com a molécula de ligação é utilizada para confirmar a sua presença. No exemplo 2 é descrito um exemplo de um processo desta natureza. É preparada uma molécula quimérica (no exemplo trata-se da β -lactamase) que tem um mimótopo reconhecido por um anticorpo específico para uma molécula desejada (no exemplo é o antigene específico da próstata ou "PSA"). A ligação do anticorpo ao mimótopo reduz a actividade da molécula quimérica. O analito (no exemplo é a PSA) compete com o anticorpo pela ligação ao mimótopo. Desta forma, se estiver presente o analito, menos anticorpo se liga à molécula quimérica. Com menos anticorpo ligado à molécula

quimérica, a molécula quimérica é mais activa do que na ausência do analito.

Os ensaios da presente invenção são úteis para utilização médica, veterinária, ambiental, e várias utilizações de diagnóstico, por exemplo, para a detecção de doenças, de distúrbios patogénicos, de contaminação ambiental, de contaminação de culturas de tecidos, etc. Por exemplo, a presença de cancro num paciente pode ser determinada pela detecção da presença de um antígeno ou um anticorpo característico. É sabido que indivíduos com cancro podem ter níveis elevados de vários antígenos, tais como o antígeno específico da próstata (PSA) ou o antígeno embrionário de carcinoma (CEA).

Para outros aspectos de ácidos nucleicos, polipeptídeos, anticorpos, etc., é feita referência a livros de texto de referência sobre biologia molecular, ciência das proteínas e imunologia. Ver, por exemplo, Davis et al. (1986), Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Sciences Publishing, Inc., New York; Hames et al. (1985), Nucleic Acid Hybridization, IL Press, Molecular Cloning, Sambrook et al.; Current Protocols in Molecular Biology, Edited by F. M. Ausubel et al., John Wiley & Sons, Inc.; Current Protocols in Human Genetics, Edited by Nicholas C. Dracopoli et al., John Wiley & Sons, Inc.; Current Protocols in Protein Science; Edited by John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.; Current Protocols in Immunology; Edited by John E. Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.

OS DESENHOS

As figs. 1a, 1b e 1c mostram os sítios de inserção usados para gerar as bibliotecas lib1 e lib3: lib1 1. V103, 2. E104 e 3. Y105; lib3: 4. T271 e 5. M272; sítio catalítico 6. S70.

As fig. 2 e fig. 3 são curvas que mostram o efeito inibitório do anticorpo psa19 sobre uma β -lactamase mutante psa19A;302. A fig.3 é uma curva que mostra uma área expandida da fig. 2, representando a actividade do enzima como uma função de psa19, entre 0 e 50 nM.

A fig. 4 é uma curva que mostra o efeito do anticorpo psa19 sobre a actividade de p19Rb404 quimérica.

As figs. 5A e 5B são curvas que mostram o efeito do anticorpo psa66 sobre a actividade da p66Rb330 quimérica, utilizando dois substratos diferentes, Centa e PADAC, respectivamente.

A fig. 6 é uma curva que mostra um ensaio do antigene psa realizado sobre PenG na presença do fago-enzima P19L3-01 e psa 19mAb.

EXEMPLOS

EXEMPLO 1

Construção das bibliotecas. O fago fd filamentoso que transporta o gene de β -lactamase em fusão com a proteína de revestimento pIII (fdBla⁺) foi descrito em Soumillion, P., Jespers, L., Bouchet, M., Marchand-

Brynaert, J. Winter, G. e Fastrez, J. Selection of β -lactamase on Filamentous Bacteriophage by Catalytic Activity. J. Mol. Biol. 237, 415-422 (1994). O mapa de restrição do fago é dado na fig. 1a; a sequência de ADN do gene R-Tem β -lactamase inserido entre os sítios de ligação ApaLI e NotI modificado dentro do gene 3 do fago é dado na figura 1b, conjuntamente com a sequência do aminoácido codificado. Foram construídas três bibliotecas, lib1, lib2 e lib3, por introdução nos sítios de restrição únicos do plasmídeo fdBla⁺, de ambos os lados das regiões a randomizar (por mutagénese dirigida ao sítio) e por clonagem, entre estes sítios, pequenos fragmentos de ADN parcialmente degenerados. Os insertos foram produzidos sintetizando-se oligonucleótidos com as sequências desejadas e convertendo-os em ADN de espiral dupla pela elongação de um pequeno *primer* que hibridiza para a parte 3' não degenerada dos oligonucleótidos. A biblioteca lib4 foi construída por permuta de um fragmento de restrição EcoRI-PvuI do plasmídeo fdBla⁺ que cobre as mutações de lib1, pelo correspondente fragmento não mutado do plasmídeo fdBla⁺ na biblioteca lib3. As bibliotecas de ADN foram electroporadas para a estirpe TG1 de E. coli. Serão dados mais pormenores adiante.

Preparações de material de fago-enzima. As bibliotecas de fago-enzima foram produzidas espalhando-se bactérias electrotransformadas sobre grandes placas de 530 cm² que continham meio LB sólido e tetraciclina a 7,5 μ g/mL. Deixaram-se crescer os transformantes durante 20 horas a 37°C e em seguida foram recuperados por lavagem das

placas com meio LB. As bactérias foram separadas por centrifugação e os fagos foram purificados a partir dos sobrenadantes por precipitações com PEG/NaCl. Para aumentar o número médio de β -lactamases exibidas por fago, as bibliotecas de fagos foram reampliadas em meio líquido a 23°C imediatamente antes de serem seleccionadas sobre mAbs (1 β -lactamase é exibida por fago a 23°C, comparada com 0,2 β -lactamase por fago a 37°C, dados não aparentados). As bibliotecas que foram seleccionadas quanto à actividade foram produzidas nas mesmas condições, excepto pelo facto de terem sido aplicadas sobre placas que continham ampicilina (a 10 $\mu\text{g/mL}$ ou a 30 $\mu\text{g/mL}$). Os clones individuais foram sempre ampliados a 23°C em meio LB líquido.

Ensaio de enzimas. A actividade da β -lactamase sobre o fago foi ensaiada em solução a 20°C em tampão de fosfato de sódio 50 mM, a pH 7,5. Excepto quando for indicado o contrário, foi utilizado como substrato benzil-penicilina (PenG). A diminuição da absorvância foi medida a 232 nm em função do tempo, para se obterem os valores de kcat expressos em s^{-1} por mole de enzimas de fago.

EXEMPLO 2

1. Construção de uma biblioteca num anel na margem do sítio activo da proteína de β -lactamase (lib1).

Foram inseridas sequências peptídicas aleatórias na região 103-105 da sequência de β -lactamase R-Tem (J.G.

Sutcliffe, Proc. Natl. Acad. Sci., 75: 3737-3741, 1995). Foi escolhido como um sítio de inserção-substituição o anel na margem do sítio activo, na região que compreende V103-V105, em virtude de a sua posição ser vizinha da bolsa catalítica e de a sequência ser mal conservada nesta região entre as β -lactamases da classe A. Ver a fig. 1c.

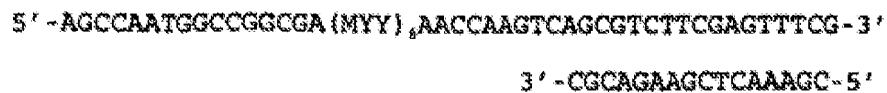
Foram construídas duas bibliotecas lib1 diferentes, lib1A-B e lib1D, com base num vector inactivado. Ambas contêm um inserto de seis aminoácidos em substituição dos resíduos E104-Y105 e V103-Y105, respectivamente. O tamanho teórico destas bibliotecas é de 64 000 000 sequências diferentes. O vector inactivado (fdBlaI1) foi produzido por mutagénese de fdBla⁺ dirigida ao sítio, utilizando o método do fósforo-tioato (Nakamaye, K.C. e Eckstein, F. (1986) Nucl. Acid Res. 14, 9679-9688). Este vector caracteriza dois novos sítios de restrição, BbsI e SgrAI, e um codão stop que inactiva o enzima (esquema 1a).

Esquema 1a: sequência de fdBlaI1 entre os codões 100 e 109 do gene de β -lactamase (os sítios de restrição estão sublinhados, a base inserida para introduzir o codão stop está a negrito, os resíduos codificados são exibidos por baixo da sequência de ADN):

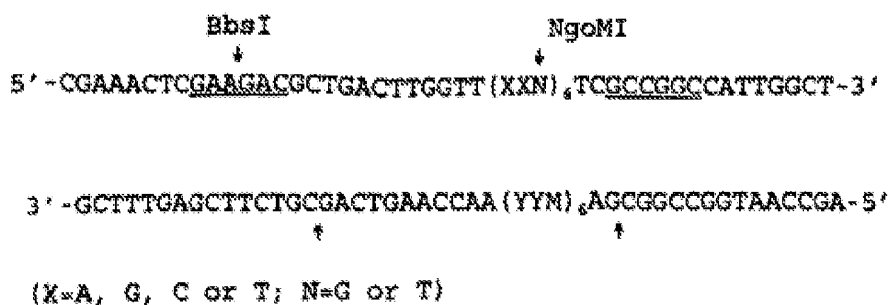
BbsI	SgrAI
AATGACTT GTCTTC GTGACT CACCGGTGACA	
N D L S S STOP	
100	102

Foram preparadas duas cassetes de oligonucleótido de espiral dupla, como se mostra nos esquemas 1b e 1c, por formação de anel de um pequeno *primer* da parte não degenerada em 3' do oligonucleótido sintético que contém as sequências aleatórias, elongação do *primer* catalisada por T4 polimerase e purificação em poliacrilamida a 15%.

Esquema 1b: sequência do oligonucleótido que contém a cassette aleatória e o *primer*:



Esquema 1c: cassette de espiral dupla para a construção da lib1A-B (os sítios de restrição estão sublinhados, os sítios de clivagem para BbsI são indicados por setas).



