

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 99 677

REQUERENTE: THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE, norte-americana, com sede em 10666 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, Estados Unidos da América

EPÍGRAFE: "Processo de preparação de um polipéptido que se liga a GPIIa-IIIb, de vectores, de composições de anticorpos e processo de ligação de células a um substrato"

INVENTORES: Mark H. Ginsberg, Ronald Bowditch e Edward F. Plow

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4.º da Convenção de Paris de 20 de Março de 1883.

Estados Unidos da América em 3 de Dezembro de 1990 sob o nº 07/620 668.



PATENTE N° 99 677

"Processo de preparação de um polipéptido que se liga a GPIIa-IIIb, de vectores, de composições de anticorpos e processo de ligação de células a um substrato"

R E S U M O

O presente invento refere-se a um processo de preparação de um polipéptido possuindo um comprimento de não mais de cerca de 100 resíduos de aminoácido, que se liga a GPIIb-IIIa e que inclui uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula: -Asp-Arg-X₁Pro-His-X₂R-, onde X₁ e X₂ são qualquer resíduo de aminoácido que compreende proceder a uma síntese por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes ou a uma síntese química em fase sólida por adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia polipeptídica em crescimento, sobre uma matriz.

O invento refere-se ainda a um processo de preparação de composições de anticorpo e de inibição da ligação da fibronectina ou do fibrinogénio a células que compreende sujeitar as células a uma quantidade suficiente de uma composição de anticorpo, de modo que a ligação às células seja inibida.

MEMÓRIA DESCRITIVACampo Técnico

O presente invento refere-se a processos e composições para a promoção da ligação de células a substratos. O invento refere-se particularmente à utilização de sítios de ligação da fibronectina recentemente identificados para ligação a receptores da integrina nas células.

Antecedentes

A regulação dos acontecimentos de adesão celular tem vastas implicações biomédicas. Por exemplo, a inibição da adesão celular pode ser benéfica no tratamento de desordens trombóticas através da inibição da agregação das plaquetas, de desordens inflamatórias através da inibição da adesão e da transmigração dos leucócitos e na doença maligna através da inibição do alojamento de células de tumor e metastases. Por outro lado, a promoção da adesão celular é, nalguns casos, desejável. Por exemplo, na sementeira de células endoteliais em enxertos vasculares, na estabilidade de próteses médicas e na promoção da cicatrização de feridas. Os acontecimentos de adesão são amplamente reconhecidos por envolverem interações de receptores extracelulares, i.e., receptores da integrina, com substâncias que rodeiam a célula, por exemplo, fibronectina. As integrinas são um grupo funcional e estruturalmente relacionado de receptores que interagem com uma grande variedade de ligandos incluindo as glicoproteínas da matriz extracelular, o complemento e outras células. As integrinas participam na adesão célula-matriz e célula-célula em muitos processos fisiologicamente importantes incluindo o desenvolvimento embrionário, hemostase, trombose, cicatrização de feridas, mecanismos de defesa imunitária e não imunitária e transformação oncogénica. Ver Hynes, Cell, 48:549-554 (1987). As várias integrinas que participam na adesão celular dinâmica ligam um tripéptido, arginina-glicina-ácido aspártico (RGD), presente no seu ligando. Ver Ruoslahti et al., Science, 238:491-497 (1987).

A fibronectina é uma glicoproteína adesiva que se encontra no plasma e nas superfícies celulares e nas matrizes extracelulares. A fibronectina promove a fixação das células a substratos porque liga outras macromoléculas assim como células. Hynes, em Cell Biology of the Extracellular Matrix, Hay ed., Plenum Press, páginas 295-334 (1982); Hynes et al., J. Cell Biol., 95:369-77 (1982). Sabe-se também que a fibronectina se acumula in vivo em sítios de lesão e inflamação [Pettersson et al., Clin. Immunol. Immunopath., 11:425-436 (1978); Grinnel et al., J. Invest. Derm., 76:181-189 (1981); Repesh et al., J. Histochem. Cytochem., 30(4):399-408 (1985); Carsons et al., Arth. Rheum., 24(10):1261-67 (1981)] e é produzida pelas células das paredes dos vasos sanguíneos nestes sítios. Clark et al., J. Exp. Med., 156:646-51 (1982); Clark et al., J. Immunol., 126(2):787-93 (1981); Clark et al., J. Invest. Derm., 79:269-76 (1982); Clark et al., J. Clin. Invest., 74:1011:16 (1984).

A fibronectina é composta por subunidades de estrutura principal variável [massa molecular relativa média de 250 quilodaltons (kDa)]. As subunidades são ligadas por dissulfureto para formar dímeros ou multímeros derivados de um grupo de polipéptidos similares mas não idênticos. Hynes, em Cell Biology of the Extracellular Matrix, Hay ed., Plenum Press, páginas 295-334 (1982); Hynes et al., Cell Biol., 95:369-77 (1982); Schwarzbauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1424-28; Kornblihtt et al., EMBO J., 4(7):1755-59 (1985). Assim, o termo "fibronectina" refere-se a várias espécies de glicoproteínas, algumas das quais estão mais completamente caracterizadas do que outras.

As duas principais classes de fibronectinas (Fn) são a fibronectina plasmática e a fibronectina celular. A fibronectina plasmática (pFn) é segregada pelos hepatócitos, enquanto que a fibronectina celular (cFn) é segregada por uma variedade de células cultivadas incluindo células endoteliais e fibroblastos. Jaffe et al., J. Exp Med., 147:1779-91 (1978); Birdwell et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 97(2):574-8 (1980). Apesar das extensas semelhanças físicas e imunológicas, as duas classes de

fibronectinas diferem no comportamento electroforético, solubilidade e actividades biológicas. Tamkun et al., J. Biol. Chem., 258(7):4641-47 (1983); Yamada et al., J. Cell Biol., 80:492-98 (1979); Yamada et al., Biochemistry, 16(25):2552-59 (1977).

As principais diferenças estruturais entre as fibronectinas plasmáticas e as celulares têm sido encontradas por mapeamento de péptidos [Hayashi et al., J. Biol. Chem., 256(21):11292-11300 (1981)], clonagem do ADNc [Kornblihtt et al., EMBO J., 4:1755-1759 (1985)] e técnicas imunológicas [Atherton et al., Cell, 25:133-41 (1981)]. A partir destes dados, determinou-se que a estrutura principal do monómero de fibronectina contém três tipos diferentes de repetições internas conhecidas como Tipos de homologia I, II e III, tendo comprimentos de cerca de 40, 60 e 90 resíduos de aminoácido, respectivamente [Kornblihtt et al., EMBO J., 4:1755-1759 (1985)]. Todas as porções Fn, diferentes, são produzidas por um único gene, com diferenças na estrutura principal que resultam da união ("splicing") alternativa do transcrito principal ARNm em, pelo menos, três regiões. Kornblihtt et al., EMBO J., 4(7):1755-59 (1985); Schwarzbauer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:1424-28 (1985); Gutman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:7179-82 (1987); Schwarzbauer et al., EMBO J., 6(9):2573-80 (1987).

Sabe-se que está envolvido nos acontecimentos de adesão celular um sítio que contém a sequência Arg-Gly-Asp (RGD) na 10ª repetição de Tipo III da Fn. Os péptidos que contêm esta sequência inibem certos acontecimentos de adesão celular, ou alternativamente, podem ser utilizados para promover a adesão celular. Ver, por exemplo, as Patentes U.S. Nos. 4 589 881; 4 661 111; 4 517 686; 4 683 291; 4 578 079; 4 614 517; e 4 792 525.

Recentemente, os estudos de mutagénese dirigida ao sítio, da fibronectina, concluíram que as sequências não-RGD eram participantes nos fenómenos de adesão celular. [Obara, M. et al., Cell, 53:649-57 (1988)]. O segundo sítio de ligação proposto não

foi definido por este estudo; contudo, os dados de perda de actividade indicaram que estava envolvido na adesão um segundo sítio, provavelmente de uma forma sinérgica com a sequência RGD. Este resultado ajuda a explicar porque é que outras proteínas contendo RGD não ligam integrinas assim como a fibronectina.

Tendo em vista a importância da promoção da adesão celular ou, inversamente, a inibição da adesão, são desejáveis polipéptidos não contendo RGD adequados para estes fins. No caso de tais polipéptidos mostrarem complementar as sequências de resíduos de aminoácido RGD nos processos de ligação celular, são também desejáveis composições incluindo sequências RGD e compostos não-RGD adesivos.

Breve Sumário do Invento

O presente invento refere-se a polipéptidos que se ligam a receptores da integrina, particularmente GPIIb-IIIa, polipéptidos que compreendem uma região de ligação para a integrina que é independente da sequência RGD bem conhecida da fibronectina (Fn). O novo sítio de ligação está localizado, pelo menos, cinquenta resíduos de aminoácido a montante (em direcção ao terminal N) da sequência de RGD da Fn humana. A sequência de resíduos de aminoácido da Fn humana é descrita em Kornblihtt et al., EMBO J., 4:1755 (1985) cuja descrição é aqui incorporada para referência. As regiões seleccionadas da Fn humana são descritas nas Figuras 1-3 e incluem a sequência da fibronectina descrita por Kornblihtt et al.

Numa concretização, o presente invento contempla um polipéptido tendo um comprimento de não mais do que cerca de 100 resíduos de aminoácido. O péptido liga-se a GPIIb-IIIa e inclui uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula: $-DRX_1PHX_2R-$, onde X_1 e X_2 são um qualquer resíduo de aminoácido (SEQ ID N° 1).

O polipéptido inclui, preferivelmente, uma sequência de

resíduos de aminoácido representada pela fórmula: $-DRX_1PHX_2RU-$, na qual X_1 é V ou A, X_2 é S ou A, e U é uma sequência de aminoácidos representada pela fórmula seleccionada a partir do grupo constituido por: $-X_3X_4X_5X_6-$, $-X_3SIT-$, $-NX_4IT-$, $-NSX_5T-$, e $-NSIX_6-$, respectivamente, SEQ ID N° 2 a 6, na qual X_3 é N ou A, X_4 é S ou A, X_5 é I ou A e X_6 é T ou A.

Uma concretização preferida contempla um polipéptido mostrado nas SEQ ID N°s 2-6 que tem as respectivas sequências de resíduos de aminoácido $DRX_1PHX_2RX_3X_4X_5X_6$, $DRX_1PHX_2RX_3SIT$, $DRX_1PHX_2RNX_4IT$, $DRX_1PHX_2RNSX_5T$ e $DRX_1PHI_2RNSIX_6$.

Numa concretização preferida do invento os presentes polipéptidos terão uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula B-X-Z, onde X é a sequência de resíduos de aminoácido mostrada na Figura 1 (resíduos 1351-1456 da Fn humana) (SEQ ID N° 7), B é um grupo NH_2 ou uma sequência dos aminoácidos do terminal N e Z é um grupo $COOH$ ou uma sequência de aminoácidos do terminal C com um comprimento não superior a 150 resíduos.

Numa outra concretização do invento, os presentes polipéptidos terão uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula J-U-X-Z onde X e Z são como acima descrito, J é um grupo NH_2 ou a sequência de resíduos de aminoácido do terminal N e U é a sequência de resíduos de aminoácido da Fn humana dos resíduos 1255-1350 mostrada na Figura 2 que corresponde aos resíduos de aminoácido das posições 1-96 na SEQ ID N° 8.

Os presentes polipéptidos podem-se ligar a GPIIb-IIIa, independentemente ou em conjunto com um péptido contendo RGD. Quando a ligação é complementar de uma sequência RGD a sequência RGD pode ser incorporada na mesma proteína que os presentes polipéptidos ou pode ser fornecida como um péptido distinto.

São também contemplados no invento processos de ligação de células, por exemplo, células endoteliais, a um substrato,

processo que compreende o contacto de células que expressam GPIIb-IIIa com o substrato compreendendo os presentes polipéptidos fixados a uma matriz sólida e a manutenção do contacto durante um período de tempo pré-determinado suficiente para a GPIIb-IIIa ligar os polipéptidos. A utilização do polipéptido-substrato é contemplada em enxertos de pele e próteses.

São também contemplados os vectores para a expressão dos presentes polipéptidos e proteínas de fusão dos polipéptidos. Uma concretização do invento permite a pronta purificação dos polipéptidos por produção de produtos de fusão de proteína de ligação de maltose (MBP) dos polipéptidos.

Uma outra concretização contempla as composições de anticorpo que imunorreagem com os presentes polipéptidos que podem inibir competitivamente a ligação da Fn ou do fibrinogénio (Fg) a GPIIb-IIIa. Os presentes polipéptidos podem também ser utilizados para inibir a ligação da Fn ou Fg a GPIIb-IIIa.

Assim, o presente invento proporciona polipéptidos novos e composições e processos relacionados que promovem a ligação de células e/ou inibem a adesão celular.

Breve Descrição dos Desenhos

A Figura 1 representa a sequência de resíduos de aminoácido 1351-1456 da Fn humana (resíduos 1-106 da SEQ ID N° 7).

A Figura 2 representa a sequência de resíduos de aminoácido 1255-1456 da Fn humana (resíduos 1-202 da SEQ ID N° 8).

A Figura 3 representa a sequência de resíduos de aminoácido 1255-1456 da Fn humana e uma sequência de ADN de cadeia dupla correspondente que codifica a sequência de resíduos de aminoácido de acordo com os princípios do presente invento.

A cadeia de ácido nucleico que codifica a sequência da Fn



humana e a sequência de resíduos de aminoácido codificada estão registadas na Listagem da Sequência como SEQ ID N° 9, com os resíduos Fn 1255-1456 assinalados como resíduos 1-202 da SEQ ID N° 9. A cadeia de ácido nucleico não codificadora está registada na direcção 5' para 3' como SEQ ID N° 10.

A Figura 4A é um gráfico que mostra o efeito na ligação da Fn à GPIIb-IIIa imobilizada por concentrações crescentes ($\mu\text{g/ml}$) de anticorpos monoclonais (Mab) para a Fn de acordo com os princípios do presente invento. Os dados são expressos como uma percentagem da ligação, como descrito nos Exemplos.

A Figura 4B é um gráfico que mostra os estudos de competição cruzada dos Mab marcados para os sítios da Fn na presença dos Mab não marcados. A competição é medida como uma quantidade de ligação lab ($\text{cpm} \times 10^3$) à Fn imobilizada na presença dos Mab indicados: Mab 8 (3), Mab 16 (16), Mab 11,10 (11), Mab 15 (15) ou sem Mab (Sem).

A Figura 5 mostra os vectores MBP pIH821 e pPR734 para a síntese das proteínas de fusão GPIIIa-MBP e os sítios de clonagem relevantes.

A Figura 6 mostra o efeito da ligação da Fn ao GPIIb-IIIa imobilizado na presença de fibronectina adicionada (Fn; quadrados a branco), proteína de ligação de maltose (MBP; círculos a cheio) sózinha, proteína de fusão MBP-(sequência de resíduos da Fn 1255-1456) (MBP/III 8 + 9; círculos a branco) e BSA de controlo sózinha (quadrados a cheio).

A Figura 7 mostra o efeito das várias concentrações ($\mu\text{g/ml}$) da proteína de fusão MBP (MBP/III 8 + 9) versos MBP na ligação do Fn e na ligação do fibrinogénio (Fg) à GPIIb-IIIa imobilizada. Os círculos a cheio indicam a inibição da ligação do Fg na presença da proteína de fusão e os círculos a branco indicam a inibição de controlo na presença de MBP. Os quadrados a branco indicam a inibição da ligação da Fn na presença da proteína de fusão e os quadrados a cheio indicam a inibição de controlo na presença de

MBP.