O vector foi restrito com BbsI e SgrAI e agarose purificada. A cassette foi restrita com BbsI e NgoMI. Foi então ligado com o vector um excesso décuplo da cassette. O vector contaminante fdBlaI1 foi removido por digestão com BbsI. O produto foi de novo posto em suspensão em 100 µL de

tampão em preparação para a electroporação. Foram utilizados por duas vezes 4 μ L desta mistura de ligação para transformar células TGI competentes para produzir as bibliotecas lib1A e lib1B. Amostras destas bibliotecas foram aplicadas em placas sobre meio LB que continha 10 μ g/mL de tetraciclina, permitindo a determinação do número de clones obtidos para 4 μ L de electroporação, isto é: $1,8 \times 10^6$ clones e $4,7 \times 10^6$ clones para, respectivamente, lib1A e lib1B. As actividades das bibliotecas lib1A-B foram avaliadas por aplicação em placa de amostras de bactérias sobre placas com diferentes concentrações de ampicilina e contagem dos clones obtidos após a incubação a 37°C ou a 23°C. Estas titulações permitiram a determinação das condições para se seleccionarem, de forma não ambígua, clones com actividades superiores a 30-40 s^{-1} (isto é, incubação a 37°C durante 17 horas sobre placas de LB que continham 10 μ g/mL de ampicilina recém-dissolvida). As actividades das bibliotecas são baixas, uma vez que apenas 0,05% e 0,08% dos seus clones são capazes de crescer em 10 μ g de ampicilina/mL a 37°C. As medições de actividade realizadas em diversos clones individuais escolhidos nestas condições confirmaram esta actividade. Ver o Quadro 1. Foram sequenciados vários clones individuais. A variabilidade das sequências é moderada e estão presentes clones com sequências encurtadas. Isto foi observado independentemente do facto de os oligonucleótidos degenerados utilizados para a construção dos insertos terem sido purificados

sobre acrilamida. O passo de purificação é eficiente, mas as inserções provavelmente não são bem toleradas nesta região, por consequência, são seleccionados os raros clones activos correspondentes largamente a sequências encurtadas.

As fracções activas das bibliotecas lib1A-B foram produzidas em larga escala (= lib1C₂ e lib1C₄). As lib1A-B deveriam conter $6,4 \times 10^7$ vezes 0,05%-0,08% de clones em crescimento em placas contendo 10 µg/mL de ampicilina, isto é, entre 32 000 e 51 000 clones. O nosso objectivo é produzir o fago completo e bibliotecas de ADN. Estas últimas serão utilizadas para se criar a biblioteca de recombinação lib4. Para se produzir material suficiente para o isolamento da biblioteca de ADN, foram necessárias duas séries de aplicação em placa sobre grandes placas. Na primeira série o produto de catorze electroporações de 4 µL foi aplicado, após a diluição em 52 mL de meio Soc, sobre duas placas de 23 × 23 cm (meio sólido contendo 10 µg/mL de tetraciclina e 10 µg/mL de ampicilina). Após 18 horas de crescimento a 37°C, as bactérias foram recolhidas em 120 mL de meio LB líquido. Uma diluição de 60 vezes a solução das células diluída até uma densidade óptica a 600 nm de 0,5 foi aplicada em dez placas grandes para se produzirem 79 000 clones (libC₂). A experiência foi repetida e foram obtidos 150 000 clones (libC₄). A partir destes foram preparadas bibliotecas de fagos e de ADN, respectivamente, como é descrito no exemplo 1 e por métodos convencionais (Sambrook et al. (1989) Molecular cloning: A Laboratory

Manual, 2.^a edição, Cold Spring Harbor Laboratory). Foram produzidos alguns clones individuais em quantidade para se medir a sua actividade e determinar a sua sequência. Ver o Quadro 2.

Foram usados os mesmos protocolos para produzir a biblioteca lib1D. Foi construída uma cassette por conversão do oligonucleótido autohibridizante mostrado no esquema 1d na sua forma de espiral dupla (esquema 1e).

Esquema 1d: sequência do oligonucleótido autohibridizante que contém a cassette aleatória

NgoMI BbsI BbsI
 5' -GGGAGGGAAGCCGGCGA (YNN)₆CAAGTCAGGGTCTTCGAAGACCCTG

Esquema 1e: cassette de espiral dupla para a construção da lib1A-B: os sítios de restrição estão sublinhados, os sítios de clivagem para BbsI e NgoMI são indicados por setas.

NgoMI BbsI
 5' -GGGAGGGAAGCCGGCGA (YNN)₆CAAGTCAGGGTCTTC-
 3' -CCCTCCCTTCGGCCGCT (XMM)₆GTTCAGTCCAGAAG-

BbsI NgoMI
 -GAAGAGCCTGACTTG(MMX)₆TCGTCGGCTTCCTCCC -3'
 -CTTCTCGGACTGAC(YNN)₆AGCGGCCGAAGGGAGGG -5'

Após a purificação e restrição por BbsI e NgoMI, esta cassete foi ligada no vector fdBlaI1 restrito e purificado com agarose. O vector de clonagem contaminante foi removido por digestão com BbsI e a mistura de ligação foi utilizada para a transformação de células TG1 por electroporação. 3 μ L forneceram $9,2 \times 10^6$ transformantes, entre os quais 0,11% produziram um enzima suficientemente activo para crescer num meio que continha 10 μ g/mL de ampicilina. A biblioteca completa (lib1D2) foi produzida como é descrito para lib1C2 e lib1C4. Foram determinadas a actividade e a sequência de alguns clones. Ver o Quadro 3.

Quadro 1: sequências e actividades de clones de lib1 A
escolhidos sobre 10 µg de ampicilina/mL a 37°C

clones		sequência inserida							kcat (s ⁻¹) ^a
fdBla	V ₁₀₃	-	-	-	-	E ₁₀₄	Y ₁₀₅	S ₁₀₆	ND
Lib1A-01		-	-	-	-	V	S		29
Lib1A-02		-	-	-	L	H	S		16
Lib1A-03		K	A	G	S	D	G		70
Lib1A-04		G	G	P	R	S	W		15
Lib1A-05		K	N	C	G	K	C		12
Lib1A-06		D	V	P	G	A	G		47
Lib1A-07		K	S	G	E	H	S		145
Lib1A-08		-	-	-	P	G	G		74
Lib1A-09		R	A	G	N	H	S		265
Lib1A-10		D	P	P	G	Y	G		9

^a kcats de fagos produzidos a 23°C (penG como substrato). ND = não determinado

Quadro 2: sequências e actividades de clones de lib1C₄.

clones		sequência inserida							kcat (s ⁻¹) ^a
fdBla	V ₁₀₃	-	-	-	-	E ₁₀₅	Y ₁₀₅	S ₁₀₆	ND
Lib1C4-11		R	F	G	N	D	W		159
Lib1C4-12		-	-	-	-	W	W		ND
Lib1C4-13		-	-	R	S	H	W		ND
Lib1C4-14		-	-	-	-	Q	Y		ND
Lib1C4-15		D	Q	M	G	G	G		ND
Lib1C4-16		R	A	G	S	T	W		64
Lib1C4-17		K	G	G	L	E	S		721
Lib1C4-18		-	-	-	-	S	N		ND
Lib1C4-19		-	-	-	-	E	G		ND

^a kcats de fagos produzidos a 23°C (penG como substrato). ND = não determinado

Quadro 3: sequências e actividades de clones de lib1D₂.

clones		sequência inserida							kcat (s ⁻¹) ^a
fdBla	V ₁₀₂	-	-	-	V ₁₀₃	E ₁₀₄	Y ₁₀₅	S ₁₀₆	ND
Lib1D2-02		-	-	-	V	G	G		ND
Lib1D2-03		-	-	-	V	T	Y		ND
Lib1D2-04	F	-	-	-	G	T	W		ND
Lib1D2-05		L	P	N	L	D	T		224
Lib1D2-06		-	-	-	I	S	W		ND
Lib1D2-07		N	R	S	G	S	W		2506
Lib1D2-08		D	V	S	G	G	H		337
Lib1D2-09		L	H	S	G	G	W		ND
Lib1D2-10		S	R	A	G	G	Y		ND

^a kcats de fagos produzidos a 23°C (penG como substrato). ND = não determinado

2. Construção de uma biblioteca no anel que precede a hélice $\alpha 11$ de β -lactamase (lib3).

O anel que precede a hélice $\alpha 11$ (resíduos 271-272) de β -lactamase foi escolhido como um sítio de inserção em virtude da sua posição relativamente próxima da bolsa catalítica e da sua fraca conservação da sequência entre as β -lactamases conhecidas. A região está também bem localizada com vista ao sítio de inserção da biblioteca lib1 (resíduos 103-106) para a construção de um epítopo não linear. Na realidade, estas duas regiões estão situadas em margens opostas do sítio activo. Ver a fig. 1c.

Numa experiência, os aminoácidos T₂₇₁ e M₂₇₂ da β -lactamase foram permutados por uma sequência degenerada de 5 resíduos para dar origem à biblioteca lib3d. Esta biblioteca foi construída seguindo-se a estratégia usada para construir as bibliotecas lib1. O vector inactivado (fdBlaI2) foi produzido por mutagénese dirigida ao sítio de fdBla⁺, utilizando-se o método do fósforo-tioato (Nakamaye, K.C. e Eckstein, F. (1986) Nucl. Acid Res. 14, 9679-9688). Este vector caracteriza dois novos sítios de restrição BbsI e um codão *stop* que inactiva o enzima (esquema 2a).

Esquema 2a: sequência de fdBlaI2 ente os codões 267 e 278 do gene de β -lactamase (sítios de restrição sublinhados com os sítios de clivagem indicados, base inserida para introduzir um codão stop em negrito, resíduos codificados por baixo da sequência de ADN):

```

          BbsI          BbsI
      †      †      †      †
GGGAGTCAGAGTCTTCTTATGTGAAGACCGAAATAGACAGA
      G  S  Q  S  S  M  STOP
267                      272

```

As cassetes de oligonucleótidos de espiral dupla foram preparadas como se mostra nos esquemas 2b e 2c por formação de anel de um pequeno *primer* sobre a parte não degenerada em 3' do oligonucleótido sintético que contém as sequências aleatórias, elongação do *primer* catalisada por T4 polimerase e purificação sobre poliacrilamida a 15%.

Esquema 2b: sequência do oligonucleótido que contém a casete aleatória e o *primer*

```

5' AGCCAATGGAAGACTTGAGTCAGGCA (XXN), GATGAACGAAATGCGTCTTCGAGT
TTCG-3

3' -
CGCAGAAGCTCAAAGC-5

```

Esquema 2c: casete de espiral dupla para a construção da biblioteca lib3d: os sítios de restrição BbsI estão sublinhados, os sítios de clivagem são indicados por setas.

```

          BbsI          †          BbsI
5' -
AGCCAATGGAAAGACTTGAGTCAGGCA (XXN), GATGAACGAAATGCGTCTTCGAGTT
CG-3
3' -
TCGGTTACCTTCTGAACTCAGTCCGT (XYM), CTA†CTTGCTTTACGCAGAAGCTCAAA
GC-5

```

(X=A, G, C or T; N=G or T)

O vector e a cassette foram restritos com BbsI. Foi então ligado com o vector um excesso décuplo da cassette. O vector contaminante fdBlaI2 foi removido por digestão com BbsI. O produto foi de novo posto em suspensão em 100 µL. 4 µL desta mistura de ligação foram utilizados para transformar células TG1 competentes e produzir as bibliotecas lib3d. Amostras destas bibliotecas foram aplicadas em placas em meio LB sólido que continha 10 µg/mL de tetraciclina para determinar o número de clones obtidos por electroporação de 4 µL, isto é, $4,5 \times 10^5$ clones. As actividades da biblioteca foram avaliadas por aplicação em placa de amostras de bactérias transformadas sobre placas com diferentes concentrações de ampicilina e contagem dos clones obtidos após a incubação a 37°C ou a 20°C. Entre 2 e 3% dos clones provaram ser activos, isto é, cerca de 8×10^4 clones diferentes. A metionina na posição 272 é fortemente conservada em clones activos. Ver o Quadro 4. Cerca de um terço dos clones seleccionados sobre 10 µg de ampicilina continham sequências mais curtas do que 5 resíduos. Isto é o resultado da presença durante a clonagem do inserto degenerado no vector de β-lactamase de uma pequena percentagem de oligonucleótidos de espiral dupla encurtados; os clones mais curtos inseridos são mais tarde intensamente seleccionados, uma vez que são mais activos.

Embora a biblioteca lib3d fosse suficientemente grande e activa para ser reconhecida com lib1, a sua variabilidade sugeriu a construção de uma segunda biblioteca na mesma

região, mas substituindo apenas o resíduo T₂₇₁. O tamanho do inserto foi aumentado para 6 aminoácidos, em vez de 5, a fim de ter em consideração a posição mais remota do novo sítio de inserção. A biblioteca lib3f foi construída como a lib3d, por clonagem de uma cassete no vector fdBlaI2, a cassete é exibida no esquema 2d.

Esquema 2d: cassete de espiral dupla para a construção de lib3f: os sítios de restrição BbsI estão sublinhados, os sítios de clivagem são indicados por setas.

```

5'-      BbsI      *                      *      BbsI
AGCCAATGGAAGACTTGAGTCAGGCA (XIN),ATGGATGAACGAAATGCGTCTTCGAG
TTTCG-3
TCGCTTACCTTCTGAACTCAGTCCGT (XYM),TACCTACTTGCTTTACCCAGAAGCTC
AAAGC-5
                      †                      †

(X-A, G, C, T; N=G, T)

```

A transformação de TG1 com 4 µL da mistura de ligação forneceu $7,0 \times 10^6$ clones.

A biblioteca produzida, lib3f, era muito activa, uma vez que cerca de 7% dos clones foram capazes de crescer sobre 10 µg de ampicilina/mL a 37°C. A sequenciação de vários clones seleccionados naquelas condições indicava que os clones activos tinham uma ampla variabilidade de sequências e não continham sequências de inserção encurtadas. Ver o Quadro 5. Isto é um resultado do facto de os oligo-nucleótidos degenerados terem sido purificados sobre gel de acrilamida.

As fracções activas da biblioteca lib3f foram preparadas por electroporação por três vezes de 100 µL de células TGl com 6 µL da mistura de ligação e diluindo primeiro a 12 mL de meio Soc, em seguida a 48 mL de meio LB. As bactérias foram aplicadas em placa sobre 10 grandes placas (23 × 23 cm) e cresceram durante 18 horas a 37°C. As bibliotecas foram depois recuperadas das placas com 3 vezes 20 mL de meio LB a 4°C. As bactérias foram centrifugadas e o ADN de espiral dupla foi extraído por meio de métodos habituais e foi purificado em gradientes de CsCl para se obterem grandes quantidades de ADN; os fagos foram purificados a partir dos sobrenadantes (= lib3G). O tamanho das bibliotecas, cerca de 4×10^6 clones activos diferentes, e a actividade da biblioteca lib3G deveriam permitir uma selecção directa por afinidade com anticorpos psa (ver adiante). A lib3d foi manipulada de forma análoga para produzir a biblioteca lib3E activa.

Quadro 4: sequências e actividades de vários clones da biblioteca lib3d seleccionados entre os 3% mais activos.

clones		Sequência inserida						kcat (s ⁻¹) ^a
fdBla	A ₂₇₀	-	-	-	T ₂₇₁	M ₂₇₂	D ₂₇₃ E ₂₇₄ R ₂₇₅	ND
Lib3-01		-	-	-	S	M		1133
Lib3-02		-	-	A	T	T		203
Lib3-03		T	A	K	M	D		127
Lib3-04	P	P	T	V	S	M		92
Lib3-05		R	Q	S	T	M		48
Lib3-06	D	-	-	D	R	A		1,1
Lib3-07		G	R	T	T	M		44
Lib3-08		S	D	Q	P	L	L	140-

(continuação)

clones		Sequência inserida		kcat (s ⁻¹) ^a
Lib3-09		H T A S M		137
Lib3-10		- - - N G		278
Lib3-11		K S V G L		ND
Lib3-12		A N I S L		ND
Lib3-13		- - - N I		ND
Lib3-14		P V A P I		ND
Lib3-15		R P T T L		ND
Lib3-16		P N A N M		ND
Lib3-17		- - A T T		ND
^a kcats de fagos produzidos a 23°C (penG como substrato). ND = não determinado				

Quadro 5: sequências e actividades de clones de lib3f seleccionados em 10 µg de ampicilina/mL a 37°C

clones		Sequência inserida		kcat (s ⁻¹) ^a
fdBla	A ₂₇₀	- - - - T ₂₇₁	M ₂₇₂ D ₂₇₃ E ₂₇₄ R ₂₇₅	ND
Lib3-18		A T S F A P		208
Lib3-19		R R K Q P T		32
Lib3-20		T A H V A S		99
Lib3-21		T N K Q P S		73
Lib3-22		K S Y T P E	Q	85
Lib3-23		K W N Y T T		ND
Lib3-24		G E H E A G		114
Lib3-25		E E N G R P	Q	100
Lib3-26		Q L Q V P P		186
Lib3-27		A P G N D G		64
Lib3-29		A G A T Y E		111
^a kcats de fagos produzidos a 23°C (penG como substrato). ND = não determinado				

3. Recombinação das bibliotecas lib1 e lib3.

As bibliotecas (lib1C2, 1C4 e 1D2 na região 103-105, e lib3E e 3G na região 271-272) foram seleccionadas em ampicilina e continham essencialmente clones cujos k_{cats} são maiores do que 40 s^{-1} (isto é, $\geq 4\%$ da actividade do tipo selvagem). O tamanho da bibliotecas lib1 e lib3 são cerca de 1×10^4 e 4×10^6 clones, respectivamente.

Foi realizada uma selecção posterior da biblioteca lib3G em ampicilina antes da sua recombinação com a biblioteca lib1. A lib3G é muito grande e tem uma larga diversidade de sequências, de forma que foram seleccionados somente os clones mais activos. Espera-se que isto aumente as possibilidades de obtenção de uma biblioteca recombinante activa. A biblioteca lib3G foi seleccionada sobre 30 μg de ampicilina/mL a 37°C , o que permitiu a selecção de 10% dos seus clones. Desta forma, a actividade da biblioteca foi aumentada de um factor de 1,5.

Para se construir a biblioteca recombinante, as bibliotecas lib1C2, 1C4 e 1D2 foram reunidas e foram recombinadas com a biblioteca lib3H. As bibliotecas lib1 acima combinadas e a biblioteca lib3H foram digeridas com EcoRI e PvuI. A biblioteca de grandes fragmentos derivada de lib1 e a biblioteca de pequenos fragmentos derivada de lib3H foram purificadas sobre gel, ligadas, e foram utilizadas para transformações. A biblioteca (recl) era

muito activa, em virtude de cerca de 20% dos seus clones serem capazes de crescer sobre 10 µg de ampicilina/mL a 37°C. Isto significa que 20% dos seus clones têm actividades superiores a 40 s⁻¹. A sequenciação destes clones mostrou que apenas 2 clones/13 continham simultaneamente um inserto completo em ambas as localizações. Ver o Quadro 6. Esta frequência é o resultado da presença na biblioteca lib1 de cerca de 50% de insertos encurtados. Para se determinar as actividades dos clones correctamente construídos, foram medidos os kcats de diversos clones não seleccionados em ampicilina. Entre 12 clones analisados apenas 2 tinham actividades menores do que 10 s⁻¹. Ver o Quadro 7. Parece que os clones bem construídos possuem actividades relevantes, mesmo que a maioria deles seja provavelmente incapaz de crescer sobre 10 µg de ampicilina/mL.

Foram realizadas várias abordagens diferentes da clonagem para se obter uma biblioteca recombinante de grande dimensão. A melhor biblioteca foi produzida em grande escala (= lib rec4b) e contém cerca de 5×10^7 clones diferentes. Esta biblioteca não foi submetida a qualquer outro tratamento antes da selecção sobre anticorpos psa. A selecção sobre ampicilina pode ser utilizada para ampliar a proporção de clones bem construídos.