A Figura 8 ilustra a inibição competitiva da ligação do Fn à GPIIb-IIIa purificada pelo polipéptido derivado de Fn D-11-T tendo a sequência de resíduos de aminoácido DRVPHSRNSIT (SEQ ID N° 11) como mostrado pela linha com os quadrados a cheio. É também mostrada a inibição da ligação da Fn à GPIIb-IIIa pelo polipéptido derivado de Fn RGDS (SEQ ID N° 12) indicada pela linha com quadrados a branco. Os ensaios de competição foram realizados em cavidades de microtitulação de uma placa de 96 cavidades como descrito no Exemplo 9b(1). Em resumo, as cavidades de microtitulação revestidas com o receptor GPIIb-IIIa purificado foram mantidas com Fn biotinilada 10 nM durante 2 horas à temperatura ambiente na presença de concentrações variáveis de D-11-T e RGDS. A quantidade de fibronectina biotinilada ligada foi determinada utilizando avidina ligada à peroxidase de rábano silvestre biotinilada H como um reagente de revelação. A quantidade de fibronectina ligada é descrita como absorvância a 490 nm. A fibronectina na ausência de polipéptidos inibidores competitivos deu uma absorvância de 490 ou 2,70. O RGDS e D-11-T inibiram ao máximo a ligação da Fn ao GPIIb-IIIa a uma concentração de 20 μ M e 200 μ M, respectivamente.

A Figura 9 ilustra os efeitos das substituições de alanina no polipéptido D-11-T na actividade inibidora do impedimento da ligação da Fn à GPIIb-IIIa. A quantidade de Fn biotinilada 10 nM ligada às cavidades de microtitulação revestidas com GPIIb-IIIa purificado na presença de 250 μ M de polipéptido foi determinada como descrito na Figura 8 e no Exemplo 9b(2). Descreve-se a percentagem de efeito inibidor do polipéptido D-11-T, o péptido de controlo combinado VHPDRNTISRS (SEQ ID N° 13) e os polipéptidos com uma alanina substituída no resíduo de aminoácido abaixo de cada barra no gráfico de barras. Os resultados apresentados representam a média mais/menos o desvio padrão das três determinações. Os resultados são discutidos no Exemplo 9b(2).

A Figura 10 ilustra nos dois quadros, 10A e 10B, a

actividade inibidora do polipéptido D-11-T na ligação quer da Fn quer do fibrinogénio (Fg) à GPIIb-IIIa mas não ao receptor da vitronectina, $\alpha v\beta 3$. A ligação do Fg biotinilado 5 nM é mostrada no quadro 10A e a ligação da Fn biotinilada 10 nM é mostrada no quadro 10B. Os ensaios de competição são realizados como descrito na Figura 8 e no Exemplo 9b(3). As curvas de inibição para os ensaios realizados nas cavidades de microtitulação revestidas com GPIIb-IIIa são mostradas nos dois quadros com linhas indicadas por quadrados a branco e a cheio. As curvas de inibição para os ensaios realizados nas cavidades de microtitulação revestidas com $\alpha v\beta 3$ são mostradas nos dois quadros com linhas indicadas por círculos a branco e a cheio. Os quadrados e círculos a branco mostram a actividade inibidora do polipéptido D-11-T no GPIIb-IIIa e $\alpha v\beta 3$, respectivamente. Os quadrados e círculos a cheio mostram a actividade inibidora do polipéptido de controlo combinado VHPDRNTISRS (SEQ ID N° 13) no GPIIb-IIIa e $\alpha v\beta 3$, respectivamente. Os resultados apresentados representam as determinações em triplicado mais/menos o desvio padrão como percentagem da ligação de Fg ou Fn relativamente à quantidade ligada na ausência de inibidor. Os resultados são discutidos no Exemplo 9b(3).

Descrição Detalhada do Invento

A. Definições

Resíduo de Aminoácido: Um aminoácido formado após digestão química (hidrólise) de um polipéptido nas suas ligações péptidicas. Os resíduos de aminoácido aqui descritos estão preferivelmente na forma isomérica "L". Contudo, os resíduos na forma isomérica "D" podem substituir qualquer resíduo de L-aminoácido, desde que seja mantida pelo polipéptido a propriedade funcional desejada. NH_2 refere-se ao grupo amino livre presente no terminal amino de um polipéptido. COOH refere-se ao grupo carboxilo livre presente no terminal carboxilo de um polipéptido. De acordo com a nomenclatura comum de polipéptidos (descrita em J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) e adoptada na 37 C.F.R. §1.822(b)(2)), as abreviaturas para os

resíduos de aminoácido são mostradas na Tabela de Correspondência seguinte:

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

<u>SIMBOLO</u>		<u>AMINº ÁCIDO</u>
<u>1 Letra</u>	<u>3 Letras</u>	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutâmico
Z	Glx	Glu e/ou Gln
W	Trp	triptofano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
B	Asx	Asn e/ou Asp
C	Cys	cisteína
X	Xaa	Não conhecido ou outro

Deve-se observar que todas as sequências de resíduos de aminoácido aqui representadas pelas formulas têm uma orientação da esquerda para a direita na direcção convencional do terminal amino para o terminal carboxilo. Adicionalmente, a frase "resíduo de aminoácido" é amplamente definida para incluir os aminoácidos registados na Tabela de Correspondência e os aminoácidos

modificados e não usuais, tais como aqueles registados em 37 C.F.R. §1.822(b)(4) e aqui incorporada para referência. Além disso, deve-se observar que um traço no início ou fim de uma sequência de resíduos de aminoácido indica uma ligação peptídica a uma outra sequência de um ou mais resíduos de aminoácido ou a um grupo amino-terminal tal como NH_2 ou a um grupo carboxi-terminal tal como COOH .

Anticorpo: um polipéptido que se liga quimicamente a um grupo hapténico, i.e., um ligando. Os anticorpos, como aqui utilizado, são moléculas de imunoglobulina e fragmentos imunologicamente activos de moléculas de imunoglobulina. Estão incluídas as porções conhecidas na arte como Fab, Fab'; F(ab')_2 e F_v . Tipicamente, os anticorpos ligam ligandos cujo tamanho varia entre cerca de 6 e cerca de 34 Å com constantes de associação na gama de cerca de 10^4 a 10^{10} M^{-1} e no máximo de 10^{12} M^{-1} . Os anticorpos podem ser policlonais ou monoclonais (MoAb). Os anticorpos podem-se ligar a uma vasta gama de ligandos, incluindo pequenas moléculas tais como esteróides e prostaglandinas, biopolímeros tais como ácidos nucleicos, proteínas e polissacáridos e polímeros sintéticos tais como polipropileno. Um "sítio de combinação de anticorpos" é aquela porção estrutural de uma molécula de anticorpo compreendida por regiões variáveis e hipervariáveis de cadeia pesada e leve que se ligam especificamente (imunorreagem com) ao antigénio. O termo "imunorreage" nas suas várias formas é aqui utilizado para referir a ligação entre uma molécula contendo uma determinante antigénica e uma molécula contendo um sítio de combinação de anticorpo tal como uma molécula de anticorpo completa ou uma sua porção. Uma "determinante antigénica" é a porção estrutural real do antigénio que é imunologicamente ligada por um sítio de combinação de anticorpo. O termo é também utilizado alternativamente com "epítopo".

Ligando: Uma molécula que contém uma porção estrutural que é ligada por interacção específica com uma molécula receptora particular.



Oligonucleótido ou Polinucleótido: um polímero de nucleótidos de cadeia simples ou dupla. Como aqui utilizado o "oligonucleótido" e os seus equivalentes gramaticais incluem a gama completa de ácidos nucleicos. Um oligonucleótido refere-se tipicamente a uma molécula de ácido nucleico compreendida por uma cadeia linear de dois ou mais desoxirribonucleótidos e/ou ribonucleótidos. O tamanho exacto vai depender de muitos factores, que por seu lado dependem das condições finais de utilização, como é bem conhecido na arte.

Polipéptido ou Péptido: uma série linear de, pelo menos, dois resíduos de aminoácido em que os resíduos adjacentes são ligados por ligações peptídicas entre o grupo alfa-amino de um resíduo e o grupo alfa-carboxilo de um resíduo adjacente.

Proteína: refere-se a uma série linear de mais do que 50 resíduos de aminoácido em que os resíduos adjacentes são ligados através de ligações peptídicas.

Receptor: uma molécula proteica biologicamente activa que se liga especificamente a (ou com) outras moléculas (ligandos). Os receptores podem ser glicosados.

Vector: uma molécula de ADN capaz de replicação autónoma numa célula e à qual um segmento de ADN, por exemplo, um gene ou polinucleótido, pode ser operativamente ligado de forma a provocar a replicação do segmento ligado. Os vectores capazes de dirigir a expressão de segmentos de ADN (genes) que codificam uma ou mais proteínas são aqui referidos como "vectores de expressão". Os vectores permitem também a clonagem de ADNc (ADN complementar) a partir de (ARNm) produzidos utilizando a transcriptase inversa.

B. Polipéptidos

Os polipéptidos do presente invento incluem uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente a uma região da



fibronectina (Fn) e são referidos como polipéptidos derivados da fibronectina ou polipéptidos de Fn.

A Fn como utilizada neste invento foi isolada a partir do plasma citrado humano, fresco por cromatografia de afinidade em gelatina-sepharose de acordo com os processo descritos por Plow et al., J. Biol. Chem., 256:9477-9482 (1981) e na Patente U.S. No. 4 589 981. A Fn isolada deu uma única banda em SDS-PAGE sob condições não redutoras e um duplete pouco espaçado de massa molecular 215 000 a 230 000 sob condições redutoras. Em seguida, a Fn refere-se à Fn isolada, intacta, como descrito acima e no Exemplo 9b(1).

Tipicamente, os polipéptidos objecto correspondentes a uma região da Fn não vão conter uma sequência RGD, apresentando assim sítios de ligação potenciais para os ligandos que têm uma estrutura tridimensional diferente da sequência RGD da Fn. É preferível que a sequência completa do polipéptido represente uma porção da Fn.

Numa concretização, um polipéptido deste invento tem um comprimento de não mais do que 100 resíduos de aminoácido e é caracterizado pela presença de uma sequência representada pela fórmula:



(SEQ ID N° 1) onde X_1 e X_2 são um qualquer resíduo de aminoácido, preferivelmente um resíduo de aminoácido seleccionado a partir da Tabela de Correspondências. Preferivelmente, X_1 e X_2 são seleccionados independentemente um do outro de entre os resíduos de Gly, Ala, Val, Ser e Thr. Preferivelmente, X_1 e X_2 são seleccionados independentemente um do outro de entre os resíduos de Lys, Arg e His. Preferivelmente, X_1 e X_2 são seleccionados independentemente um do outro de entre os resíduos de Asp, Gln, Glu, Asn, Cys e Met. Preferivelmente, X_1 e X_2 são seleccionados independentemente um do outro de entre os resíduos de Pro, Tyr e Trp.

Um polipéptido preferido nesta concretização tem uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula DRVPHSR (SEQ ID N° 16).

Um polipéptido preferido inclui adicionalmente uma sequência de aminoácidos U, carboxi-terminal, i.e., tem a fórmula $-DRX_1PHX_2RU-$, onde X_1 é Val ou Ala e X_2 é Ser ou Ala. U é uma das sequências de resíduos de aminoácido $-X_3X_4X_5X_6-$, $-X_3SIT-$, $-NX_4IT-$, $-NSX_5T-$ e $-NSIX_6-$, respectivamente, SEQ ID N°s 2 a 6, em que X_3 é Asn ou Ala, X_4 é Ser ou Ala, X_5 é Ile ou Ala e X_6 é Thr ou Ala.

Uma concretização preferida contempla um polipéptido mostrado nas SEQ ID N°s 2-6 que tem as respectivas sequências de resíduos de aminoácido $DRX_1PHX_2RX_3X_4X^5X_6$, $DRX_1PHX_2RX_3SIT$, $DRX_1PHX_2RNX_4IT$, $DRX_1PHX_2RNSX_5T$ e $DRX_1PHI_2RNSIX_6$. Preferivelmente, os traços nos terminais amino e carboxilo da fórmula $-DRX_1PHX_2RU-$ são grupos amino- e carboxi-terminais, respectivamente, sendo o grupo amino-terminal preferido NH_2 e sendo o grupo carboxi-terminal preferido $COOH$.

Preferivelmente, os polipéptidos incluirão uma sequência de resíduos de aminoácido que corresponde à sequência de resíduos 1351-1456 da Fn (Figura 1) (SEQ ID N° 7). Os polipéptidos incluirão também, normalmente, mas não sempre, resíduos de aminoácido quer na extremidade amino quer na extremidade carboxilo da sequência 1351-1456 da Fn, por exemplo, a sequência 1255-1456 mostrada na Figura 2 (SEQ ID N° 8). Adicionalmente, é preferível que a extremidade $COOH$ dos presentes polipéptidos não ultrapasse mais do que cerca de 150 resíduos para além da extremidade carboxilo da sequência de resíduos de aminoácido mostrada nas Figuras 1 ou 3 (SEQ ID N° 7 e 9, respectivamente).

Um polipéptido preferido nesta concretização tem uma sequência de resíduos de aminoácido representada por uma fórmula seleccionada de entre o grupo constituído por:



DRVPHSRNSIT,
DRAPHSRNSIT,
DRVPHARNSTIT,
DRVPHSRASIT,
DRVPHSRNAIT,
DRVPHSRNSAT e
DRVPHSRNSIA,

cujas SEQ ID N° são 11, 17, 18, 19, 20, 21 e 22, respectivamente.

Numa concretização do invento o polipéptido pode ter uma proteína de ligação de maltose (MBP) ligada covalentemente ao terminal N da sequência Fn seleccionada. A região MBP da proteína de fusão liga-se fortemente à amilose (amido) imobilizada o que facilita a purificação da proteína desejada dos contaminantes, tais como proteínas não contendo MBP. O fragmento MBP pode estar ligado directamente ao fragmento de Fn seleccionado ou podem proporcionar-se resíduos de aminoácido de interposição entre as regiões de MBP e do polipéptido.

Numa concretização, os presentes polipéptidos não são glicosados, i.e., eles são produzidos directamente por técnicas de síntese de péptidos ou são produzidos numa célula procariota transformada com um ADN recombinante do presente invento. As moléculas de péptidos produzidas eucarioticamente são tipicamente glicosadas.

Deve-se compreender que um polipéptido objecto não necessita de ser idêntico à sequência de resíduos de aminoácido de Fn, desde que os polipéptidos objectos sejam capazes de competir pelos sítios de ligação de GPIIb-IIIa.

Um polipéptido objecto inclui qualquer análogo, fragmento ou derivado químico de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácido é aqui mostrada, desde que o polipéptido seja capaz de competir pelos sítios de ligação de GPIIb-IIIa. Por consequência, o presente polipéptido pode ser submetido a várias alterações, inserções, deleções e substituições, conservativas ou não



conservativas, onde tais alterações proporcionem certas vantagens na sua utilização.

Relativamente a isto, um polipéptido deste invento corresponde, em vez de ser idêntico, à sequência de Fn onde foi feita uma ou mais alterações e mantém a capacidade de competir pelos sítios de ligação num ou mais dos ensaios, como aqui definido.

O termo "análogo" inclui qualquer polipéptido tendo uma sequência de resíduos de aminoácido substancialmente idêntica a uma sequência aqui especificamente mostrada, na qual um ou mais resíduos foram substituídos conservativamente por um resíduo funcionalmente semelhante e que apresenta a capacidade de inibir a ligação, como aqui descrito. Os exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo não polar (hidrofóbico) tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por um outro, a substituição de um resíduo polar (hidrofílico) por um outro tal como entre a arginina e a lisina, entre a glutamina e a asparagina, entre a glicina e a serina, a substituição de um resíduo básico tal como lisina, arginina ou histidina por um outro, ou a substituição de um resíduo ácido, tal como ácido aspártico ou ácido glutâmico por um outro.

A frase "substituição conservativa" inclui também a utilização de um resíduo derivado quimicamente em vez de um resíduo não derivado desde que esse polipéptido apresente a actividade requirida.

O termo "derivado químico" refere-se a um polipéptido objecto tendo um ou mais resíduos derivados quimicamente por reacção de um grupo lateral funcional. Tais moléculas derivadas incluem, por exemplo, aquelas moléculas nas quais os grupos amino livres foram derivados para formar hidrocloreto de amina, grupos p-toluenossulfonilo, grupos carbobenzoxilo, grupos t-butiloxi-carbonilo, grupos cloroacetilo ou grupos formilo. Os grupos carboxilo livres podem ser derivados para formar sais, ésteres de metilo e etilo ou outros tipos de ésteres ou hidrazidas. Os



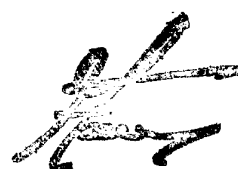
grupos hidroxilo livres podem ser derivados para formar derivados O-acilo ou O-alquilo. O azoto do imidazolo da histidina pode ser derivado para formar N-im-benzil-histidina. Estão também incluídos como derivados químicos aqueles péptidos que contêm um ou mais derivados de aminoácido dos vinte aminoácidos comuns que ocorrem naturalmente. Por exemplo: a prolina pode ser substituída por 4-hidroxiprolina; a lisina pode ser substituída por 5-hidroxilisina; a histidina pode ser substituída por 3-metil-histidina; a serina pode ser substituída por homoserina; e a lisina pode ser substituída por ornitina.

As modificações particularmente preferidas são aquelas modificações concebidas para aumentar a estabilidade do polipéptido em solução e, por consequência, servir para prolongar a semi vida dos polipéptidos em soluções, particularmente fluídos biológicos tais como sangue, plasma ou soro. Modificações de exemplo são aquelas que bloqueiam a susceptibilidade à actividade proteolítica no sangue. Assim, um polipéptido pode ter um grupo estabilizador num ou nos dois terminais. Os grupos estabilizadores típicos incluem amido, acetilo, benzilo, fenilo, tosilo, alcoxicarbonilo, alquilcarbonilo, benziloxicarbonilo e modificações do grupo terminal, semelhantes. Modificações adicionais incluem a utilização de um "L" aminoácido em vez de um "D" aminoácido nos terminais, a ciclização do polipéptido e terminais amida em vez de amino ou carboxilo para inibir a actividade de exopeptidase.

Os polipéptidos do presente invento incluem também qualquer polipéptido tendo uma ou mais adições e/ou deleções ou resíduos, relativamente à sequência de um polipéptido cuja sequência é aqui mostrada, desde que seja mantida a actividade requerida.

O termo "fragmento" refere-se a qualquer polipéptido objecto tendo uma sequência de resíduos de aminoácido mais curta do que a de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácido é aqui mostrada.

Quando um polipéptido do presente invento tem uma sequência



que não é idêntica à sequência de Fn, isto deve-se tipicamente ao facto de terem sido feitas uma ou mais substituições conservativas ou não conservativas, normalmente não são substituídos mais do que cerca de 30 por cento, e preferivelmente não mais do que 10 por cento dos resíduos de aminoácido.

O termo "substancialmente homóloga" significa que uma sequência ou molécula objecto particular, por exemplo, uma sequência mutante, difere de uma sequência de referência em uma ou mais substituições, deleções ou adições, cujo efeito líquido não resulta numa dissemelhança funcional adversa entre as sequências de referência e os objectivos. Para os fins do presente invento, são consideradas como substancialmente homólogas as sequências de aminoácidos tendo mais do que 90 por cento de semelhanças, actividade biológica equivalente e características de expressão equivalentes e que são incluídas no âmbito de um polipéptido deste invento.

As sequências de aminoácidos tendo mais do que 40 por cento de semelhanças são consideradas substancialmente semelhantes. Para o fim de determinar a homologia ou semelhança, não devem ser consideradas a truncagem ou as deleções internas da sequência de referência, assim como as modificações subsequentes da molécula, por exemplo, a glicosação. As sequências tendo menores graus de homologia e bioactividade comparável são consideradas equivalentes.

Podem ser também adicionados resíduos adicionais em qualquer terminal de um polipéptido deste invento com o fim de proporcionar um "ligador" pelo qual os péptidos deste invento podem ser adequadamente fixados a um marcador ou matriz sólida, ou veículo. Preferivelmente, os resíduos ligadores não formam epítomos que são reactivos de modo cruzado com Fn, i.e., não são suficientemente semelhantes em estrutura a um polipéptido Fn de forma a produzirem anticorpos de reacção cruzada.

Os marcadores, matrizes sólidas e veículos que podem ser utilizados com os polipéptidos deste invento são a seguir

descritos.

Os ligadores de resíduos de aminoácido são normalmente, pelo menos, um resíduo e podem ser 40 ou mais resíduos, mais frequentemente 1 a 10 resíduos, mas não formam epítomos reactivos de modo cruzado com um polipéptido Fn deste invento. Os resíduos de aminoácido típicos utilizados para ligação são a tirosina, cisteína, lisina, ácido glutâmico e aspártico ou semelhantes. Adicionalmente, um polipéptido objecto pode diferir, a não ser que de outro modo especificado, da sequência natural da protease correspondente pela modificação da sequência por acilação no terminal NH_2 , por exemplo, acetilação ou amidação com ácido tioglicólico, por amidação no terminal carboxilo, por exemplo, com amoníaco, metilamina e pelas modificações de terminal semelhantes.

Quando acoplado a um veículo para formar aquilo que é conhecido na arte como um conjugado veículo-hapteno, um polipéptido do presente invento é capaz de induzir anticorpos que imunorreagem com Fn. Tendo em vista o princípio bem estabelecido de reactividade imunológica cruzada, o presente invento contempla, por consequência, variantes antigenicamente relacionadas de um polipéptido deste invento. Uma "variante antigenicamente relacionada" é um polipéptido objecto que é capaz de induzir moléculas de anticorpo que imunorreagem com um polipéptido deste invento e imunorreagem com Fn.

Qualquer péptido do presente invento pode ser utilizado na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Os ácidos adequados que são capazes de formar sais com os péptidos do presente invento incluem ácidos inorgânicos tais como ácido clorídrico, ácido bromídico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociânico, ácido sulfúrico, ácido fosforoacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinâmico, ácido naftalenossulfónico, ácido sulfanílico ou semelhantes.



As bases adequadas capazes de formar sais com os péptidos do presente invento incluem bases inorgânicas tais como hidróxido de sódio, hidróxido de amónio, hidróxido de potássio e semelhantes; e bases orgânicas tais como mono-, di- e tri-alkil- e arilaminas (por exemplo, trietilamina, diisopropilamina, metilamina, dimetilamina e semelhantes) e etanolaminas opcionalmente substituídas (por exemplo, etanolamina, dietanolamina e semelhantes).

Um polipéptido do presente invento, também referido aqui como um polipéptido objecto, pode ser sintetizado por qualquer das técnicas que são conhecidas dos peritos na arte de polipéptidos, incluindo as técnicas de ADN recombinante. As técnicas de química sintética, tais como uma síntese de tipo Merrifield em fase sólida, são preferidas por razões de pureza, especificidade antigénica, isenção de produtos secundários indesejáveis, facilidade de produção e semelhantes. Um excelente sumário das muitas técnicas disponíveis pode ser encontrado em J.M. Steward e J.D. Young, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; M. Bodanszky, et al., "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Segunda Edição, 1976 e J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983 para a síntese de péptidos em fase sólida e E. Schroder e K. Kubke, "The Peptides", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965 para a síntese clássica em solução, cada um dos quais é aqui incorporado para referência. Os grupos protectores apropriados utilizáveis em tais sínteses são descritos nos textos anteriores e em J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, New York, 1973, que é aqui incorporado para referência.

Em geral, os processos de síntese em fase sólida contemplados compreendem a adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia peptídica em crescimento. Normalmente, o grupo amino ou o grupo carboxilo do primeiro resíduo de aminoácido é protegido por um grupo protector selectivamente removível, adequado. É utilizado um grupo protector



selectivamente removível, diferente, para os aminoácidos contendo um grupo lateral reactivo tal como lisina.

Utilizando uma síntese em fase sólida como exemplo, o aminoácido protegido ou derivado é ligado a um suporte sólido inerte através do seu grupo carboxilo ou amino não protegido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é então selectivamente removido e o aminoácido seguinte na sequência tendo o grupo (amino ou carboxilo) complementar adequadamente protegido é misturado e feito reagir sob condições adequadas para a formação da ligação amida com o resíduo já ligado ao suporte sólido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é então removido deste resíduo de aminoácido acabado de adicionar, e o aminoácido seguinte (adequadamente protegido) é então adicionado, e assim sucessivamente. Após todos os aminoácidos desejados terem sido ligados na sequência adequada, qualquer grupo protector de grupo terminal e lateral, remanescentes, (e suporte sólido) são sequencialmente ou concorrentemente removidos, para proporcionar o polipéptido final.

Alternativamente, os presentes polipéptidos podem ser sintetizados por técnicas de ADN recombinante. Um certo número de sequências nucleotídicas diferentes pode codificar uma sequência de resíduos de aminoácido particular devido à redundância do código genético. Tais sequências nucleotídicas são consideradas como funcionalmente equivalentes visto que podem resultar na produção da mesma sequência de resíduos de aminoácido em todos os organismos. Ocasionalmente, pode ser incorporada uma variante metilada de uma purina ou pirimidina numa dada sequência nucleotídica. Contudo, tais metilações não afectam de qualquer forma a relação de codificação.

C. Segmentos de ADN

São contempladas no presente invento as moléculas de ácido desoxirribonucleico (ADN) que definem um gene que codifica, i.e. é capaz de expressar, um polipéptido objecto ou um polipéptido quimérico objecto. As moléculas de ADN que codificam os



polipéptidos objecto podem ser facilmente sintetizadas por técnicas químicas, por exemplo, pelo processo do fosfotriéster de Matteucci *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, 103:3185 (1981). Claro que, por síntese química da sequência de codificação, quaisquer modificações desejadas podem ser realizadas simplesmente por substituição das bases que codificam a sequência de resíduos de aminoácido nativa pelas bases apropriadas.

Uma molécula de ADN que inclui uma sequência de ADN que codifica um polipéptido objecto pode ser preparada por ligação (união) operativa de fragmentos de restrição apropriados de cada um dos plasmídeos acima depositados utilizando processos bem conhecidos. As moléculas de ADN do presente invento produzidas desta maneira têm tipicamente terminais coesivos, i.e. porções de cadeia simples "pendentes" que se prolongam para além da porção de cadeia dupla da molécula. É preferível a presença de terminais coesivos nas moléculas de ADN do presente invento.

São também contemplados pelo presente invento os equivalentes de ácido ribonucleíco (ARN) das moléculas de ADN acima descritas.

Os segmentos de ADN preferidos codificarão polipéptidos que incluem uma sequência de resíduos de aminoácido correspondente àquela mostrada na Figura 1 (resíduos 1351-1456 da Fn) (SEQ ID N° 7).

D. Vectores

O presente invento contempla adicionalmente uma molécula de ADN recombinante compreendendo um vector operativamente ligado, para replicação e/ou expressão, a uma molécula de ADN objecto, i.e., uma molécula de ADN que define um gene que codifica um polipéptido objecto ou um polipéptido quimérico objecto.

A escolha do vector ao qual um segmento de ADN do presente invento é operativamente ligado depende directamente, como é bem conhecido na arte, das



propriedades funcionais desejadas, por exemplo, a expressão de proteínas, e da célula hospedeira a ser transformada, sendo estas limitações inerentes na arte de construção de moléculas de ADN recombinante. Contudo, um vector contemplado pelo presente invento é, pelo menos, capaz de dirigir a replicação e, preferivelmente, também a expressão do gene do polipéptido quimérico objecto incluído nos segmentos de ADN ao qual está operativamente ligado.

Em concretizações preferidas, um vector contemplado pelo presente invento inclui um replicação procariota, i.e., uma sequência de ADN tendo a capacidade de dirigir a replicação autónoma e a manutenção da molécula de ADN recombinante extracromossomalmente numa célula hospedeira procariota, tal como uma célula hospedeira bacteriana, transformada com ele. Tais replicações são bem conhecidos na arte. Adicionalmente, aquelas concretizações que incluem um replicação procariota incluem também um gene cuja expressão confere resistência a drogas a um hospedeiro bacteriano transformado com ele. Os genes de resistência a droga bacterianos típicos são aqueles que conferem resistência à ampicilina ou à tetraciclina.

Aqueles vectores que incluem um replicação procariota podem também incluir um promotor procariota capaz de dirigir a expressão (transcrição e tradução) do gene do polipéptido quimérico objecto numa célula hospedeira bacteriana, tal como E. coli, transformada com ele. Um promotor é um elemento de controlo da expressão formado por uma sequência de ADN que permite a ligação da ARN-polimerase e a ocorrência da transcrição. As sequências promotoras compatíveis com os hospedeiros bacterianos, tais como um promotor tac, são tipicamente proporcionadas nos vectores plasmídicos contendo sítios de restrição adequados para a inserção de um segmento de ADN do presente invento. São típicos de tais vectores plasmídeos o pUC8, pUC9, pBR322 e pBR329 disponíveis em Biorad Laboratories, (Richmond, CA) e pPL e pKK223 disponíveis em Pharmacia (Piscataway, NJ).

Os vectores de expressão compatíveis com células eucariotas,

preferivelmente aqueles compatíveis com células de vertebrados, podem também ser utilizados para formar as moléculas de ADN recombinante do presente invento. Os vectores de expressão em célula eucariotas são bem conhecidos na arte e estão disponíveis em várias fontes comerciais. Tipicamente, tais vectores são fornecidos contendo sítios de restrição adequados para inserção do segmento de ADN desejado. São típicos de tais vectores o pSVL e pKSV-10 (Pharmacia), pBPV-1pML2d (International Biotechnologies, Inc.) e pTDT1 (ATCC, #31255).

Em concretizações preferidas, os vectores de expressão em células eucariotas utilizados para construir as moléculas de ADN recombinante do presente invento incluem um marcador de selecção que é eficaz numa célula eucariota, preferivelmente um marcador de selecção de resistência a droga. Um marcador de resistência a droga preferido é o gene cuja expressão resulta na resistência à neomicina, i.e., o gene da neomicina-fosfotransferase (neo). Southern *et al.*, *J. Mol. Appl. Genet.*, 1:327-341 (1982).

É também contemplada a utilização de vectores de expressão retroviral para formar o ADNr do presente invento. Como aqui utilizado o termo "vector de expressão retroviral" refere-se a uma molécula de ADN que inclui uma sequência promotora derivada da região de repetição terminal longa (LTR) de um genoma de retrovírus.