Quadro 6: sequências e actividades de clones rec 1 seleccionados sobre 10 µg de ampicilina/mL a 37°C

clones	Sequências inseridas																kcat (s ⁻¹) ^a	
fdBla	L ₁₀₂	-	-	-	V ₁₀₃	E ₁₀₄	Y ₁₀₅	S ₁₀₆	-	A ₂₇₀	-	-	-	-	-	T ₂₇₁	M ₂₇₂	ND
Rec 1-01		E	R	S	G	H	W				-	-	-	-	-	T		145
Rec 1-03		-	-	-	V	E	Y				R	T	A	K	V	S		57
Rec 1-04		-	-	-	V	T	W				Q	K	V	E	P	S		61
Rec 1-05		-	-	-	V	L	G				-	-	-	-	-	H		145
Rec 1-06		-	-	-	V	Q	G				T	G	V	Y	P	S		170
Rec 1-07		-	-	-	C	M	G				Q	G	P	W	A	S		380
Rec 1-09*		-	-	-	I	E	G				I	G	D	Y	S	K		251
Rec 1-10		-	-	-	V	D	W				T	G	N	Q	A	T		93
Rec 1-11*		-	-	-	V	S	G				S	N	G	E	H	S		54
Rec 1-12		-	L	A	S	G	Y				S	G	H	E	P	T		139
Rec 1-14		-	-	-	V	P	Y				D	S	K	E	T	S		304
Rec 1-15*		V	R	S	G	P	W				T	A	R	W	A	N		72
Rec 1-16		-	-		V	M	G				T	A	N	E	H	T		155

^a kcats de fagos produzidos a 23°C (PenG)

ND = não realizado

* clones que contêm uma mutação adicional (R₂₇₅->L)

Quadro 7: actividades de clones rec 1
não seleccionados em ampicilina

clones	kcat (s ⁻¹) ^a
Rec 1-17	57
Rec 1-18	12
Rec 1-19	187
Rec 1-20	32
Rec 1-21	32
Rec 1-22	1,8
Rec 1-23	15
Rec 1-24	224
Rec 1-25	67
Rec 1-26	155
Rec 1-27	4,6
Rec 1-28	20
^a kcats de fagos produzidos a 23°C (PenG)	

EXEMPLO 3

1. Selecção para a ligação de anticorpos monoclonais psa10 e psa66

Foram realizadas três séries de selecções sobre as bibliotecas lib3j (preparada por reunião das bibliotecas lib3E, lib3G(a) e lib3G(b)) e rec4B bateando sobre esferas magnéticas revestidas com estreptavidina (Dynabeads M280 de Dynal AS, Oslo, Noruega) saturadas com os anticorpos psa10 e psa66 biotinilados como agentes selectores (de CanAG

Diagnostics AB, Gothenburg, Suécia). Foram extraídos destas bibliotecas os fagos que exibiam β -lactamases mutantes com elevada afinidade para os anticorpos. Foi obtido, em cada caso, um factor de amplificação maior do que 1000 vezes, entre a primeira série de selecção e a terceira (relação do número de fagos eluídos entre a terceira e a primeira séries de selecção - eluição a pH baixo ou por adição de substrato). Isto indica que foi alcançada uma selecção eficiente.

O efeito dos mAbs sobre a actividade dos enzimas foi determinado após a incubação dos enzimas de fago com várias concentrações de mAb durante pelo menos 10 minutos, antes da adição do substrato. As taxas de hidrólise foram sempre determinadas em condições em que a concentração do substrato é pelo menos 3 vezes maior do que o K_m dos enzimas modificados, ligados ou não ao seu mAb respectivo. As constantes de dissociação entre os enzimas e os mAbs foram determinadas a partir das curvas de inibição apresentadas na fig. 2, com base nas seguintes equações:

$$[E.mAb]^2 - [E.mAb]([E]_t + [mAb]_t + k_d) + [E]_t[mAb]_t = 0$$

$$k_{cat\ obs} = k_{cat\ E} - ([E.mAb]/[E]) \times (k_{cat\ E} - k_{cat\ E.mAb})$$

em que $[E]_t$ e $[mAb]_t$ são as concentrações totais do enzima e do anticorpo, respectivamente, $[E.mAb]$ é a concentração do complexo enzima-mAb, k_d é a constante de dissociação do complexo enzima-mAb, $k_{cat\ E}$ e $k_{cat\ E.mAb}$ são as constantes catalíticas do enzima livre e do complexo.

Depois da terceira série de selecção, foi determinado o efeito da ligação do anticorpo psa sobre a actividade em PenG como substrato, nas bibliotecas seleccionadas; foi observada uma ligeira inibição no caso da biblioteca rec4b seleccionada com psa66 ($\sim 20\%$ a $3,3 \times 10^{-7}$ M de psa66). Este efeito inibitório alcançou 40-45% quando foram utilizados substratos maiores (PADAC ou Centa).

A caracterização dos fagos eluídos a partir da terceira série de selecção indicou que foi exercida uma forte selecção sobre a região lib3 das bibliotecas. Nesta localização foi observada apenas uma fraca variabilidade da sequência. Ver os Quadros 8 e 9. Não foi possível observar-se qualquer conservação da sequência na região lib1. Esta região poderia, no entanto, contribuir para a ligação do anticorpo, uma vez que os resíduos de tipo selvagem estão substituídos nestes clones. Acredita-se, no entanto, que os epítomos psa10 e psa66 sejam provavelmente lineares. No caso dos fagos seleccionados sobre psa66, foi possível ser derivado um motivo de consenso $SX_{(1-0)}L/IQ$. Este motivo também estava presente em clones isolados previamente a partir de uma biblioteca criada no anel ω (lib2) após a selecção sobre o mesmo anticorpo. Não foi encontrado este motivo na sequência de psa. Com psa66 foi seleccionado um mimótopo. Foi encontrada uma sequência HPQ em diversos clones seleccionados em psa10. Isto sugere que a selecção foi realizada, pelo menos em parte, sobre a estreptavidina em vez do anticorpo. Como era visível um leve precipitado na preparação biotinilada de psa10, é possível que o

anticorpo estivesse desnaturado e não cobrisse as esferas de estreptavidina. Ensaiou-se se a actividade das bibliotecas lib3j e rec4b, seleccionadas em psa10, poderia ser regulada pela ligação da estreptavidina, mas não foram obtidos resultados positivos. Foi observada uma ténue estimulação no caso da biblioteca rec4b.

Foram analisados diversos clones individuais, seleccionados sobre psa66, das bibliotecas lib3j e rec4b. Todos eles possuem actividades elevadas. Ver o Quadro 9. Não se descobriu, no entanto, qualquer regulação no caso dos clones isolados a partir da biblioteca lib3j. Os clones seleccionados eram bastante diversos, na medida em que a sequência na região lib1 é variável e o nível de modulação dependia dos clones, mas variava principalmente entre 30 e 60% de inibição em PADAC (R. N. Jones et al., Clin. Microbiol., 15:677-683, 1982) ou Centa (R. N. Jones et al., Clin. Microbiol., 15:954-958, 1982) (a $3,3 \times 10^{-7}$ M de psa66). Esta percentagem pode ser tão alta quanto 70% ou mais quando a concentração de psa66 é aumentada para $1,7 \times 10^{-6}$ M. A inibição é menos importante quando é usado PenG como substrato. Crê-se que a diferença de comportamento seja provavelmente resultado principalmente da diferença de tamanho dos substratos, sendo os substratos maiores hidrolisados menos rapidamente na presença do anticorpo ligado. A inibição máxima (a $[psa66] = \infty$) foi calculada para um dos clones melhor regulados (p66Rb316) e alcançou 68% em PADAC e 75% em Centa ($k_d = 1,2 \times 10^{-7}$ M). Como a biblioteca rec4b seleccionada com psa66 parece conter

muitos indivíduos diferentes, não se pode excluir que estejam nela presentes clones melhor regulados.

No clone p66Rb316, os resíduos de tipo selvagem E₁₀₄-Y₁₀₅ são substituídos por T₁₀₄G₁₀₅ e o resíduo tipo selvagem T₂₇₁ é substituído por DGSRQ. Inesperadamente, R₂₇₅ é modulado para Q₂₇₅. Estas sequências não estão presentes no antígeno específico da próstata (psa). Por consequência, o anticorpo monoclonal reconhece um mimótopo.

Quadro 8: clones seleccionados em psa 10

clones	Sequências inseridas		kcat-psa66/ +psa66 (s ⁻¹) ^a
			S=PenG
fdBla	V ₁₀₃ EY	T ₂₇₁ M	
			[psa10]=3,3 × 10 ⁻⁷ M
P10Aj3	biblioteca ^a		187/179
P10Aj301	VEY	HPQNDDM	ND
P10Aj302	VEY	HPQNDDM	ND
P10Aj303	VEY	HPQNDDM	ND
P10Aj304	VEY	HPQGD (nãoS)M	ND
P10Aj305	VEY	HPQNDDM	ND
			[psa10]=3,3 × 10 ⁻⁷ M
P10RB3	Biblioteca ^b		52/52
P10RB311	VRY	SDGHRLM (R ₂₇₅ ->L)	ND
P10RB312	VKSGVA	SDGHRLM (R ₂₇₅ ->L)	ND
P10RB313	VKSGNTW	SDGHRLM (R ₂₇₅ ->L)	ND
P10RB314	VDRTKGW	SDGHRLM (R ₂₇₅ ->L)	ND
P10RB315	VDGPNGH	SDGHRLM (R ₂₇₅ ->L)	ND
^a lib3j e ^b rec4b fagos da terceira série de selecção			
* kcats de fagos produzidos a 23°C			

Quadro 9: clones seleccionados em psa 66

clones	Sequências inseridas		Kcat
			S=PenG
fdBla	V ₁₀₇ EY	T ₁₇₁ M	
			[psa66]=3,3 × 10 ⁻⁷ M
P66Aj3	biblioteca ^a		444/425,04%
P66Aj306	VEY	TPGSLQM(R ₂₇₅ ->L)	ND
P66Aj307	VEY	SAHQDYI(R ₂₇₅ ->L)	ND
P66Aj308	VEY	TPGSLQM(R ₂₇₅ ->L)	ND
P66Aj309	VEY	TPGSLQM(R ₂₇₅ ->L)	ND
P66Aj3010	VEY	TPGSLQM(R ₂₇₅ ->L)	ND
			[psa66]=3,3 × 10 ⁻⁷ M
P66RB3	biblioteca ^b		405/326;20%
P66RB316	VTG	DGSRIQM(R ₂₇₅ ->L)	182/134;26%
P66RB317	VKGGHGA	TL	ND
P66RB318	VVG	DGSRIQM(R ₂₇₅ ->L)	ND
P66RB319	VQG	DGSRIQM(R ₂₇₅ ->L)	ND
P66RB321	ND	ND	ND
P66RB322	ND	ND	ND
P66RB323	ND	ND	ND
P66RB324	ND	ND	ND
P66RB325	ND	ND	ND
P66RB326	ND	ND	ND
P66RB327	ND	ND	ND
P66RB328	ND	ND	ND
P66RB329	ND	ND	ND
P66RB330	ND	ND	6015/4273;29%

(continuação)