Em concretizações preferidas, o vector de expressão é tipicamente um vector de expressão retroviral que é preferivelmente incapaz de replicação em células eucariotas. A construção e utilização de vectores retrovirais foi descrita por Sorge *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 4:1730-37 (1984).

Desenvolveu-se uma variedade de processos para ligar operativamente o ADN a vectores através de terminais coesivos complementares. Por exemplo, podem ser adicionados trechos de homopolímero complementar ao segmento de ADN a ser inserido e ao ADN vector. O vector e o segmento de ADN são então ligados por ligação de hidrogénio entre as caudas homopoliméricas

complementares para formar moléculas de ADN recombinante.

Os ligadores sintéticos contendo um ou mais sítios de restrição proporcionam um processo alternativo de ligação do segmento de ADN a vectores. O segmento de ADN, gerado por digestão com endonuclease de restrição como anteriormente descrito, é tratado com a ADN-polimerase de bacteriofago T4 e ADN-polimerase I de E. coli, enzimas que removem os terminais protuberantes de cadeia simples 3', com as suas actividades exonucleolíticas 3'-5' e preenchem as extremidades 3' recuadas com as suas actividades de polimerização. A combinação destas actividades gera, por consequência, segmentos de ADN de extremidade romba. Os segmentos de extremidade romba são então incubados com um grande excesso molar de moléculas ligadoras na presença de uma enzima que é capaz de catalisar a ligação das moléculas de ADN de extremidade romba, tal como ADN-ligase de bacteriofago T4. Assim, os produtos da reacção são segmentos de ADN que possuem sequências poliméricas ligadoras nas suas extremidades. Estes segmentos de ADN são então clivados com a enzima de restrição apropriada e ligados a um vector de expressão que foi clivado com uma enzima que produz terminais compatíveis com aqueles do segmento de ADN.

Os ligadores sintéticos contendo uma variedade de sítios de endonuclease de restrição estão comercialmente disponíveis num certo número de fontes incluindo International Biotechnologies, Inc. (New Haven, CT).

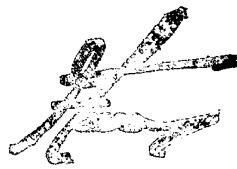
São também contemplados pelo presente invento os equivalentes de ARN das moléculas de ADN recombinante acima descritas.

Os vectores preferidos incluem um segmento de ADN como mostrado na Figura 3, que codifica um polipéptido do presente invento. Os vectores exemplificativos incluem pIH821 e pPR734 (Figura 5), para a preparação de proteínas de fusão MBP de acordo com os princípios deste invento.

E. Transformação de Hospedeiros

O presente invento refere-se também a células hospedeiras transformadas com uma molécula de ADN recombinante (ADNr) do presente invento preferivelmente um ADNr capaz de expressar um polipéptido quimérico objecto. A célula hospedeira pode ser ou procariota ou eucariota. As células bacterianas são células hospedeiras procariotas preferidas e são tipicamente uma estirpe de E. coli tal como, por exemplo, a estirpe DH5 de E. coli disponível em Bethesda Research Laboratories, Inc., Bethesda, MD. As células hospedeiras eucariotas preferidas incluem células de levedura e de mamífero, preferivelmente células de vertebrados tais como aquelas de uma linha de celular fibroblástica de ratinho, ratazana, macaco ou humano. As células hospedeiras eucariotas preferidas incluem as células de ovário de criceto Chinês (CHO) disponíveis em ATCC como CCL61 e as células de embrião de ratinho Suíço NIH NIH/3T3 disponíveis em ATCC como CRL 1658. A transformação das células hospedeiras apropriadas com uma molécula de ADN recombinante do presente invento é realizada por processos bem conhecidos que dependem tipicamente do tipo de vector utilizado. Em relação à transformação de células hospedeiras procariotas ver, por exemplo, Cohen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69:2110 (1972); e Maniatis et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1982). Em relação à transformação de células de vertebrado com vectores retrovirais contendo ADNr ver, por exemplo, Sorge et al., Mol. Cell. Biol., 4:1730-37 (1984); Graham et al., Virology, 52:456 (1973); e Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:1373-76 (1979).

As células transformadas com sucesso, i.e., as células que contêm uma molécula de ADN recombinante do presente invento, podem ser identificadas por técnicas bem conhecidas. Por exemplo, as células que resultam da introdução de um ADNr do presente invento podem ser clonadas para produzir colónias monoclonais. As células daquelas colónias podem ser colhidas, lisadas e o seu conteúdo de ADN examinado quanto à presença do ADNr utilizando um processo tal como aquele descrito por Southern, J. Mol. Biol.,



98-503 (1975) ou Berent et al., Biotech., 3:208 (1985).

Para além do ensaio directo para a presença de ADNr, a transformação com sucesso pode ser confirmada por processos imunológicos bem conhecidos quando o ADNr é capaz de dirigir a expressão de um polipéptido quimérico objecto. As amostras de células que se suspeita estarem transformadas são colhidas e analisadas quanto à presença de antigenicidade ao polipéptido utilizando anticorpos anti-Fm.

Para além das próprias células hospedeiras transformadas, o presente invento contempla também uma cultura dessas células, preferivelmente uma cultura monoclonal (clonalmente homogénea) ou uma cultura derivada de uma cultura monoclonal, num meio nutriente.

F. Expressão e Purificação

Os meios nutrientes úteis para a cultura de células hospedeiras transformadas são bem conhecidos na arte e podem ser obtidos a partir de várias fontes comerciais. Em concretizações em que a célula hospedeira é de mamífero, é preferivelmente utilizado um meio "isento de soro".

Os processos para a recuperação de uma proteína expressa a partir de uma cultura são bem conhecidos na arte e incluem o fraccionamento da porção contendo proteína da cultura utilizando técnicas bioquímicas bem conhecidas. Por exemplo, os processos de filtração em gel, cromatografia em gel, ultrafiltração, electroforese, permuta iónica, cromatografia de afinidade e semelhantes, tal como são conhecidos para os fraccionamentos de proteína, podem ser utilizados para isolar as proteínas expressas encontradas na cultura. Para além disso, os processos imunoquímicos, tais como imunoafinidade, imunoadsorção e semelhantes podem ser realizados utilizando processos bem conhecidos. Um processo de purificação preferido emprega Mab para Fn, imobilizados.



G. Processos e Composições Terapêuticos

Um polipéptido objecto pode ser utilizado numa composição para a promoção da ligação (adesão) de células a um substrato. Com base na capacidade de um polipéptido objecto para se ligar a uma integrina nas células, o polipéptido objecto proporciona um meio de ligação ao receptor e, por consequência, pode ser utilizado para promover a actividade de ligação a célula quando o polipéptido está imobilizado num substrato. Utiliza-se uma composição contendo um polipéptido objecto para tratar um substrato e assim imobilizar no substrato o polipéptido contido na composição.

O substrato pode ser qualquer matriz sólida tendo uma superfície na qual é desejada a actividade de promoção da adesão celular e inclui recipientes para a cultura de células, dispositivos médicos, dispositivos prostéticos, fibras de resina sintética, vasos sanguíneos ou enxertos vasculares, dispositivos percutâneos, órgãos artificiais e semelhantes. A superfície pode ser adicionalmente constituída por vidro, uma resina sintética, nitrocelulose, poliéster, agarose, colagénio ou um polissacárido de cadeia longa.

A imobilização dos polipéptidos em substratos pode ser realizada por uma variedade de meios e depende, inter alia, do substrato e do mecanismo de imobilização desejado. Os processos de imobilização ou acoplamento de polipéptidos ao substrato são bem conhecidos na arte e envolvem tipicamente ligações covalentes entre um grupo tiol ou amino no polipéptido e um grupo reactivo presente no substrato. Para os exemplos de processos de imobilização de polipéptidos ver Aurameas et al., Scand J. Immunol., Vol. 8 Supl. 7:7-23 (1978); Patentes U.S. N°s. 4 493 795, 4 578 079 e 4 671 950; Klipstein et al., J. Infect. Dis., 147:318-326 (1983) e Liu et al., Biochem., 80:690 (1979). Para os exemplos da utilização de polipéptidos promotores de adesão celular ver Patente U.S. N°. 4 578 079.

São também contempladas os dispositivos prostéticos e



médicos que utilizam os substratos para ligar in vivo células à superfície ou para promover o crescimento de células numa superfície particular antes do enxerto. Por exemplo, o crescimento de células endoteliais pode ser induzido em vasos sanguíneos prostéticos ou enxertos vasculares, tais como aqueles tecidos ou tricotados a partir de fibras de poliéster. Tais dispositivos podem ser úteis no fecho e cicatrização de feridas a seguir a acidentes ou cirurgia. Em tais casos pode ser útil acoplar os polipéptidos a outras moléculas biológicas, tais como colagénio, glicosaminoglicanos, etc. O acoplamento pode ser facilitado por reticulação química, por exemplo por pontes de dissulfureto. As superfícies dos dispositivos prostéticos podem também ser revestidas com os presentes polipéptidos, particularmente quando os dispositivos se destinam a ser utilizados temporariamente no corpo, por exemplo, para inserção nos vasos sanguíneos ou na cavidade peritoneal.

Os polipéptidos objecto podem ser fornecidos numa grande variedade de composições. Assim, as composições de polipéptido podem compreender um ou mais polipéptidos assim como um meio de aplicação adequado, tal como um gel, pomada, loção, colóide ou pó. A composição é aplicada ao substrato utilizando meios convencionais e as células que se desejam ligar são aplicadas utilizando técnicas bem conhecidas de um perito na arte.

Uma concretização relaccionada contempla a modulação da adesão celular in vivo que apresentam um receptor da integrina reconhecido pelo polipéptido. Por exemplo, um polipéptido objecto pode ser utilizado numa composição farmacêuticamente aceitável que, quando administrada a um sujeito humano numa quantidade eficaz é capaz de inibir competitivamente a agregação de plaquetas. Pensa-se que a inibição resulta numa velocidade diminuída de formação de trombo. Assim, a administração in vivo de um polipéptido objecto pode ser utilizada para modular qualquer resposta fisiológica iniciada por adesão tal como coagulação e algumas respostas inflamatórias.

Numa outra concretização, as funções de adesão celular

normais de uma célula que possui uma integrina na sua superfície podem ser inibidas ou moduladas por administração intravenosa de uma quantidade eficaz de uma composição farmacologicamente aceitável compreendendo um anticorpo policlonal ou monoclonal deste invento que imunorreage com o polipéptido.

Visto que os anticorpos policlonais ou monoclonais podem ser utilizados terapêuticamente para modular os acontecimentos mediados por adesão celular, o presente invento contempla também a utilização de um polipéptido objecto para neutralizar o efeito modulador de anticorpos administrados terapêuticamente, por exemplo, como um antídoto para o anticorpo anti-polipéptido. A escolha do polipéptido a ser administrado como um antídoto depende do anticorpo a ser neutralizado e requer que o polipéptido administrado tenha a capacidade de imunorreagir com o anticorpo administrado.

As composições administradas contendo polipéptido ou molécula de anticorpo podem ter a forma de soluções ou suspensões, contudo, os polipéptidos podem ter também a forma de comprimidos, pílulas, cápsulas, formulações de libertação retardada ou pós.

Uma composição terapêutica contém tipicamente uma quantidade de, pelo menos, 0,1 por cento em peso de ingrediente activo, i.e., um polipéptido ou anticorpo deste invento, por peso total de composição terapêutica. Uma percentagem em peso é uma razão ponderal de ingrediente activo para composição total. Assim, por exemplo, 0,1 por cento em peso é 0,1 grama de polipéptido por 100 gramas de composição total.

Descrevendo de maneira diferente, uma composição terapêutica contém tipicamente cerca de 0,1 micromolar (μM) a cerca de 1,0 molar (M) de polipéptido como ingrediente activo, preferivelmente cerca de 1,0 a cerca de 100 milimolar (mM), ao passo que as composições contendo molécula de anticorpo contém tipicamente cerca de 0,1 a cerca de 20 miligramas de anticorpo como ingrediente activo por mililitro de composição terapêutica e,



preferivelmente, cerca de 1 mg/ml a cerca de 10 mg/ml.

É bem conhecida na arte a preparação de uma composição terapêutica que contém polipéptidos ou moléculas de anticorpo como ingredientes activos. Tipicamente, tais composições são preparadas como injectáveis, como soluções ou como suspensões líquidas, contudo, podem também ser preparadas formas sólidas adequadas para solução ou suspensão em líquido antes da injeção. A preparação pode também ser emulsionada. O ingrediente terapêutico activo é frequentemente misturado com excipientes que são farmacologicamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo, como é bem conhecido. Os excipientes adequados são, por exemplo, a água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Além disso, se desejado, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes de pH que aumentam a eficácia do ingrediente activo.

Um polipéptido ou anticorpo pode ser formulado na composição terapêutica como formas de sais farmacologicamente aceitáveis, neutralizadas. Os sais farmacologicamente aceitáveis incluem os sais de adição de ácido (formados com os grupos amino livres do polipéptido ou da molécula de anticorpo) que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos tais como o acético, tartárico, mandélico e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, os hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico, e de bases orgânicas tais como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína e semelhantes.

As composições terapêuticas contendo polipéptido ou anticorpo são administradas convencionalmente por via intravenosa, por exemplo, por injeção de uma dose unitária. O termo "dose unitária" quando utilizado relativamente a uma composição terapêutica do presente invento refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para

humanos, contendo cada unidade uma quantidade predeterminada de um material activo que se calcula produzir o efeito terapêutico desejado em associação com o diluente requerido, i.e., o transportador ou veículo.

As composições são administradas de uma maneira compatível com a formulação de dosagem e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada depende do sujeito a ser tratado, da capacidade do sujeito para utilizar o ingrediente activo e do grau de inibição desejado, da ligação receptor-ligando. As quantidades exactas de ingrediente activo requerido para ser administrado dependem do critério do médico e são particulares para cada indivíduo. Contudo, os intervalos de dosagem adequados são da ordem de um a vários miligramas de ingrediente activo por indivíduo por dia e dependem da via de administração. Os regimes adequados para a administração inicial e injeções de reforço são também variáveis, mas são tipificados por uma administração inicial seguida por doses repetidas a intervalos de uma ou mais horas de uma injeção subsequente ou outra administração. Alternativamente, é também contemplada a infusão intravenosa contínua suficiente para manter concentrações terapeuticamente eficazes no sangue. Para um polipéptido objecto, as concentrações sanguíneas terapeuticamente eficazes estão no intervalo de cerca de 1,0 mM a cerca de 10 mM, preferivelmente de cerca de 50 mM a cerca de 1,0 mM. Sempre que os polipéptidos objectos são utilizados para promover a ligação de células, por exemplo, para ligar células endoteliais, tais composições têm tipicamente uma concentração superior àquelas tomadas internamente.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um polipéptido deste invento é tipicamente uma quantidade de polipéptido tal que quando administrada numa composição fisiologicamente tolerável é suficiente para atingir uma concentração plasmática de cerca de 1 micromolar (μM) a cerca de 100 milimolar (mM) e preferivelmente de cerca de 10 μM a cerca de 100 μM .

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo deste

invento é tipicamente uma quantidade de anticorpo tal que quando administrada numa composição fisiologicamente tolerável é suficiente para atingir uma concentração plasmática de cerca de 0,1 micrograma (μg) por mililitro (ml) a cerca de 100 $\mu\text{g/ml}$ e preferivelmente de cerca de 1 $\mu\text{g/ml}$ a cerca de 5 $\mu\text{g/ml}$.