P66RB331	ND	ND	ND
P66RB332	ND	ND	ND
^a lib3j e ^b rec4b fagos da terceira série de selecção			
Kcat-psa66/+psa66 (s ⁻¹)*;% inibição de idade			
S = PADAC		S = Centa	
[psa66]=3,3 × 10 ⁻⁷ M			
ND			
67,9/65 8;03%			
42,4/42,4;00%			
ND			
ND			
ND			
[psa66]=3,3 × 10 ⁷ M	[psa66]=3,3 × 10 ⁶ M	[psa66]=3,3 × 10 ⁻⁷ M	[psa66]=3,3 × 10 ⁻⁶ M
23,8/14,2;41%	ND	12,2/6,7;45%	ND
25,1/13,6;46%	20,5/78;62%	14,7/7,2;51%	15,4/4,1;73%
28,2/26,5;06%	ND	ND	ND
28,6/11,9%;58%	ND	13,8/5 8;58%	13,3/3,5;74%
47,4/32,6;31%	ND	ND	ND
17,2/09,3;46%	ND	ND	ND
27,2/23,8;13%	ND	ND	ND
19,0/13,2;31%	ND	ND	ND
22,4/15,2;32%	ND	ND	ND
21,6/14,9;31%	ND	ND	ND

(continuação)

19,6/19,2;02%	ND	ND	ND
20,5/19,6;04%	ND	ND	ND
29,2/15,8;46%	ND	ND	ND
26,3/14,3;46%	ND	ND	ND
6,17/444;31%	ND	33,5/46,2;-32%	33,2/53,7;-62%
25,7/141;45%	ND	ND	ND
25,2/23,5;09%	ND	ND	ND

2. Selecção para a ligação do anticorpo monoclonal psa19.

Foram realizadas três séries de selecção sobre a biblioteca lib3j, por pateia, utilizando-se o anticorpo psa19 (CanAG Diagnostics AB, Gothenburg, Suécia). Foram analisados vários clones para a regulação da actividade, por ligação a psa19. Para se realizarem estes ensaios de actividade, o enzima do fago foi diluído em tampão de fosfato 50 mM, a pH 7, a uma concentração de $2,4 \times 10^{-9}$ M. O anticorpo monoclonal psa19 foi adicionado a uma concentração final que variava entre zero e 2,6 μ M. Passados 10 minutos foi adicionado o substrato (benzil-penicilina) a uma concentração final de 5×10^{-4} M. A actividade foi medida por determinação da taxa de diminuição da absorvância a 232 nm. Nas figs. 2 e 3 são exibidos gráficos do efeito inibitório do anticorpo monoclonal psa19 sobre a actividade catalítica da β -lactamase mutante sobre o fago identificado como psa19Aj302 e extraído da biblioteca

lib3j. A fig. 3 é uma versão expandida da fig. 2. Representa as actividades como uma função de [psa19] entre 0 e 50 nM. A actividade é reduzida para 60% a uma concentração do anticorpo psa19 de 4×10^{-9} M e a 17% de saturação. Isto permite a detecção do próprio analito PSA a uma concentração nM por observação de um aumento da actividade.

No clone psa19Aj302, o resíduo de tipo selvagem T₂₇₁ foi substituído por SWPVKS. Inesperadamente, o R₂₇₅ foi também mutado para Q₂₇₅. Estas sequências não estão presente no psa. Desta forma, o anticorpo monoclonal reconhece um mimótopo.

Foram também aplicadas três séries de selecção à biblioteca rec4B, utilizando-se o anticorpo psa19. Foi descoberto um clone cuja actividade era regulada por ligação do anticorpo psa (psa1919Rb404). O enzima do fago foi diluído em tampão de fosfato 50 mM a pH 7, a uma concentração de $2,4 \times 10^{-9}$ M. O anticorpo psa foi adicionado a uma concentração final que varia entre zero e 2,6 μ M. Passados 10 minutos foi adicionado o substrato (benzil-penicilina) a uma concentração final de 5×10^{-4} M. A actividade foi medida por determinação da taxa de diminuição da absorvância a 232 nm. Foi descoberto um kcat de 134 s^{-1} na ausência de psa19. A ligação a psa19 inibe a actividade para 8% da que é observada na ausência do anticorpo. Metade do efeito é observado a uma concentração de psa19 de 50 nM ($K_d = 5 \times$

10^{-8} M para o complexo entre psa19 e a β -lactamase mutante). Ver a fig. 4. A sequenciação deste clone revelou que os resíduos de tipo selvagem E₁₀₄-Y₁₀₅ foram substituídos por Q₁₀₄-G₁₀₅ e o resíduo de tipo selvagem T₂₇₁ foi substituído pela sequência GPWPRQ. A sequência não está presente em psa.

3. Sumário.

Foram construídas duas grandes bibliotecas, isto é, a lib3j e a rec4b. Estas bibliotecas são muito activas e permitiram a selecção de anticorpos de clones cujos valores kcat oscilavam entre 3 e 13% dos do clone de tipo selvagem Fdbla. A construção de uma biblioteca activa foi assumida como sendo um requisito prévio da descoberta de mutantes de β -lactamase reguláveis. O Quadro 10 resume os resultados da selecção de lib3 e lib4.

Uma única selecção por afinidade, com êxito, da biblioteca rec4b permitiu obter clones que são fortemente regulados pelo seu parceiro de ligação, isto é, pelo anticorpo psa66.

Quadro 10: características dos clones de lib3 e lib4 seleccionados sobre mAbs de psa

Agente de selecção	Clone	Frq.	Sequência	Substrato	Kcat (s^{-1})	Actividades relativas (-/+ psa mAb)	Kd(M)
	FdBla	-	wt	PenG	1697	1/-	
				PADAC	666	1/-	
psa 10mAb	P10L4-01	9/11	E104Y->RN; T271->YSDDR;V; R275->L	PenG	320	1/0,18	7,5 10 ⁻⁷
psa 66mAb	P66IL3-01	4/5	T271->TPGSLQ; R275->L	PADAC	75	1/0,59	1,1 10 ⁻⁶
	P66L4-01	3/12	E104Y->TG T271->DGSRIQ; R275->L	PADAC	21	1/0,32	1,2 10 ⁻⁷
	P66L4-03	2/12	E104Y->VG; T271->DGSRIQ; R275->L	PADAC	30	1/0,34	1,9 10 ⁻⁷
	P66L4-05	1/12	V103E->LLAG T271->WLSPGF; R275->Q	PenG	206	1/0,47	9,7 10 ⁻⁸

(continuação)

Agente de selecção	Clone	Frq.	Sequência	Substrato	Kcat (s^{-1})	Actividades relativas (-/+ psa mAb)	Kd(M)
	P66L4-06	1/12	V103E->LLAG; T271MDER->DLGAV	PADAC	637	1/0,38	3,6 10 ⁻⁷
psa19 mAB	P19L3-01	2/6	T271->SQPVKS; R275->Q	PenG	245	1/0,19	5,2 10 ⁻⁹
	P19L4-01	3/9	E104Y->QG; T271->GPQPRQ	PenG	134	1/0,08	5,0 10 ⁻⁸
	P19L4-04	1/9	E104Y->QG; T271->YFGPKL; R275->L	PenG	321	1/0,24	2,7 10 ⁻⁷
	P19L4-05	1/9	E014Y->QG; T271->PNTPEE; E274->K	PenG	420	1/0,16	2,0 10 ⁻⁷

Foi realizada a caracterização de vários clones bem regulados, isolados sobre mAbs de psa a partir das bibliotecas lib3 e lib4. A maior parte dos clones continha um inserto completo no anel C (clones de lib3 e lib4) mas apenas mutações pontuais nos anéis A (clones de lib4). A falta de um inserto completo no anel A resulta do facto de cerca de 50% dos clones de lib1 activos usados para a construção da biblioteca lib4 não conterem um inserto completo. Estes clones são provenientes da selecção *in vivo* quanto à actividade das bibliotecas lib1, visto que têm uma vantagem de crescimento em relação à maioria dos clones de lib1, activos correctamente mas também de forma fraca (os clones que contêm insertos incorrectos representam menos do que 0,1% dos clones de lib1 não seleccionados). No anel C, foram encontradas diversas mutações "extra" fora da região que sofreu mutagénese, mas dentro do fragmento sintetizado *in vitro* usado para clonar as bibliotecas. Estes clones parecem ter sido também ampliados preferencialmente durante a selecção *in vivo* quanto à actividade. Todos os clones foram ensaiados sobre o substrato de penicilina benzil-penicilina (PenG) e sobre o substrato de cefalosporina PADAC. São ilustrados somente os resultados obtidos com o substrato que proporcionou as inibições mais importantes. Os valores da inibição (actividades relativas) foram determinados na presença de uma concentração de saturação de mAb.

EXEMPLO 4

A biblioteca lib1 foi analisada por pateia directa sobre as Dynabeads M280 para extrair os enzimas de fago regulados por ligação à estreptavidina. Foi encontrado um clone com um k_{cat} de 20 s^{-1} , uma constante de ligação de estreptavidina $K_d = 1,2 \times 10^{-7}$ e um factor de inibição de 1,3. A adição de biotina a uma concentração de 5×10^{-7} restaurou a actividade para aquela que é observada na ausência da estreptavidina. A sequência do peptídeo inserido entre L₁₀₂ e S₁₀₆ em substituição de V₁₀₃-Y₁₀₅ era YHPQNS.

EXEMPLO 5

Foram realizadas três séries de selecção sobre a biblioteca Rec4b por pateia, utilizando-se o anticorpo psa66 (CanAG Diagnostics AB, Gothenburg, Suécia). O clone p66Rb330 foi escolhido e analisado quanto à regulação da actividade por ligação a psa66. Foram utilizados dois substratos. O efeito observado é dependente do substrato. Ver figs. 5A e 5B. Com Centa como substrato foi observada uma activação de 1,72 vezes. Com PADAC foi observada uma activação de 2,6 vezes. Ambas as curvas de activação/inibição podem ser associadas à mesma constante de ligação entre o anticorpo monoclonal psa66 e o enzima: $K_d = 360 \text{ nM}$. Este clone foi sequenciado: os resíduos de tipo selvagem V₁₀₃-Y₁₀₅ foram substituídos por LLAGY e os resíduos de tipo selvagem T₂₇₁-R₂₇₅ foram substituídos por DLGAV. Estas

sequências não estão presentes em PSA e, desta forma, o anticorpo monoclonal reconhece um mimótopo.