H. Anticorpos e Anticorpos Monoclonais

Um reagente do presente invento é uma molécula que liga especificamente um epítipo de fibronectina (Fn) definido por um polipéptido deste invento. Como aqui utilizado, o termo "ligação específica" e seus equivalentes gramaticais refere-se a uma reacção de ligação não aleatória entre um receptor e uma molécula de ligando. Ilustrativo de um complexo receptor-ligando ligado especificamente, como aqui contemplado, é aquele entre um receptor de GPIIb-IIIa de plaqueta e o ligando Fn na superfície da plaqueta. Outros reagentes que se sabe ligarem especificamente a Fn incluem anticorpos policlonais e monoclonais criados contra Fn e seus fragmentos antigénicos. Assim, os anticorpos adequados para a produção de um anticorpo deste invento incluem os anticorpos nativos para Fn e os anticorpos criados contra determinantes antigénicas de Fn tais como aqueles definidos pelos polipéptidos deste invento.

As diferentes regiões funcionais da fibronectina podem ser analisadas eficazmente pela utilização de anticorpos para a molécula de fibronectina. Assim, os anticorpos criados para a fibronectina podem ser analisados quanto à sua capacidade para se ligarem (imunorreagirem) a vários fragmentos polipeptídicos de fibronectina. Quando a composição de anticorpo estudada se liga a um dado fragmento, o fragmento é identificado como apresentando um epítipo para o anticorpo. Desta forma, são identificadas as diferentes regiões da molécula de proteína que são reconhecidas por uma dada molécula de anticorpo.

Os presentes polipéptidos de Fn ligam-se adicional e preferencialmente aos seus receptores. Como aqui utilizado, uma molécula de reagente do presente invento é considerada como

"ligando preferencialmente" uma espécie alvo no ensaio quando o reagente se associa mais fortemente à molécula alvo do que a outras espécies presentes no ensaio. Assim a reacção da molécula reagente com o alvo tem geralmente uma maior constante de associação do que a reacção do reagente com qualquer outra espécie presente no ensaio. Tipicamente, um reagente presente ligar-se-à "preferencialmente" à sua espécie alvo quando a afinidade de ligação do reagente para o alvo for 2-3 vezes maior e preferivelmente pelo menos 10 vezes maior do que a correspondente afinidade do reagente para uma outra espécie. Assim, um anticorpo monoclonal (Mab) para Fn tem preferivelmente uma afinidade dez vezes maior para Fn do que para os péptidos de controlo. Contrariamente, a Fn liga-se preferivelmente aos presentes Mab dez vezes mais do que aos Mab de controlo.

Uma composição de anticorpo do presente invento é caracterizada por conter moléculas de anticorpo que imunorreagem com Fn e seus fragmentos e imunorreagem com um polipéptido deste invento, mas não se ligam (imunorreagem) preferivelmente com outra espécie de polipéptido, tal como um polipéptido derivado da sequência de Fn e conter a sequência de repetição Eight Type III. Um polipéptido de exemplo tem a sequência de Fn entre os resíduos 1235 e 1325. Numa concretização preferida, as moléculas de anticorpo imunorreagem com uma sequência de aminoácidos não contendo RGD, de Fn, localizada, pelo menos, 50 resíduos a montante (na direcção do terminal N) da sequência RGD de Fn. Preferivelmente as composições de anticorpo imunorreagirão com os polipéptidos que incluem a sequência de resíduos de aminoácido mostrada na Figura 1 (SEQ ID N° 7).

Um anticorpo preferido como aqui contemplado é tipicamente produzido por imunização de um mamífero com um inóculo contendo Fn, ou seus fragmentos polipeptídicos, de um animal hospedeiro pré-seleccionado, induzindo assim no mamífero moléculas de anticorpo tendo a imuno especificidade apropriada para o antigénio alvo. As moléculas de anticorpo são então recolhidas do mamífero e analisadas na extensão desejada por técnicas bem conhecidas tal como, por exemplo, por imunoafinidade para a Fn imobilizada. Além



disso, um anticorpo deste invento pode ser analisado quanto à sua capacidade para inibir a ligação de um ligando Fn a um receptor GPIIb-IIIa utilizando ensaios padrão de inibição competitiva, tais como aqueles descritos nos Exemplos. A composição de anticorpo assim produzida pode ser utilizada inter alia, nos processos e sistemas de diagnóstico do presente invento para detectar o antigénio numa amostra de fluido corporal.

Por consequência, um anticorpo deste invento imunorreage com o sítio de ligação de GPIIb-IIIa na Fn como aqui definido e inibe assim a ligação ao seu receptor nativo GPIIb-IIIa, dando a sua utilidade como reagente para inibir a ligação da Fn a GPIIb-IIIa.

Assim, um anticorpo policlonal preferido é caracterizado por ter a capacidade de imunorreagir com uma subunidade de Fn e inibir assim a capacidade da Fn para se ligar especificamente ao seu receptor, preferivelmente ao receptor GPIIb-IIIa da Fn. Assim, um anticorpo policlonal objecto é útil para inibir e portanto modular, in vivo ou in vitro, a adesão das células que contêm receptores da integrina que se ligam a Fn.

Um anticorpo policlonal do presente invento é tipicamente produzido por imunização de um mamífero com um inóculo do presente invento, preferivelmente um inóculo contendo um péptido que incorpora uma sequência de resíduos de aminoácido localizada pelo menos 50 aminoácidos a montante de RGD. As moléculas de anticorpo são então recolhidas do mamífero e isoladas na extensão desejada por técnicas bem conhecidas tal como, por exemplo, por cromatografia de imunoafinidade utilizando o polipéptido de imunização na fase sólida. O anticorpo policlonal assim produzido pode ser utilizado, inter alia, nos processos e sistemas de diagnóstico do presente invento para discriminar entre Fn e outras proteínas ou entre os fragmentos de Fn contendo epítomos dos anticorpos e outros fragmentos, etc. Os anticorpos podem também ser utilizados em processos terapêuticos com a finalidade de modular a adesão celular, tal como inibir a adesão de plaquetas.



Os anticorpos monoclonais (Mab) para Fn são também contemplados pelo presente invento. A frase "composição de anticorpo monoclonal" nas suas várias formas gramaticais refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que só contém uma espécie de sítio de combinação de anticorpo capaz de imunorreagir com um antigénio particular. Assim, a presente composição de Mab apresenta tipicamente uma afinidade de ligação única para qualquer antigénio com o qual imunorreage. Por consequência, uma composição de anticorpo monoclonal pode conter uma molécula de anticorpo tendo uma pluralidade de sítios de combinação de anticorpo, cada um imuno específico para um antigénio diferente, por exemplo, um anticorpo monoclonal biespecífico.

Os Mab do presente invento são tipicamente compostos por anticorpos produzidos por clones de uma única célula, denominados hibridoma, que segrega (produz) apenas um tipo de molécula de anticorpo. A célula de hibridoma é formada por fusão de uma célula produtora de anticorpo e de um mieloma ou de outra linha de células que se auto-perpetuam. Tais anticorpos foram descritos em primeiro lugar por Kohler e Milstein, Nature, 256:495-497 (1975), cuja descrição é incorporada para referência.

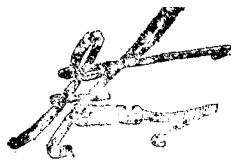
Um anticorpo monoclonal pode também ser produzido por processos bem conhecidos dos peritos na arte de produção de anticorpos quiméricos. Esses processos incluem o isolamento, manipulação e expressão do ácido nucleico que codifica toda ou parte de uma região variável de imunoglobulina incluindo a porção da região variável compreendendo a região variável da cadeia leve de imunoglobulina e a porção da região variável compreendendo a região variável da cadeia pesada da imunoglobulina. Os processos de isolamento, manipulação e expressão do ácido nucleico que codifica a região variável em hospedeiros procariotas e eucariotas são descritos em Robinson et al., Publicação PCT N° WO 89/0099; Winter et al., Publicação de Patente Europeia N°. 0239400; Reading, Patente U.S. No. 4 714 681; Cabilly et al., Publicação de Patente Europeia No. 0125023; Sorge et al., Mol. Cell Biol., 4:1730-1737 (1984); Beher et al., Science,

240:1041-1043 (1988); Skerra et al., Science, 240:1030-1041 (1988); e Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:3833-3837 (1989). Tipicamente o ácido nucleico codifica toda ou parte de uma região variável da imunoglobulina que se liga a um antígeno pré-seleccionado (ligando). As fontes desse ácido nucleico são bem conhecidas de um perito na arte e, por exemplo, podem ser obtidas a partir de um hibridoma que produz um anticorpo monoclonal que se liga ao antígeno pré-seleccionado, ou o antígeno pré-seleccionado pode ser utilizado para analisar uma biblioteca de expressão que codifica uma pluralidade de regiões variáveis da imunoglobulina, isolando assim o ácido nucleico.

Os anticorpos monoclonais preferidos imuno-reegem com a Fn livre ou com seus fragmentos polipeptídicos. Os anticorpos podem também imuno-reegir com os fragmentos de Fn imobilizados em substratos ou ligados a um ligando, tal como GPIIb-IIIa desde que o(s) epítopo(s) do Mab não seja(m) obstruído(s).

O presente invento contempla também um processo de formação de uma molécula de anticorpo monoclonal que imuno-reege com uma região de Fn.

(a) Imunização de um animal com um polipéptido Fn deste invento na forma de um imunogénio. O imunogénio é, preferivelmente, uma amostra homóloga dos polipéptidos aqui descritos. Contudo, o antígeno pode também ser ligado a uma proteína transportadora tal como hemocianina de lapa (género *Fissurella*), particularmente quando o antígeno é pequeno. A imunização é tipicamente realizada por administração da amostra a um mamífero imunologicamente competente numa quantidade imunologicamente eficaz, i.e., numa quantidade suficiente para produzir uma resposta imunitária. O mamífero é, preferivelmente, um roedor tal como um coelho, ratazana ou ratinho. O mamífero é então mantido durante um período de tempo suficiente para o mamífero produzir células que segregam moléculas de anticorpo que imuno-reegem com o receptor.



(b) É então preparada uma suspensão de células produtoras de anticorpos removidas do mamífero imunizado. Isto é tipicamente realizado por remoção do baço do mamífero e separação mecânica das células de baço individuais num meio fisiologicamente tolerável utilizando processos bem conhecidos na arte.

(c) As células produtoras de anticorpos suspensas são tratadas com um agente de transformação capaz de produzir uma linha de células transformadas ("imortalizadas"). Os agentes de transformação e a sua utilização para produzir linhas de células imortalizadas são bem conhecidos na arte e incluem os vírus de ADN tais como o Vírus de Epstein Bar (EBV), o Vírus de Símio 40 (SV40), o Vírus Polioma e semelhantes, os vírus de ARN tais como o Vírus da Leucemia Murina de Moloney (MoMuLV), o Vírus do Sarcoma de Rous e semelhantes, as células de mieloma tais como P3X63-Ag8.653, Sp2/O-Ag14 e semelhantes.

Em concretizações preferidas, o tratamento com o agente de transformação resulta na produção de um hibridoma "imortalizado" por meio de fusão das células de baço suspensas com células de mieloma de ratinho de uma linha de células adequada, por exemplo, SP-2, pela utilização de um promotor de fusão adequado. A razão preferida é de cerca de cinco células de baço por célula de mieloma numa suspensão contendo cerca de 10^8 esplenócitos. Um promotor de fusão preferido é o polietilenoglicol tendo uma massa molecular média de cerca de 1000 a cerca de 4000 (disponível comercialmente como PEG 1000, etc.); contudo, podem ser empregues outros promotores de fusão conhecidos na arte.

A linha de células é preferivelmente do tipo denominado "resistente a drogas", de modo que as células de mieloma não fundidas não sobrevivam num meio selectivo, ao passo que os híbridos sobrevivem. A classe mais comum é a linha de células resistente à 8-azaguanina, que carece da enzima hipoxantina-guanina-fosforribosil-transferase e, portanto, não será suportada pelo meio HAT (hipoxantina, aminopterina e timidina). Em geral é também preferível que a linha de células de mieloma utilizada seja do tipo denominado "não secretor" que não

produz ela própria qualquer anticorpo. Contudo, em certos casos podem ser preferidas linhas de mieloma secretoras.

(d) As células transformadas são então clonadas, preferivelmente até à monoclonalidade. A clonagem é preferivelmente realizada num meio de cultura de tecidos que não mantém suporta células não transformadas. Quando as células transformadas são hibridomas, isto é tipicamente realizado por diluição e cultura em recipientes separados da mistura de células de baço não fundidas, células de mieloma não fundidas e células fundidas (hibridomas) num meio selectivo que não suporta as células de mieloma não fundidas. As células são cultivadas neste meio durante um período de tempo suficiente para permitir a morte das células não fundidas (cerca de uma semana). A diluição pode ser uma diluição limitante, na qual o volume de diluente é calculado estatisticamente para isolar um certo número de células (por exemplo, 1-4) em cada recipiente separado (por exemplo, cada cavidade de uma placa de microtitulação). O meio é um (por exemplo, meio HAT) que não suporta a linha de células de mieloma não fundidas resistente a drogas (por exemplo, resistente a 8-azaguanina).

(e) O meio de cultura de tecidos dos transformantes clonados é analisado (analisado imunologicamente) para detectar a presença de moléculas de anticorpo que reagem preferivelmente com Fn e com um polipéptido de Fn deste invento. Isto é realizado utilizando técnicas imunológicas bem conhecidas.

(f) É então seleccionado um transformante desejado e deixado desenvolver num meio de cultura de tecidos apropriado durante um período de tempo adequado, seguido por recuperação (recolha) do anticorpo desejado do sobrenadante de cultura por técnicas bem conhecidas. O meio adequado e o período de tempo de cultura adequado são também bem conhecidos ou são facilmente determinados.

Para produzir uma concentração muito maior do anticorpo monoclonal ligeiramente menos puro, o hibridoma desejado pode ser



transferido por injeção para ratinhos, preferivelmente ratinhos singênicos ou semi-singênicos. O hibridoma vai causar a formação de tumores produtores de anticorpo após um tempo de incubação adequado, o que vai resultar numa concentração elevada do anticorpo desejado (cerca de 5-20 mg/ml) na corrente sanguínea e no exsudado peritoneal (ascite) do ratinho hospedeiro.

Os meios e animais úteis para a preparação destas composições são ambos bem conhecidos na arte e estão comercialmente disponíveis e incluem meios de cultura sintéticos, ratinhos consanguíneos e semelhantes. Um meio sintético de exemplo é o meio essencial mínimo de Dulbecco [DMEM; Dulbecco et al., Virology, 8:396 (1959)] suplementado com 4,5 g/l de glucose, glutamina 20 mM e soro de vitela fetal a 20%. Uma estirpe de ratinhos consanguíneos de exemplo é a Balb/c.

Os anticorpos monoclonais produzidos pelo processo anterior podem ser utilizados, por exemplo, em modalidades de diagnóstico e terapêuticas em que é desejada a formação de um produto de imunorreacção contendo Fn. Os processos de produção de hibridomas que geram (segregam) moléculas de anticorpo tendo uma imunoespecificidade desejada, i.e. tendo a capacidade de imunorreagir com uma proteína particular, um epítipo identificável numa proteína particular e/ou um polipéptido, mas não imunoreagir com um segundo polipéptido, tal como a repetição Eighth Type III, são bem conhecidos na arte e são aqui posteriormente descritos. É particularmente aplicável a tecnologia de hibridoma descrita por Niman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:4949-4953 (1983) e por Galfre et al., Meth. Enzymol., 73:3-46 (1981), cujas descrições são aqui incorporadas para referência.