EXEMPLO 6

A biblioteca 3 foi pesquisada e dela foi seleccionado o clone P19L3-01. Ver exemplo 3 e Quadro 10. Este clone exibiu a melhor inibição com o psa 19mAb ($K_d = 5$ nM). Este clone foi cultivado e utilizado num estudo sobre a sua resposta à competição com o antigene psa e psa 10 mAb. Foi utilizado como substrato PenG em tampão de fosfato a 50 mM, pH 7,5, na presença de 1 nM do enzima de fago P19L3-01, 5 nM de psa 19 mAb, 200 ng/mL de BSA com várias concentrações de antigene psa. Os níveis do antigene psa variaram de 0,1 nM até 150 nM. O k_{cat} (s^{-1}) foi utilizado como a medida da actividade. Ver a fig. 6.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2010

REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 9207090 A
- WO 9311242 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- *J. Biol. Chem.*, August 1996, vol. 271, 21251-21256
- *P.N.A.S. USA*, June 1995, vol. 92, 5783-5787 [0003]
- *Prot. Eng.*, April 1994, vol. 7, 509-514
- Reiter et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 1239-1245
- Bird et al. *Science*, 1988, vol. 242, 423-426
- Abbas et al. *Cellular and Molecular Immunology*. W.B. Saunders Co, 1991, 47-49
- P. Soumilion et al. *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 237, 415-422
- Plasmin: L. Jaspers et al. conference communication
- R. Eerola et al. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1994, vol. 200, 1346-1352
- P. Soumilion et al. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1994, vol. 47, 175-193
- D.R. Corey et al. *Trypsin. Gene*, 1993, vol. 128, 129-134
- J. McCafferty et al. *Prot. Enging.*, vol. 4, 955-961
- I.N. Maruyama et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 8273-8277
- J. Ku; P.G. Schultz. *Staphylococcal nuclease. Bioorg. Med. Chem.*, 1994, vol. 2, 1413-5
- J. Light; R.A. Lerner. *Bioorg. Med. Chem.*, 1995, vol. 3, 955-97
- M. Widersten; B. Mannervick. *Glutathione transferase. J. Mol. Biol.*, 1995, vol. 250, 115-122
- K. Maenaka et al. *Lysozyme. Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1996, vol. 218, 682-687
- K.D. Janda et al. *Catalytic antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, vol. 91, 2532-2536
- Chalfie et al. *Science*, 1994, vol. 263, 802
- Cheng et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 606
- Levy et al. *Nature Biotechnology*, 1996, vol. 14, 610
- Trahey; McCormick. *Science*, 1987, vol. 236, 542-545
- A.R. Fersht. *J. Mol. Biol.*, 1972, vol. 64, 497-509
- Holm; Sander. *Science*, 1995, vol. 273, 595-602
- Kunkel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, vol. 92, 488-492
- Sayers; Eckstein. *Directed Mutagenesis: A practical approach*. IRL Press, 1991, 49-69
- Munir et al. *J. Biol. Chem.* 1992, vol. 267, 6584-6589
- Brennan et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1995, vol. 92, 5783-5787
- Munir et al. *J. Biol. Chem.*, 1992, vol. 267, 6584-6589
- *Methods in Enzymology*, vol. 165, f9
- Graziani et al. *Oncogene*, 1992, vol. 7, 229-235
- Grilhalde et al. *Gene*, 1995, vol. 166, 165-195
- Kay et al. *Gene*, 1993, vol. 126, 59-65
- Devlin et al. *Science*, 1990, vol. 249, 404-406
- Rebor; Pabo. *Science*, 1994, vol. 263, 671-673
- Jaspers et al. *Biotechnology*, 1995, vol. 13, 378-382
- Parmley; Smith. *Gene*, 1985, vol. 76, 305-318
- de la Cruz et al. *J. Biol. Chem.*, 1988, vol. 263, 4318-4322
- Bass et al. *Proteins*, 1990, vol. 8, 309-314
- Cwiria et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, vol. 87, 6378-6382
- McCafferty et al. *Nature*, 1990, vol. 348, 552-554
- Clackson et al. *Nature*, 1991, vol. 352, 624-626
- Lowman et al. *Biochemistry*, 1991, vol. 30, 10823-10838
- J. McCafferty et al. *Prot. Eng.*, 1991, 955-961
- Kang et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1991, vol. 88, 4383-4386
- Barbas et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, vol. 88, 7978-7982
- Roberts et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, vol. 89, 2429-2433
- Liang et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, vol. 118, 9196-9199
- Liang et al. *Anal. Chem.* 1996, vol. 68, 2426-2431

- Grihalde et al. *Gene*, 1995, vol. 166, 187-195
- McNally et al. *J. Bio. Chem.*, 1995, vol. 270, 19744-19751
- O'Neill ; Hoess. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 1995, vol. 5, 443-449
- *Methods in Enzymology*, vol. 73
- Davis et al. *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier Sciences Publishing, 1986
- Hames et al. *Nucleic Acid Hybridization*, IL Press, 1985
- *Molecular Cloning*, Sambrook et al. *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc
- *Current Protocols in Human Genetics*, John Wiley & Sons, Inc.
- *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, Inc.
- *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc.
- Soumillion, P. ; Jespers, L. ; Bouchet, M. ; Marchand-Brynaert, J. ; Winter, G. ; Fastrez, J. Selection of β -lactamase on Filamentous Bacteriophage by Catalytic Activity. *J. Mol. Biol.*, 1994, vol. 237, 415-422
- J.G. Sutcliffe. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, vol. 75, 3737-3741
- Nakamaye, K.C. ; Eckstein, F. *Nucl. Acid Res.*, 1986, vol. 14, 9679-9688
- Sambrook et al. *Molecular cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- R.N. Jones et al. *Clin. Microbiol.*, 1982, vol. 15, 677-683
- R.N. Jones et al. *Clin. Microbiol.*, 1982, vol. 15, 954-958

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para a determinação da presença ou da quantidade de um analito numa amostra de ensaio, compreendendo:

(a) a preparação de ácidos nucleicos que codificam para um enzima quimérico, em que a actividade do enzima quimérico é modulada através da ligação de uma molécula de ligação, sendo os referidos ácidos nucleicos preparados por um processo que compreende:

- (i) o fornecimento de bibliotecas de oligonucleótidos sintéticos degenerados que codificam para mimótopos;
- (ii) a expressão de uma biblioteca de enzimas quiméricos candidatos preparados pela inserção dos referidos oligonucleótidos em sequências de ácidos nucleicos que codificam para um enzima de partida, para produzir enzimas quiméricos candidatos;
- (iii) o fornecimento de uma molécula de ligação;
- (iv) a triagem dos enzimas quiméricos candidatos expressos para determinar se a actividade do enzima quimérico candidato é modulada pela ligação da referida molécula de ligação ao referido enzima quimérico candidato e a

- identificação de pelo menos um enzima quimérico com actividade modulada; e
- (v) o isolamento de ácidos nucleicos que codificam para o referido enzima quimérico a partir da referida biblioteca;
- (b) a expressão de um ácido nucleico preparado de acordo com a parte (a), para produzir um enzima quimérico;
- (c) a entrada em contacto do enzima quimérico com (1) a amostra de ensaio, (2) uma molécula de ligação que se liga a um mimótopo do enzima quimérico, e (3) um substrato sobre o qual o enzima quimérico actua cataliticamente, para formar uma mistura reactiva; e
- (d) a detecção da extensão da catálise do substrato alcançada pelo enzima quimérico, em que a molécula de ligação modula a catálise pelo enzima quimérico, em que o referido analito actua como um competidor directo da interacção do enzima quimérico com a molécula de ligação.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual a molécula de ligação é um anticorpo.

3. Processo para a determinação da presença ou da quantidade de um analito numa amostra de ensaio, compreendendo:

- (a) a preparação de um enzima quimérico por um processo como foi definido nas partes (a) e (b) da reivindicação 1;
- (b) a entrada em contacto do enzima quimérico com (1) a amostra de ensaio e (2) com um substrato sobre o qual o enzima quimérico actua cataliticamente, para formar uma mistura reactiva; e
- (c) a detecção da extensão da catálise do substrato alcançada pelo enzima quimérico, em que o analito modula a catálise pelo enzima quimérico.

4. Processo de acordo com a reivindicação 3, no qual o analito e o substrato entram em contacto com o enzima quimérico simultaneamente.

5. Processo de acordo com a reivindicação 3, no qual o analito é posto em contacto com o enzima quimérico antes de se pôr o substrato em contacto com o enzima quimérico.

6. Processo de acordo com a reivindicação 3, no qual o analito é um anticorpo.

7. Processo de acordo com a reivindicação 3, no qual o enzima de partida é a β -lactamase.

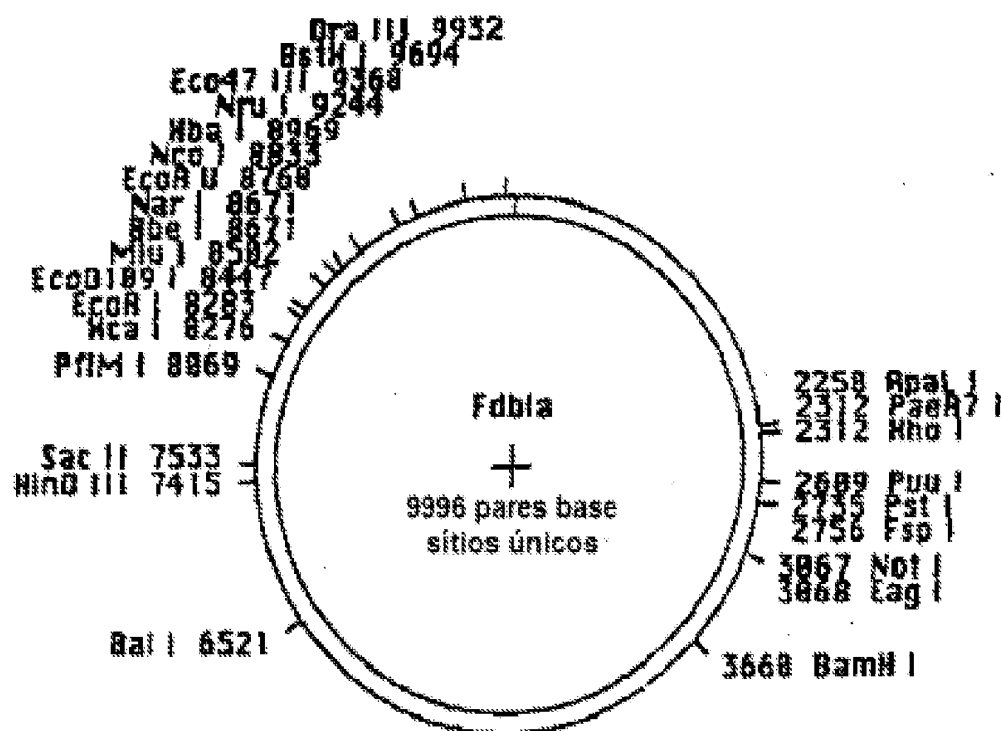
8. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 3, no qual a amostra de ensaio contém o analito.