Um outro processo preferido de formação das presentes composições de anticorpo envolve a produção de bibliotecas de moléculas Fab utilizando o processo de Huse et al., Science, 246:1275 (1989). Neste processo, as moléculas de ARNm para as cadeias leve e pesada de anticorpo são isoladas a partir do animal imunizado. Os ARNm são amplificados utilizando técnicas de



reacção em cadeia de polimerase (PCR). Os ácidos nucleicos são então clonados aleatoriamente em fagos lambda para produzirem uma biblioteca de partículas de fago recombinadas. Os fagos podem então ser utilizados para infectar um hospedeiro de expressão tal como E. coli. As colónias de E. coli e os correspondentes recombinantes de fago podem então ser analisados para aqueles que produzem os fragmentos Fab desejados.

As composições contendo molécula de anticorpo empregues no presente invento podem ter a forma de soluções ou suspensões. A preparação de uma composição que contém moléculas de anticorpo como ingredientes activos é bem compreendida na arte. Tais composições são tipicamente preparadas como soluções ou suspensões líquidas, contudo, podem também ser preparadas formas sólidas adequadas para solução, ou suspensão em líquido. A preparação pode também ser emulsionada. O ingrediente terapêutico activo é frequentemente misturado com excipientes que não interfiram no ensaio e que são compatíveis com o ingrediente activo. São excipientes adequados, por exemplo, a água, solução salina, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Além disso, se desejado, a composição pode conter quantidades menores de substâncias auxiliares tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes de PH e semelhantes, que aumentam a eficácia do ingrediente activo.

Uma composição de molécula de anticorpo pode ser formulada numa forma de sal aceitável, neutralizada. Os sais aceitáveis incluem os sais de adição de ácido que são formados com ácidos inorgânicos tais como, por exemplo, os ácidos clorídrico ou fosfórico, ou com ácidos orgânicos tais como o acético, tartárico, mandélico e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem também ser derivados de bases inorgânicas tais como, por exemplo, os hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico, e com bases orgânicas tais como a isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína e semelhantes.



Exemplos

Os exemplos seguintes são apresentados apenas com a finalidade de ilustrar e não de limitar o invento.

1. Isolamento de GPIIb-IIIa

O procedimento seguinte permite a preparação em larga escala de proteínas da membrana de plaquetas a partir de plaquetas lisadas.

Reagentes:

Tampão de Tyrode Modificado:

		<u>Concentração Final</u>
50 ml	Tampão de Tyrode 10x	1x
0,5 g	BSA cristalina (Sigma cat. #A-4378)	1 mg/ml
0,5 g	dextrose (d-glucose)	1 mg/ml
0,58 g	HEPES	10 mM
0,5 ml	CaCl ₂ 1 M	1 mM
2,5 ml	MgCl ₂ 200 mM	1 mM
perfazer 500 ml com H ₂ O, e pH 6,5 com HCl		

Tampão de Tyrode 10X:

160 g	NaCl	1,5 M
20,3 g	NaHCO ₃	
3,9 g	KCl	
Dissolver em 2 litros de H ₂ O duplamente destilada		

Tampão de Lise:

0,348 g	HEPES	10 mM
4,8 g	NaCl	0,15 mM
4,42 g	Beta-Octilglucósido	50 mM
0,3 ml	CaCl ₂ 1 M	1 mM
2 ml	MgCl ₂ 200 mM	1 mM
2 ml	PMSF 150 mM em EtOH	1 mM
60 µl	leupeptina 50 mM	10 mM
0,3 g	NEM (N-etilmaleimida)	1 mg/ml
Perfazer 300 ml de volume com H ₂ O. Ajustar o pH a 7,4.		

As embalagens de plaquetas de um banco de sangue são transferidas para tubos cónicos de 50 ml, descartáveis, (Falcon), equilibrados e centrifugados em Sorvall RT-6000 a 800 rpm (x g) durante 10 minutos a 22°C para transformar em pelotas os RBC. Os sobrenadantes são transferidos para tubos cónicos de 50 ml limpos e centrifugados a 2300 rpm durante 20 minutos a 22°C. O sobrenadante é transferido para a garrafa que pode ser levada a autoclave para rejeição. Utilizando uma pipeta de 25 ml de plástico e Tampão de Tyrode Modificado, as pelotas de plaquetas são ressuspensas em metade do volume original e de novo centrifugadas a 2300 rpm durante 20 minutos a 22°C. As pelotas são ressuspensas em Tampão de Tyrode Modificado como anteriormente, e centrifugadas de novo a 2300 rpm durante 20 minutos a 22°C. A pelota de plaquetas é ressuspensa em Tampão de Lise (2 ml/embalagem de plaquetas), centrifugada em ultracentrifuga (rotor de centrifuga SW 41) durante 20 minutos a 20 000 rpm a 4°C, e o sobrenadante é recolhido e congelado. Cuidado: As plaquetas não se devem deixar entrar em contacto com vidro e devem ser sempre mantidas à temperatura ambiente para evitar a agregação.

A GPIIb-IIIa dos lisados de plaquetas é purificada pelo procedimento seguinte:

Reagentes

Tampão de coluna de cromatografia de afinidade com RGD:

0,348 g	HEPES	10 mM
4,8 g	NaCl	0,15 M
2,2 g	Beta-Octilglucosido	25 mM
0,3 ml	CaCl ₂ 1 M	1 mM
1,5 ml	MgCl ₂ 200 mM	1 mM
2 ml	PMSF 150 mM em EtOH	1 mM
60 µl	leupeptina 50 mM	10 µM
0,3 g	NEM (N-etilmaleimida)	1 mg/ml

Perfazer o volume até próximo de 300 ml com H₂O, o pH até 7,4, depois ajustar o volume a 300 ml.

Ou utilizar HEPES/NaCl pré-preparado

Colunas de F7F-Sepharose:

F7F-Sepharose: KYGRGDS-Sepharose (SEQ ID N° 15), 10 mg de KYGRGDS/ml de Sepharose activada com CNBr. Carregou-se 1 ml de F7F-Sepharose por coluna em colunas descartáveis de 7 ml da Evergreen Scientific.

Foi empregue o procedimento cromatográfico seguinte: as colunas de 8,1 ml de F7F-Sepharose foram equilibradas com 10 ml de Tampão de Lise por coluna. As colunas foram deixadas escoar até a superfície da F7F-Sepharose estar quase exposta, depois foi aplicado 1 ml de Lisado de Plaquetas (1 ml de Lisado de Plaquetas - 1 embalagem de plaquetas).

A coluna foi escoada até a cor amarela do Lisado de Plaquetas atingir o fundo da coluna, taparam-se ambas as extremidades da coluna e inverteu-se durante a noite a 4°C e recolheu-se o líquido que se escoou. As colunas foram lavadas com 10 ml de cada Tampão de Coluna e as lavagens foram recolhidas. A coluna foi eluída com 2 ml por coluna de GRGDSP a 1 mg/ml (SEQ ID N° 12) em Tampão de Coluna seguidos por 2 ml de Tampão de Coluna. Foram recolhidas e reunidas fracções de um ml. A concentração de GPIIb-IIIa purificada recolhida foi determinada pela sua absorvância a 280 nm.

2. Preparação das Composições de Anticorpo Monoclonal

Os anticorpos monoclonais que imunorreagem com um sítio de ligação de receptor na fibronectina foram produzidos utilizando a tecnologia padrão de hibridoma com as excepções registadas. Em resumo, dois ratinhos Balb/c foram quatro vezes imunizados intraperitonealmente a intervalos de uma semana com doses crescentes (1 mg, 10 mg, 25 mg, 50 mg e 100 mg, respectivamente) de imunogénio consistindo numa mistura constituída por GPIIb-IIIa isolada por afinidade, como preparado no Exemplo 1 (1,25 mg/ml) e Fibronectina a 3 mg/ml. O imunogénio foi diluído a 1:1 em Adjuvante Completo de Freund para a primeira imunização, em Adjuvante Incompleto de Freund para a segunda e terceira imunizações e em solução salina normal para a quarta. Três dias



após a quarta imunização foram isolados cerca de 1×10^8 linfócitos a partir dos baços dos dois ratinhos, misturados numa suspensão e fundidos com 5×10^7 células de mieloma de ratinho P3X63AG8.053 utilizando PEG 1500 a 50% como o promotor de fusão celular. As células produtoras de anticorpo (hibridomas) transformadas (fundidas) resultantes foram inicialmente transferidas para placas de microtitulação de 96 cavidades a uma densidade de cerca de 1×10^6 células por cavidade e cultivadas em meios HAT selectivos.

Os sobrenadantes de cultura de tecido de cerca de 2000 cavidades que parecem conter células de hibridoma resistentes a HAT viáveis após 8 dias de cultura foram analisados no ensaio ELISA quanto à presença de moléculas de anticorpo que imunorreagem com a fibronectina. Os hibridomas isolados foram então subclonados duas vezes a diluições limitantes para proporcionar cerca de 1 célula por cavidade e 24 das culturas de hibridoma resultantes mostraram ser de origem monoclonal com base em dois critérios: (1) cada sobrenadante era de focos de uma única célula e imunorreagiu com a fibronectina na análise ELISA (2) cada sobrenadante continha um único isotipo de imunoglobulina quando analisado utilizando o "Mouse Ig Screening" e o "Isotyping Kit" de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, Boehringer-Mannheim Biochemicals, Indianapolis, Indiana. Os sobrenadantes positivos foram analisados quanto à sua capacidade para inibir a ligação da ^{125}I -fibronectina às células de microtitulação revestidas com GPIIb-IIIa. Os sobrenadantes positivos foram analisados desta forma para cada subclonagem dos hibridomas. As moléculas de anticorpo monoclonal foram preparadas por isolamento das moléculas de anticorpo a partir dos fluídos de ascíticos de um ratinho utilizando proteína A-Sepharose tipicamente obtida a partir de Pharmacia Inc. (Piscataway, NJ) e utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. A concentração de proteína das composições de molécula de anticorpo isoladas foi determinada quando necessário utilizando o "Bio-Rad Protein Assay Kit" (Bio-Rad, Richmond, CA) de acordo com as instruções do fabricante.



Para preparar uma composição de anticorpo monoclonal contendo moléculas de anticorpo marcadas com ^{125}I , foram misturados 350 microlitros (μl) de PBS (NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,09) contendo 1 miligrama por mililitro (mg/ml) das moléculas de anticorpo isoladas acima com 40 microgramas (μg) de cloramina-T e 1 milicurie (mCi) de Na^{125}I isento de veículo (Amersham, Arlington Heights, IL). A mistura resultante foi mantida durante 5 minutos a aproximadamente 20°C e depois misturada com 20 μl de uma solução de metabissulfito de sódio a 2 mg/ml (2 mg/ml) e 20 μl de uma solução de iodeto de potássio. Em seguida, foram misturados 800 μl de PBS contendo BSA a 1% seguidos por mais mistura de fluorofosfato de diisopropilo até uma concentração final de 10 mM. A mistura resultante foi mantida durante 60 minutos a 22°C e depois dialisada contra PBS. A actividade especifica das moléculas de anticorpo marcadas com ^{125}I resultantes foi de cerca de 4,5 microCurie (μCi) por μg .

As composições contendo fragmentos de Fab das moléculas de anticorpo isoladas acima foram preparadas por digestão com papaína (200:1 peso em peso de Ig para papaína) durante 6 horas a 37°C seguindo os processos de Mage *et al.*, Methods in Enzymology, 70:142-150 (1980). Os fragmentos de Ig e Fc não digeridos foram removidos por cromatografia em proteína A-Sepharose. As composições contendo fragmentos de Fab, resultantes, estavam então prontas para utilização ou foram marcadas com ^{125}I , quando necessário, utilizando os mesmo procedimentos que os descritos acima para as composições de anticorpo monoclonal.

3. Ensaio ELISA

a. ELISA para Analisar Anticorpos Monoclonais

As moléculas de anticorpo contidas nos sobrenadantes de cultura de hibridoma foram examinadas quanto à sua capacidade para imuno-reagirem com a fibronectina. Misturaram-se cinquenta microlitros (μl) de solução de revestimento (NaHCO_3 0,1M, pH 8,0, NaN_3 a 0,1%) contendo 10 mg/ml de fibronectina isolada, nas

paredes das placas de microtitulação de 96 cavidades de fundo plano (Immulon 2; Dynatech Laboratories, Chantilly, VA). As placas foram então mantidas durante 60 minutos a 37°C para permitir a adsorção da fibronectina nas paredes das cavidades. A solução de revestimento foi removida por agitação, as cavidades foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem (Tris-HCl 10 mM a pH 7,4, TWEEN-20 a 0,05% (v/v), NaCl 0,15M e 200 mg/ml de mertiolato) e misturaram-se em cada cavidade (suporte sólido) 200 µl de solução de bloqueio (albumina do soro de bovino a 5% (BSA; p/v) em solução de revestimento) para bloquear o excesso de sítios de proteína.

As cavidades foram mantidas durante 60 minutos a aproximadamente 37°C e depois removeu-se a solução de bloqueio. Adicionaram-se a cada cavidade cerca de 50 µl de sobrenadante de cultura de hibridoma diluído a 1:1 em tampão de diluição que consiste em BSA a 0,1% (p/v) em tampão de lavagem para formar uma mistura de imunorreacção. As misturas de imunorreacção em fase sólida/líquida, resultantes, foram mantidas à temperatura ambiente durante 60 minutos para permitir a formação de um primeiro complexo fibronectina-ligando ligado à fase sólida e misturaram-se os anticorpos. As fases sólida e líquida foram então separadas, as cavidades foram lavadas duas vezes com tampão de lavagem e o excesso de líquido foi removido por agitação.

Misturaram-se em cada cavidade cinquenta µl de uma solução contendo IgG de cabra anti-ratinho marcada com peroxidase de rábano silvestre (Tago Inc., Burlingame, CA) diluída a 1:1000 em tampão de diluição para formar uma segunda mistura de imunorreacção em fase sólida-líquida (mistura de imunorreacção de marcação). As cavidades foram mantidas durante 60 minutos à temperatura ambiente para permitir a formação de um segundo produto de imunorreacção entre o anticorpo marcado e um qualquer anticorpo ligado à fase sólida do primeiro produto de imunorreacção e depois lavadas duas vezes com tampão de lavagem para isolar os produtos de imunorreacção contendo marcador ligado à fase sólida. Os excesso de líquido foi então removido das cavidades.



Foram então misturados a cada cavidade cinquenta μl de solução de substrato cromogénico recentemente preparada contendo 4,0 mg/ml de O-fenilenodiamina e peróxido de hidrogénio a 0,012% (v/v) em tampão CP (243 μl de ácido cítrico 0,1 M e 250 μl de fosfato de sódio dibásico 0,2 M por litro de H_2O , pH 5,0) para formar uma mistura de reacção de revelação de cor. Após manutenção da mistura de reacção de revelação de cor durante 10 minutos a aproximadamente 20°C, misturaram-se em cada cavidade 50 μl de H_2SO_4 2N para parar a reacção de revelação e as soluções resultantes foram analisadas quanto à absorvância ao comprimento de onda de 490 nanómetros (nm) utilizando um leitor de placas ELISA Modelo 310 (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT).

Considerou-se que as composições de molécula de anticorpo continham moléculas de anticorpo antifibronectina imunorreactivas se a absorvância medida a 490 nm (A490) fosse, pelo menos, 6 vezes acima da de fundo i.e., acima de cerca de 0,3 unidades de densidade óptica quando medida a A490.

4. Análise da Inibição por Mab da Interação Fn-GPIIb-IIIa

Utilizou-se o ensaio em cavidade de microtitulação seguinte para a ligação da fibronectina marcada com ^{125}I a GPIIb-IIIa:

As cavidades de microtitulação removíveis foram revestidas com GPIIb-IIIa purificada por afinidade com RGDS (50 μl > 10 mg/ml) a 4°C. As cavidades foram bloqueadas por esvaziamento do GPIIb-IIIa e incubação das cavidades em 150 μl de BSA a 5% durante 1-2 h à temperatura ambiente. Foram pré-incubados 25 μl de fibronectina marcada com ^{125}I 25 nM (concentração final na cavidade de 12,5 nM) em Tyrodes Modificado 2 X com 25 μl de sobrenadante de cultura de hibridoma diluído a 1:1 em Tris-HCl 10 mM (pH 8) durante 30 minutos a 37°C num tabuleiro de cavidades de microtitulação separado. As cavidades de microtitulação revestidas com GPIIb-IIIa e bloqueadas foram lavadas 4 vezes com Tampão de Tyrodes Modificado. A solução de sobrenadante de ^{125}I -fibronectina foi transferida para as cavidades revestidas com GPIIb-IIIa e incubada à temperatura ambiente durante 4 h. As cavidades foram lavadas 4 vezes com 200 μl de Tyrodes Modificado.

As cavidades vazias foram contadas num contador gama e determinada a cpm/cavidade.

5. Preparação e Isolamento das Proteínas de Fusão de Fragmento Fn-MBP

Foram empregues dois plasmídeos que codificam MBP, pPR734 e pIH 821 como vectores na expressão das presentes proteínas de fusão GPIIIa-MBP em E. coli. A região MBP da proteína fundida permite a rápida purificação do produto fundido de outras proteínas celulares. Os vectores foram construídos através de técnicas bem conhecidas seguindo os procedimentos descritos abaixo.

A. Construção do Vector MBP

Um clone de ADNc contendo a sequência completa de fibronectina (Fn) é descrito por Obara et al., Cell, 53:649 (1988) e foi fornecido pelo Dr. Yamada, um autor da publicação. O clone de ADNc fornecido foi submetido a digestão por endonuclease de restrição com PvuII e os fragmentos digeridos resultantes foram ligados nas extremidades rombas por ligadores EcoRI para adaptar os fragmentos digeridos de forma a conterem terminais EcoRI. Os fragmentos adaptados foram então digeridos com PstI para clivar aqueles fragmentos susceptíveis a PstI (inactivando, assim, os fragmentos clivados por PstI para ligação num sítio EcoRI). O vector de proteína de fusão de ligação de maltose pIH821 (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA) e os fragmentos adaptados foram digeridos com EcoRI para produzir terminais coesivos EcoRI e o fragmento Fn foi ligado no vector utilizando ADN ligase de T4 para formar uma construção de fusão tendo o fragmento de gene que codifica Fn clonado operativamente ligado ao fragmento de gene que codifica MBP capaz de expressar uma proteína de fusão Fn-MBP. O fragmento PvuII contém a região de Fn correspondente aos polipéptidos P8-P9, nomeadamente, os resíduos 1255-1456. Esta construção é designada por MBP/III8+9.

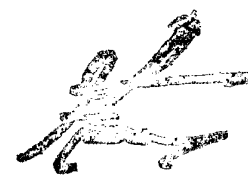
Os vectores pIH821 e pPR734 estão representados na Figura 5



e foram obtidos em New England Biolabs (Beverly, MA). Os vectores têm cada um um *malE* ligado através de um poliligador a um gene *lac Z*. O pIH821 é idêntico ao pPR734 com a excepção de que o pIH821 tem uma deleção da sequência de sinal *malE* 2-26, o que facilita a exportação da proteína de fusão para o periplasma. Os vectores têm, cada um, um promotor *tac* (Ptac) a montante do gene *malE*. Um gene supressor *lac I^Q* imediatamente a montante do promotor *tac* permite a supressão da actividade de expressão até o IPTG (isopropil- β -D-tiogalactósido) ser utilizado para induzir a expressão. A estrutura remanescente do vector é de *Aval* (preenchido) a *Eco R1* (preenchido) de pKK233-2 (Pharmacia, Piscataway, NJ).

Os componentes importantes do sistema de expressão de fusão de proteína de ligação à maltose (sistema de expressão de MBP) são o promotor (PtacII) previamente descrito por Amann *et al.*, *Gene*, 25:167-178 (1983); a proteína de ligação à maltose-*lacZ α* e o gene de fusão (*malE-LacZ α*) previamente descrito por Guan *et al.*, *Gene*, 67:21-30 (1987); o terminador de transcrição ribossómico *rrn B* previamente descrito por Brosius *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6929-6933 (1984) e disponível comercialmente nos vectores pIH821 e pPR734 (New England Biolabs, Beverly, MA) e no pKK223-3 e pKK233-2 (Pharmacia, Piscataway, NJ). O sistema de expressão MBP contém opcionalmente o gene que codifica o gene repressor *lac* (*lac I*) previamente descrito por Farabaugh, *Nature*, 274:765-769 (1978). Se o gene *lac I* não estiver presente no vector de expressão ele pode ser fornecido em *trans* utilizando as estirpes bacterianas que expressam o repressor *lambda* tal como JM101, JM105, JM107, JM109 (ATCC #33323) e JM110 (ATCC #47013) descritos por Yanisch-Perron *et al.*, *Gene*, 33:103 (1985) que estão comercialmente disponíveis em Stratagene (La Jolla, CA).

Os segmentos de ácido nucleico individuais que contêm os componentes deste sistema de expressão são operativamente ligados em conjunto (ligados) utilizando técnicas padrão de biologia molecular, tais como aquelas escritas em *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Sambrook *et al.*, eds, Cold



Spring Harbor Laboratories, NY (1989). Quando necessário, a estrutura de leitura dos vários componentes é ajustada utilizando ligadores sintéticos, várias reacções de preenchimento ou várias exonucleases. Adicionalmente, são facilmente realizadas várias deleções e ajustes na estrutura de leitura utilizando a mutagenese "loop-out" e os conjuntos de mutagenese disponíveis comercialmente tais como o conjunto de mutagenese de Bio Rad Laboratories (Richmond, CA).

Cada um dos componentes do sistema de expressão, requeridos, será agora descrito em detalhe. O promotor Ptac II, previamente descrito por Amann et al., Gene, 25:167-178 (1983), pode ser isolado a partir de um certo número de vectores disponíveis tais como PKK 223-3 (Pharmacia), pIH821 e pPR734 (New England BioLabs, Beverly, MA), Ptac II (ATCC #37245) e Ptac 12 (ATCC # 37138) descritos por Amann et al., Gene, 25:167-178 (1983). Por exemplo, o promotor Ptac II pode ser isolado utilizando endonucleases de restrição de Ptac II utilizando Eco RI e Hind III ou ClaI e Hind III.

O gene de fusão de proteína de ligação de maltose-lacZ α (malE-lacZ α) previamente descrito por Guan et al., Gene, 67:21-30 (1987) contém o gene malE num fragmento de endonuclease de restrição Hinf I isolado a partir do cromossoma de uma E. coli tal como HB101 (ATCC #33694) ou E. coli de tipo selvagem K12. O gene malE foi sequenciado por Duplay et al., J. Biol. Chem., 259:10606-10613 (1984) e, por consequência podem ser facilmente sintetizadas sondas específicas para o gene malE que permitem o isolamento do gene malE a partir da E. coli utilizando protocolos de clonagem comuns. Alternativamente, o gene malE pode ser quimicamente sintetizado em segmentos e estes segmentos ligados utilizando ADN-ligase de T4 para produzir o gene malE. A proteína de ligação de maltose madura (o produto de gene malE) é codificada pelos codões 28-342 da sequência do gene malE como descrito por Duplay et al., J. Biol. Chem., 259:10606-10613 (1984). O vector de expressão pode conter ou o gene malE completo que codifica a sequência de comando de proteína de ligação de maltose de 27 aminoácidos e os codões 28 a 392 que codificam a proteína de



ligação de maltose madura ou só a porção do gene malE que codifica a proteína de ligação de maltose madura.

O resto do gene de fusão de proteína de ligação de maltose-lacZ α contém a porção do gene lacZ que codifica o péptido alfa (α) mais curto do gene lac (aproximadamente 107 aminoácidos de comprimento). Este gene lacZ pode ser isolado de pUC 19 descrito por Yanisch-Perron *et al.*, Gene, 33:103-119 (1985) e está disponível comercialmente. O gene lacZ e o gene malE são ligados em conjunto utilizando um ligador que pode ter, opcionalmente, várias sequências de reconhecimento de endonuclease de restrição úteis.

O terminador de transcrição ribossômica rrn B previamente descrito por Brosius *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6929 (1984) e Brosius *et al.*, Plasmid, 6:112-118 (1981). Os terminadores de transcrição ribossômicas rrn B podem ser facilmente isolados a partir de vectores disponíveis, tais como PEA300 (ATCC # 37181), PKK 223-3 e PKK 233-2 (Pharmacia) e pIH821 e pPR734 (New England Biolabs). Por exemplo, o terminador de transcrição ribossômica rrn B pode ser isolado a partir de PKK223-3 utilizando as endonucleases de restrição Hind III e Pvu I.

O gene lacI que codifica a proteína repressora lambda foi sequenciado por Farabaugh, Nature, 274:765 (1978). Adicionalmente, o gene lacI está em vários vectores disponíveis, tais como o pBluescript II KS e pBluescript SK (Stratagene); e pUC 18 e pUC 19 (Pharmacia). O gene lacI pode ser isolado a partir destes vectores utilizando endonucleases de restrição e técnicas comuns de biologia molecular. O gene lacI pode estar presente no vector de expressão ou estar presente nas bactérias nas quais cresce o vector de expressão.

O sítio de clonagem múltiplo presente no vector de expressão entre os genes malE e lacZ é mostrado na Tabela 1 e registado no Registo de Sequência como SEQ ID N° 14.

Tabela 1

Sequência do Poliligador no Sistema de Expressão

Sac I Kpn I Eag I BamH I
maleE TCG AGC TCG GTA CCC GGC CGG GGA TCC ATC GAG

Stu I Eco RI
GGT AGG CCT GAA TTC AGT AAA ACC CTC GAT
Sítio de clivagem do factor X

BamH I Xba I Sal I Pst I Hind III
GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TTG lacZ@

Delecção da Sequência de Sinal maleE (Fig. 5):

codão de início maleE
ATG(D2-26)AAA ATC maleE ...

delecção dos codões 2-26 (sequência de sinal)

O sítio de clonagem múltiplo (poliligador) contém um segmento de ácido nucleico que codifica um sítio de clivagem de factor Xa localizado entre os genes maleE e lacZ. Qualquer proteína de fusão de proteína de ligação de maltose produzida por este vector pode ser clivada no sítio de clivagem do factor Xa facilitando assim a purificação da proteína desejada.

Os genes estranhos podem ser inseridos (ligados operativamente) na sequência de clonagem múltipla nos sítios de endonuclease de restrição Sac I, Kpn I, Eag I ou Bam HI.

B. Expressão da Proteína de Fusão

Descreve-se uma experiência em pequena escala para determinar o comportamento de uma proteína de fusão MBP particular. Este protocolo resulta em três fracções de extrato em



bruto; um extrato de células totais em bruto, uma suspensão do material insolúvel do extrato em bruto e uma fracção periplásmica preparada pelo procedimento de choque osmótico em frio. Inocular 80 ml de caldo de cultura rico + glucose & amp (por litro, 10 g de Triptona, 5 g de extrato de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de glucose, autoclave, adicionar ampicilina a 100 µg/l) com células contendo o plasmídeo de fusão produzido, acima designado por MBP/III 8 + 9. Deixar crescer a 37°C com bom arejamento até 2×10^8 células/ml. Retirar uma amostra de 1 ml e centrifugar durante dois minutos numa microcentrifuga (células não induzidas). Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 100 µl de tampão de amostra de SDS-PAGE. Agitar em vortex e colocar em gelo.

Adicionar IPTG (isopropiltiogalactósido) à cultura remanescente para se obter uma concentração final de 0,3 mM, por exemplo, 0,24 ml de um concentrado 0,1 M em H₂O. Continuar a incubação a 37°C durante 2 horas. Descartar uma amostra de 1 ml e centrifugar durante 2 minutos numa microcentrifuga (células induzidas). Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 150 µl de tampão de amostra de SDS-PAGE. Agitar em vórtex para ressuspender as células e colocar em gelo. Pontos no tempo adicionais a 1 e 3 horas podem ser úteis na tentativa de decidir quando colher as células para uma preparação em grande escala.

Dividir a cultura em duas aliquotas e colher as células por centrifugação a 4000 x g durante 10 minutos. Descartar o sobrenadante e ressuspender uma pelota (amostra A) em 5 ml de fosfato de sódio 10 mM, NaCl 30 mM, Tween 20 a 0,25%, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM (Sigma E 4378), pH 7,0. Ressuspender a outra pelota (amostra B) em 10 ml de Tris-HCl 30 mM, sacarose a 20%, pH 8,0 (9 ml para cada 0,1 g de peso em húmido de células). (Os tampões especificados contém fosfato de sódio, pH 7,0. Os tampões originais utilizados na purificação por afinidade da MBP utilizam Tris-HCl pH 7,2. Contudo, o Tris é um tampão muito fraco a pH 7,2, tornando difícil obter tampões previsíveis por diluição de soluções de concentrado, concentradas. Os dois tampões dão excelentes resultados e outros tampões neutros também podiam,

provavelmente, funcionar).

Congelar a Amostra A num banho de gelo seco-etanol (ou durante a noite a 20°C) depois descongelar em água fria. Sonicar a amostra e monitorizar a quebra de células medindo a libertação de proteína utilizando o ensaio Bradford ou A_{280} , até alcançar um máximo. Centrifugar a 9 000 x G durante 20 minutos. Decantar o sobrenadante (extracto em bruto 1) e mantê-lo em gelo. Ressuspender a pelota em 5 ml de fosfato de sódio 10 mM, Tween 20 a 0,25%, NaCl 30 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, pH 7,0. Isto é uma suspensão da matéria insolúvel (extracto em bruto 2). A razão para a preparação dos três extractos diferentes nesta experiência piloto é a de observar que a fusão 1) forma corpos de inclusão insolúveis, ou 2) é exportada para o espaço periplásmico. Se a proteína de fusão for insolúvel, o protocolo deve ser modificado para produzir proteína solúvel (ver abaixo). Se a fusão for eficazmente exportada, devia-se considerar a preparação de uma fracção periplásmica como alternativa à preparação de um extracto celular em bruto. A preparação de um extracto periplásmico dá uma purificação substancial por si própria.

Adicionar EDTA a 1 mM de Amostra B e incubar durante 5-10 minutos à temperatura ambiente com agitação ou mistura. Centrifugar a 4°C, remover todo o sobrenadante e ressuspender a pelota em 10 ml de $MgSO_4$ 5 mM gelado. Agitar ou misturar durante 10 minutos num banho de gelo. Centrifugar a 4°C. O sobrenadante é o fluido de choque osmótico frio.