9. Processo de acordo com a reivindicação 1, no qual o analito é o antigene específico da próstata.

10. Processo de acordo com as reivindicações 1 ou 3, no qual a amostra de ensaio é soro.

11. Processo de acordo com a reivindicação 3, no qual o analito é um anticorpo específico para o antigene específico da próstata.

Lisboa, 10 de Fevereiro de 2010



sequência de ADN
circular de 9996 p. b.
de AATAGTGGACTC...TCCACGTTCTT

FIG.1A

ApalI
 GTGCA CAG CCA GAA ACG CTG GTG AAA GTA AAA GAT GCT GAA GAT CAG TTG GGT
 Gln Pro Glu Thr Leu Val Lys Val Lys Asp Ala Glu Asp Gln Leu Gly
 26 31 41

XhoI
 GCT CGA GTG GGT TAC ATC GAA CTG GAT CTC AAC AGC GGT AAG ATC CTT GAG AGT
 Ala Arg Val Gly Tyr Ile Glu Leu Asp Leu Asn Ser Gly Lys Ile Leu Glu Ser
 51

TTT CGC CCC GAA GAA CGT TTT CCA ATG ATG AGC ACT TTT AAA GTT CTG CTA TGT
 Phe Arg Pro Glu Glu Arg Phe Pro Met Met Ser Thr Phe Lys Val Leu Leu Cys
 61 71

GGC GCG GTA TTA TCC CGT GTT GAC GCC GGG CAA GAG CAA CTC GGT CCC CGC ATA
 Gly Ala Val Leu Ser Arg Val Asp Ala Gly Gln Glu Gln Leu Gly Arg Arg Ile
 81 91

CAC TAT TCT CAG AAT GAC TTG GTT GAG TAC TCA CCA GTC ACA GAA AAG CAT CTT
 His Tyr Ser Gln Asn Asp Leu Val Glu Tyr Ser Pro Val Thr Glu Lys His Leu
 101 111

ACG GAT GGC ATG ACA GTA AGA GAA TTA TGC AGT GCT GCC ATA ACC ATG AGT GAT
 Thr Asp Gly Met Thr Val Arg Glu Leu Cys Ser Ala Ala Ile Thr Met Ser Asp
 121 131

AAC ACT GCG GCC AAC TTA CTT CTG ACA ACG ATC GGA GGA CCG AAG GAG CTA ACC
 Asn Thr Ala Ala Asn Leu Leu Leu Thr Thr Ile Gly Gly Pro Lys Glu Leu Thr
 141

GCT TTT TTG CAC AAC ATG GGG GAT CAT GTA ACT CGC CTT GAT GGT TGG GAA CCG
 Ala Phe Leu His Asn Met Gly Asp His Val Thr Arg Leu Asp Arg Trp Glu Pro
 151 161

GAG CTG AAT GAA GCC ATA CCA AAC GAC GAG CGT GAC ACC ACG ATG CCT GCA GCA
 Glu Leu Asn Glu Ala Ile Pro Asn Asp Glu Arg Asp Thr Thr Met Pro Ala Ala
 171 181

ATG GCA ACA ACG TTG CGC AAA CTA TTA ACT GGC GAA CTA CTT ACT CTA GCT TCC
 Met Ala Thr Thr Leu Arg Lys Leu Leu Thr Gly Glu Leu Leu Thr Leu Ala Ser
 191 201

GCG CAA CAA TTA ATA GAC TGG ATG GAG GCG GAT AAA GTT GCA GGA CCA CTT CTG
 Arg Gln Gln Leu Ile Asp Trp Met Glu Ala Asp Lys Val Ala Gly Pro Leu Leu
 211 221

CGC TCG GCC CTT CCG GCT GGC TGG TTT ATT GCT GAT AAA TCT GGA GCC GGT GAG
 Arg Ser Ala Leu Pro Ala Gly Trp Phe Ile Ala Asp Lys Ser Gly Ala Gly Glu
 231

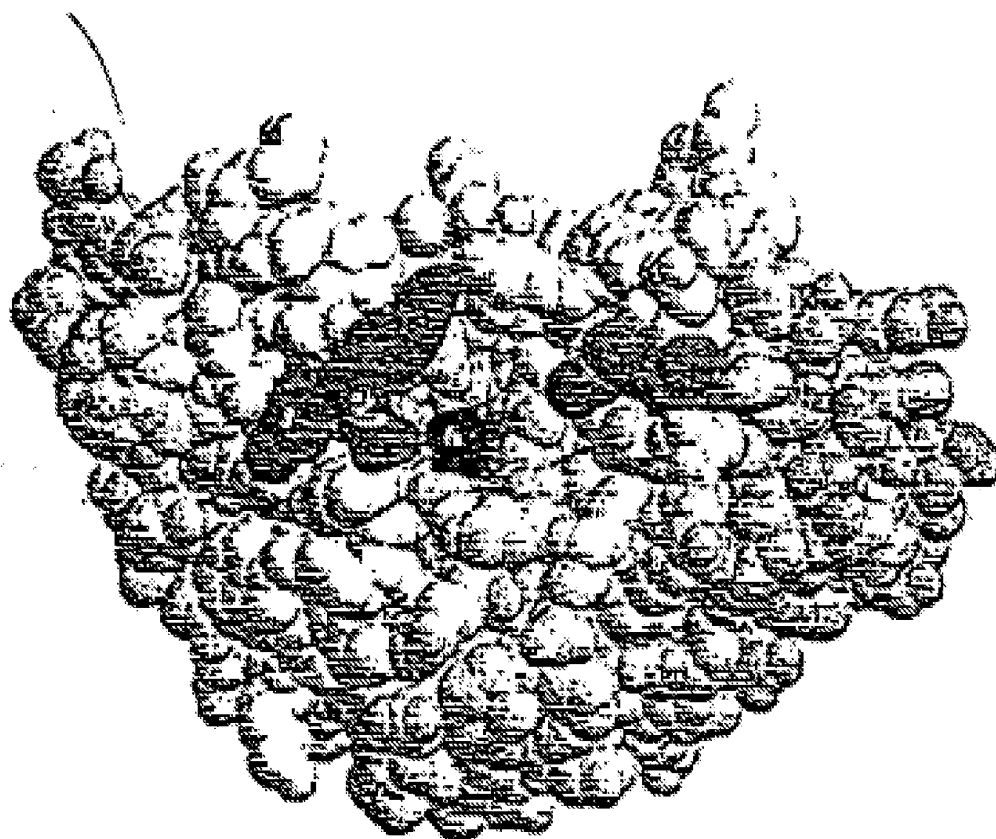
GGT GGG TCT CGC GGT ATC ATT GCA GCA CTG GGG CCA GAT GGT AAG CCC TCC CGT
 Arg Gly Ser Arg Gly Ile Ile Ala Ala Leu Gly Pro Asp Gly Lys Pro Ser Arg
 241 251

ATC GTA GTT ATC TAC ACG ACG GCG AGT CAG GCA ACT ATG GAT GAA CGA AAT AGA
 Ile Val Val Ile Tyr Thr Thr Gly Ser Gln Ala Thr Met Asp Glu Arg Asn Arg
 261 271

CAG ATC GCT GAG ATA GGT GCC TCA CTG ATT AAG CAT TGG GGG ATT GAG GGG CGT
 Gln Ile Ala Glu Ile Gly Ala Ser Leu Ile Lys His Trp Gly Ile Glu Gly Arg
 281 291

NotI
 GCG GCC GC
 Ala Ala
 295

FIG 1B

Ilb1Ilb3Sitio catalítico

1. V103

4. T271

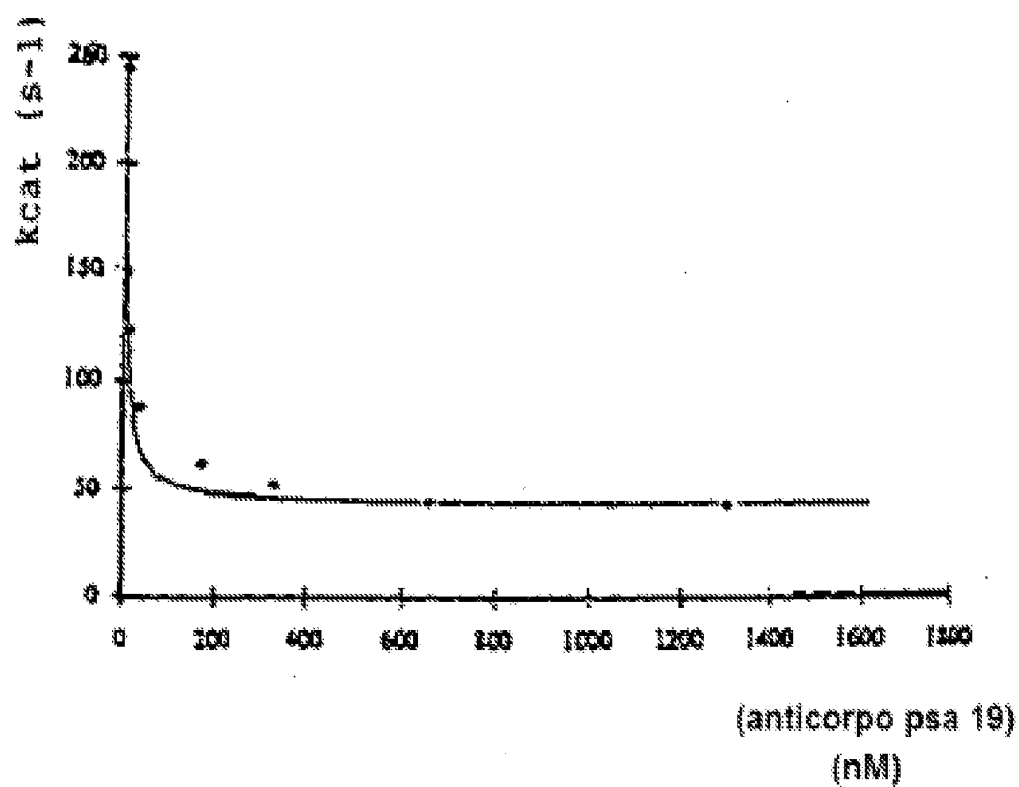
6. S70

2. E104

5. M272

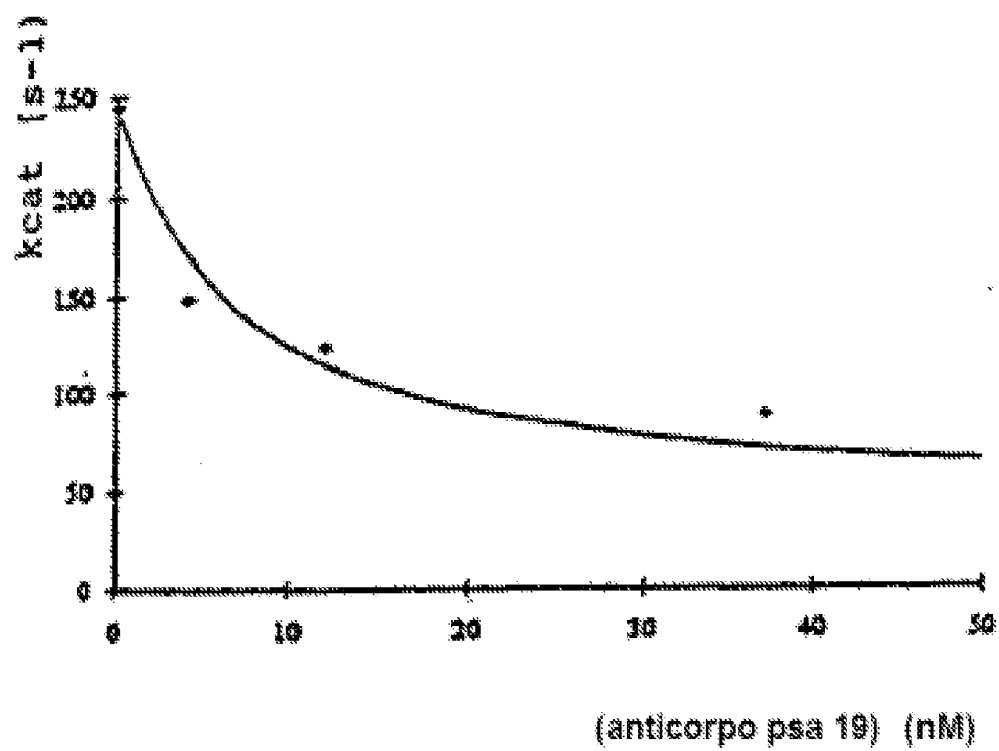
3. Y105

FIG. 1C

FIG. 2

$$[psa19A]_{30Z} = 2,4 \cdot 10^{-9} M$$

$$K_d = 5,7 \cdot 10^{-9} M$$

Clone psa19Aj302.FIG. 3

Clone p19Rb404.

substrato = PenG

Kcat-E (s-l)	Kcat-Eab (s-l)	[Et] (nM)	kd (nM)
134,3	11	2,4	50

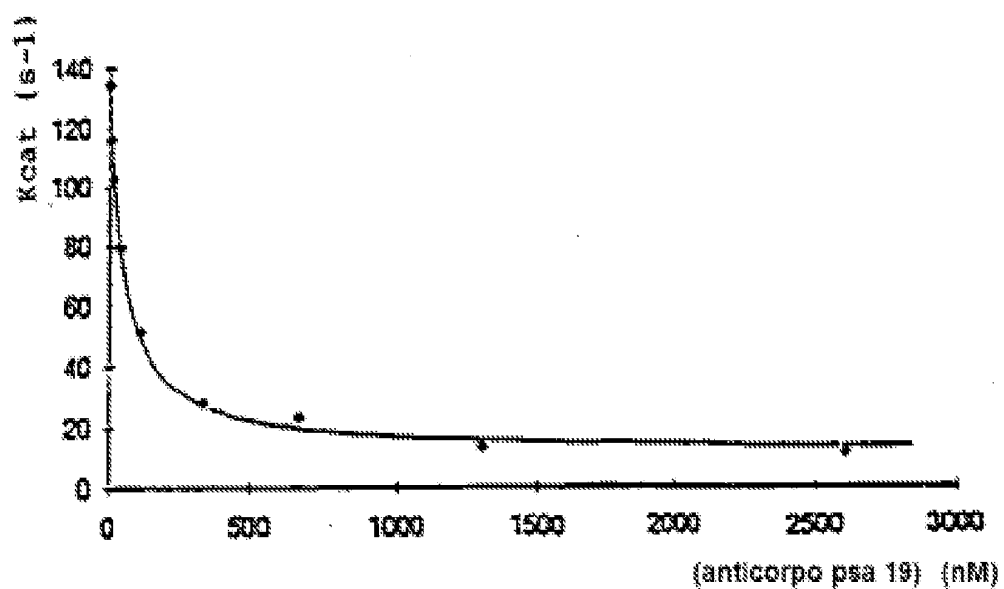
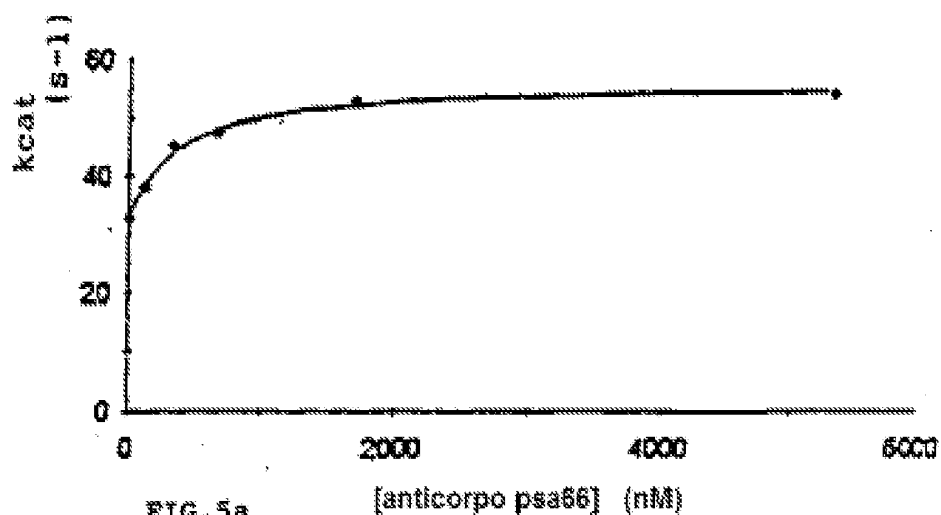


FIG. 4

CLONE p66Rb330

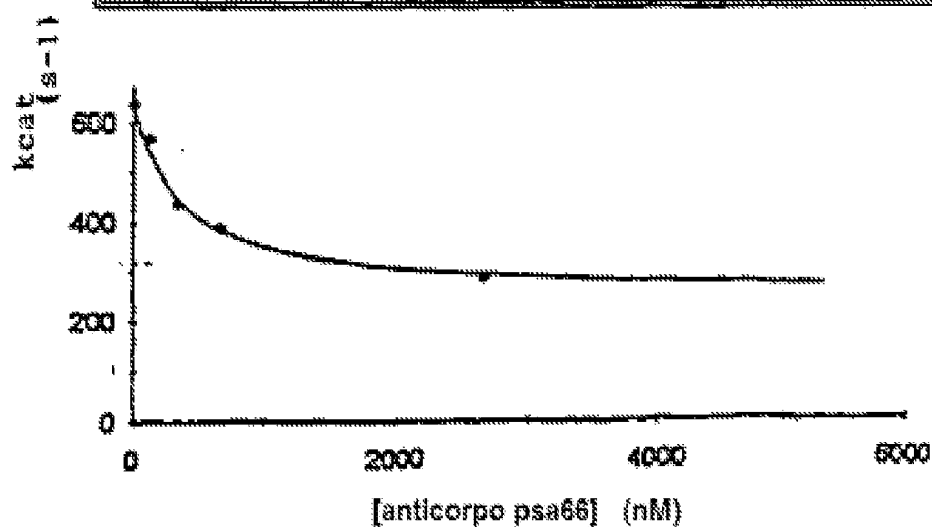
substrato = Centa

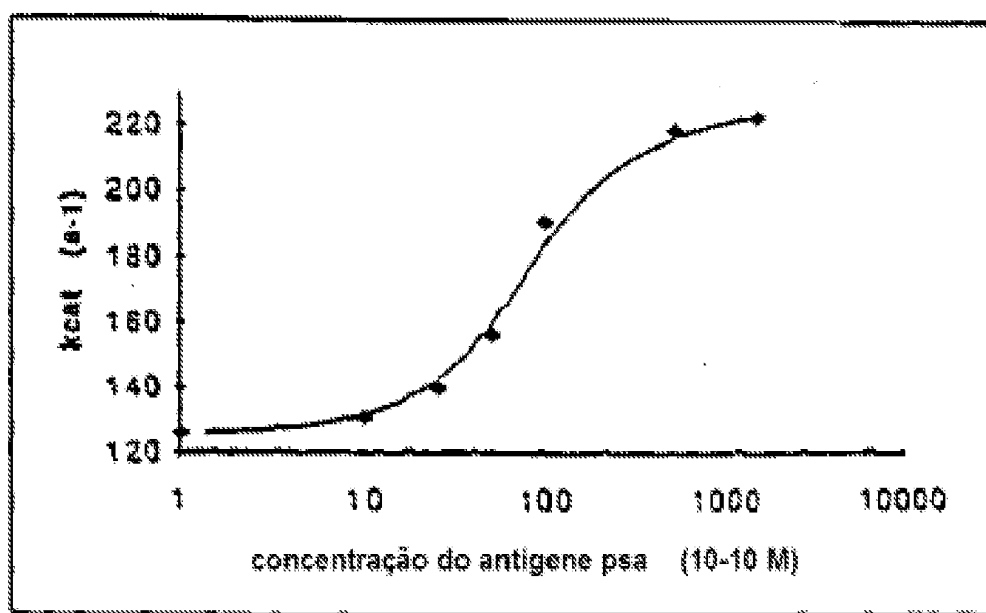
$K_{cat}\text{-E}$ (s ⁻¹)	$K_{cat}\text{-Eab}$ (s ⁻¹)	$[E]$ (nM)	k_d (nM)
72.8	56.5	6.4	360



substrato = PADAC

$K_{cat}\text{-E}$ (s ⁻¹)	$K_{cat}\text{-Eab}$ (s ⁻¹)	$[E]$ (nM)	k_d (nM)
536.8	243	0.64	360



FIG. 6