Adicionar 5 μ l de tampão de amostra de SDS-PAGE 2X a 5 μ l dos extratos em bruto 1 & 2 e 10 μ l de tampão de amostra de SDS-PAGE 2X a 10 μ l do fluido de choque osmótico frio. Ferver estas amostras, juntamente com as amostras de células não induzidas e induzidas, durante 5 minutos. Centrifugar numa microcentrifuga durante 2 minutos. Carregar 20 μ l das amostras de células não induzidas e induzidas e todas as amostras do extracto num gel de SDS-PAGE a 10%. Pode-se operar, opcionalmente, com gel(es) de SDS-PAGE idêntico(s) utilizando diluições das amostras anteriores a 1:5, preparar uma transferência de Western e revelar



com soro anti-MBP e, se disponível, com soro imuno específico para a porção clonada da proteína de fusão. Pode ser desejável uma outra experiência piloto para otimizar a exportação da proteína de fusão, i.e. encontrar a melhor temperatura (23°, 30° ou 37°C) e nível IPTG e o melhor tempo para colher as células. Se a proteína de fusão for uma matéria insolúvel, assegurar que as células são completamente quebradas. Se for ainda insolúvel, tentar extrair a pelota com Triton X-100 a 0,2%, EDTA 1 mM algumas vezes; muitas vezes a proteína não é verdadeiramente insolúvel mas está apenas associada a fragmentos de membrana na pelota celular. Se for este o caso, ter em atenção que, para algumas fusões, o Triton interfere com a ligação à coluna. Se a proteína for verdadeiramente insolúvel, modificar as condições de crescimento de células para tentar produzir uma proteína de fusão solúvel. São três as mudanças que tem ajudado em casos prévios i) mudar para um fundo de estirpe diferente, ii) deixar crescer as células a 23°C ou 30°C e iii) induzir com IPTG 0,01 mM para dar níveis de expressão mais baixos (Takagi et al., Biotechnology, 6:948 (1988)).

C. Purificação da Proteína de Fusão

(1) Preparação da Resina de Amilose Reticulada

Para 300 ml de resina, colocar 10 g de amilose (Sigma, N° de Catálogo A-7043), 40 ml de H₂O e uma barra de agitação numa proveta de 1000 ml e aquecer a 50°C com agitação. Numa campânula de exaustão, adicionar 60 ml de NaOH 5 N, depois 30 ml de epicloro-hidrina (Sigma, N° de Catálogo E-4255), com agitação rápida. A suspensão irá aquecer por gelificação. Continuar a agitação até a suspensão formar um gel sólido, cerca de 10 minutos (deve ficar um pouco amarela). Deixar arrefecer até à temperatura ambiente (cerca de 45 minutos - 1 hora) depois cortar o gel em pedaços e lavar três vezes com 1000 ml de H₂O. Transferir o gel para um misturador Waring e fragmentar o gel durante cerca de 3-5 s. Lavar duas vezes com 1000 ml de glicina-HCl 50 mM, NaCl 0,5 M, pH 2,0, e rejeitar os finos entre as lavagens.

as lavagens.

Lavar 3 vezes com água (mantendo a rejeição dos finos), depois três vezes com fosfato de sódio 10 mM, pH 7,0. Suspende o gel em fosfato de sódio 10 mM, azida de sódio a 0,02%, pH 7,0 e armazenar a 4°C. Bloquear os sítios não específicos da resina por lavagem em 1000 ml de leite seco não gordo a 3% durante a noite a 4°C.

(2) Cromatografia de Afinidade

Seguem-se os protocolos para a purificação em grande escala de uma proteína de fusão híbrida.

Inocular 1 litro de caldo de cultura rico, glucose e ampicilina (por litro, 10 g de Triptona, 5 g de extracto de levedura, 5 g de NaCl, 1 g de glucose, autoclave, adicionar ampicilina até 100 µg/ml) com células contendo o plasmídeo de fusão. Deixar crescer até 2×10^8 células/ml (A_{600} de 0,4). Adicionar IPTG até uma concentração final de 0,3 mM, por exemplo 85 mg ou 3 ml de um concentrado 0,1 M em H₂O. Incubar as células a 37°C durante 1-3 horas. (O período de tempo necessário para permitir a expressão depende do hospedeiro utilizado e do facto da proteína de híbrido ser instável, e devia ser determinado empiricamente). Colher as células por centrifugação a 4000 x g e ressuspender em 50 ml de fosfato de sódio 10 mM, NaCl 30 mM, Tween 20 a 0,2%, β-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 10 mM, EGTA 10 mM, (Sigma, Numero de Catálogo E 4378), pH 7,0. Congelar a amostra num banho de gelo seco-etanol (ou durante a noite a 20°C) e descongelar em água fria. Sonicar e monitorizar a quebra de células, medindo a libertação de proteína por utilização do ensaio Bradford ou A_{280} , até alcançar um máximo. Centrifugar a 9000 x g durante 30 minutos. (Para muitas proteínas instáveis, a maior parte da degradação ocorre durante a colheita e quebra de células. Por consequência, é preferível realizá-lo rapidamente e manter as células arrefecidas. Os cinquenta ml de tampão de lise são baseados na expectativa de cerca de 5 gramas de células/litro, i.e., 10 ml para cada grama de células (peso em húmido)).



O EGTA serve para auxiliar a inibir as proteases que têm um cofactor Ca^{++} . A adição de PMSF (fluoreto de fenilo-metilsulfonylo) e de outros inibidores da protease pode ser tentada numa base de caso para caso. O β -mercaptoetanol é incluído para impedir a formação de ligações dissulfureto intercadeias após a lise (as ligações dissulfureto não se formam normalmente intracelularmente em E. coli) se a proteína for sensível a EGTA, NaCl 0,5 M ou mercaptoetanol, ajustar o tampão de acordo com isso.

Verter a resina de amilose reticulada num balão de Erlenmeyer e deixá-la repousar. Lavar a resina, pelo menos num volume igual de tampão de coluna + Tween 20 a 0,25% algumas vezes; tampão de coluna = fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,5 M, pH 7,0 (opcional: β -mercaptoetanol 10 mM, EGTA 1 mM). Verter uma coluna de cerca de 40-200 ml de resina por cada litro de cultura e lavar a coluna com 3 volumes de coluna do mesmo tampão. (A quantidade de resina depende da resina e da quantidade de proteína de híbrido produzida. A resina artesanal liga-se a cerca de 0,5 até 1 mg/ml de volume de leite, assim para um rendimento de 40 mg/l são necessários 80 ml de coluna. Porque são fracas as propriedades de escoamento da resina artesanal, uma coluna curta larga funciona melhor. A forma da coluna é menos importante para esta resina visto que está na forma de esferas; as razões de altura para diâmetro da coluna de 4 funcionam bem).

Diluir os extracto em bruto a 1:5 com tampão de coluna + Tween 20 a 0,25%. Carregar o extracto em bruto diluído a um caudal de fluxo de $[10 \times (\text{diâmetro da coluna em cm})^2]$ ml/h. Isto é de cerca de 1 ml/min para uma coluna de 2,5 cm. A diluição do extracto em bruto é desejada para reduzir a concentração de proteínas para cerca de 2,5 mg/ml. Uma boa regra de prática é a de que 1 g de peso em húmido de células dá cerca de 120 mg de proteína.

O extracto em bruto pode ser passado duas vezes através da coluna para assegurar que todo o híbrido MBP está ligado à coluna, mas na maior parte dos casos toda a fusão que é

competente para se ligar fá-lo no primeiro passo. A proteína de fusão pode também ser introduzida na resina em cargas, por incubação do extracto em bruto e da resina a 4°C durante 2-76 h com agitação suave. Lavar com 3 volumes de colunas de tampão de coluna + Tween 20 a 0,25% depois lavar com 5 volumes de coluna de tampão de coluna sem Tween 20. Eluir a proteína híbrida com fosfato de sódio 10 mM, NaCl 0,5 M, maltose 10 mM, pH 7,0 (opcional: β -mercaptoetanol 10 mM, EGTA 1 mM). Recolher 10-20 fracções cada uma = a de 1/5 até 1/10 do volume de coluna e analisar as fracções quanto à proteína, por exemplo, pelo ensaio Bradford ou A₂₈₀; as fracções contendo o híbrido MBP devem ter proteína facilmente detectável. A proteína híbrida elui directamente após o volume vazio da coluna. Reunir as fracções contendo proteína. (Opcional) Dialisar vs. 4 x 100 volumes de Tris-HCl 10 mM, NaCl 100 mM, (opcional: EGTA 1 mM) pH 8,0 para remover a maltose. Concentrar num concentrador Amicon Centricon ou Centriprep, num concentrador de células agitadas Amicon ou no equivalente.

Se o domínio MBP for separado do péptido alvo por clivagem com FX_a e cromatografia de afinidade em amilose, dialisar para retirar a maltose da proteína híbrida. Nesta situação, a velocidade à qual o ligando é dialisado é inversamente proporcional à concentração da proteína de ligação (Silhavy et al., 1975). Por consequência, é preferível dialisar a uma concentração de proteína de fusão de 200 μ g/ml ou menos e depois concentrar a fusão.

6. Inibição da Integração Fn/Fg-GPIIb-IIIa pela Proteína de Fusão

Placas de microtitulação Immulon-2 de 96 cavidades (Dynatech-Immulon) foram revestidas com 50 μ l de GPIIb-IIIa purificado por afinidade com RGD, diluídos a 10 μ g/ml em Hepes 10 mM, NaCl 0,15 M, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1 mM.

GPIIb-IIIa:

GPIIb-IIIa Purificada por Afinidade com RGD em Tampão de

Coluna com GRGDSP:

HEPES 10 mM
NaCl 0,15 M
CaCl₂ 1 mM
MgCl₂ 1 mM
1 mg/ml de N-etilmaleimida
leupeptina 10 µM
PMSF (fluoreto de fenilmetilsulfonilo) 1 mM
Beta-Octilglucósido 25 mM
1 mg/ml de GRGDSP (SEQ ID N° 12)

Incubar o GPIIb-IIIa com a placa durante 1 hora à temperatura ambiente, depois esvaziar não ligado e bloqueá-lo com 150 µl de BSA a 5% no mesmo tampão durante 1 hora à temperatura ambiente. Lavar três vezes com 150 µl de tampão de Tyrode com HEPES 5 mM, MgCl₂ 1 mM, 1 mg/ml de dextrose, 1 mg/ml de BSA. Adicionar 50 µl de proteína de fusão ¹²⁵I (125 mg/ml) a concentração variável (4×10^{-7} a 1×10^{-10} M). Incubar 4 horas durante a noite à temperatura ambiente (com protecção de chumbo).

Remover cuidadosamente as amostras radioactivas e lavar 3 vezes com 150 µl de Tyrodes com HEPES 5 mM, MgCl₂ 1 mM, 1 mg/ml de dextrose, 1 mg/ml de BSA. Contar com um Contador Gama e eluir por ebulição em Tampão de carga de SDS-PAGE.

Numa concretização alternativa, pode ser utilizado Fg não reactiva em vez de quente e detectado por reacção com um anticorpo anti-Fg apropriado e anticorpo secundário conjugado com HRP. Utilizando esta variação, cada anticorpo é incubado com a placa lavada durante 1 h. O anticorpo anti-Fg deverá ser titulado, mas uma diluição a 1:1000 de anticorpo conjugado com HRP da maioria dos fabricantes funciona bem. A vantagem de utilizar Fg radioactiva é a de que o número de moléculas de Fg ligadas pode ser determinado com base na actividade específica. Se a quantidade de GPIIb-IIIa que adere ao plástico for também quantificada, então pode ser determinada a estequiometria da ligação.

7. Regeneração dos Polipéptidos Fn a partir da Proteína de Fusão

A clivagem com factor X_a das fusões é realizada a uma razão p/p de 1 ou 2% da quantidade de proteína de fusão. Dependendo da proteína de fusão particular, as razões de 0,1% a 5% também funcionam. A mistura reaccional pode ser incubada durante 3 horas até 1 dia, à temperatura ambiente ou a 4°C. De novo, dependendo da fusão particular, pode ser necessário desnaturar a fusão para tornar o sítio de factor X_a acessível à clivagem. Isto pode ser realizado por diálise em (ou adição de) hidrocloreto de guanidina a 6 M, depois dialisar contra o tampão de clivagem de factor X_a .

Se necessário, dialisar a proteína de fusão contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0 (= tampão de clivagem de factor X_a) e realizar uma experiência piloto com uma pequena porção da proteína. Por exemplo misturar 20 μ l de proteína de fusão a 1 mg/ml com 1 μ l de factor X_a a 200 μ g/ml.

Num tubo separado, colocar 5 μ l de proteína de fusão sem factor X_a . Incubar os tubos à temperatura ambiente. A 2, 4, 8 e 16 h retirar 5 μ l da reacção do factor X_a , adicionar 5 μ l de tampão de amostra de SDS-PAGE 2x e guardar em gelo. Preparar uma amostra de 5 μ l de proteína de fusão = 5 μ l de tampão de amostra 2x. Ferver as amostras durante 5 minutos e operar num gel de SDS-PAGE.

A experiência piloto pode ser aumentada em escala exactamente para a porção da proteína de fusão a ser clivada. Uma pequena amostra da fusão não cortada é guardada como referência e a clivagem completa por SDS-PAGE é verificada.

Para desnaturar a proteína de fusão, dialisar a fusão contra Tris-HCl 20 mM, hidrocloreto de guanidina 6 M, pH 8,0. Dialisar contra Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, pH 8,0. A diálise a passo-e-passo contra este tampão contendo quantidades decrescentes de hidrocloreto de guanidina pode impedir a precipitação da proteína de fusão. É conveniente a redução a metade da concentração de guanidina em cada passo; têm sido



descritos casos onde são necessários passos a 0,1 M.

8. Discussão dos Exemplos 1-7

De forma a identificar os sítios da fibronectina que participam na interacção com a integrina das plaquetas, GPIIb-IIIa, foram criados anticorpos anti-fibronectina e analisados quanto à sua capacidade para inibir a ligação da fibronectina ao GPIIb-IIIa altamente purificada. Os três anticorpos capazes de inibir tal interacção estão representados na Figura 4A juntamente com um anticorpo monoclonal de controlo (Mab 15). Nesta figura a dose de anticorpo adicionado é apresentada como a abcissa e a percentagem de ligação da fibronectina a GPIIb-IIIa purificada (fibronectina presente a 50 nM) está na ordenada. A Figura 4B mostra uma experiência de competição cruzada na qual os anticorpos radiomarcados são indicados acima e o anticorpo de competição "frio" é indicado abaixo. Os resultados indicam que o FnI-8 reconhece um epítopo diferente dos outros anticorpos e que FnI-11 e 16 competem cruzadamente um com o outro e, por consequência, reconhecem o mesmo epítopo.

Tabela 2

Interacções dos Mab com Polipéptidos de Fibronectina
Codificados por Fragmentos de ADNc

Seq. ID N° Base	Sequência de Resíduos da Fibronectina+	Mab*			
		8	11	12	16
3	934-1653	+	+	+	+
3	1317-1653	+	+	+	+
3	1359-1653	+	+	+	+
3	1163-1399	-	-	-	-
3	1410-1653	+	+	ND	+
3	1255-1456	+	+	+	+
3	1351-1456	+	+	ND	+
3	1378-1456	-	-	ND	-

*ND = Não determinado; 8=FnI-8; 11=FnI-11; 12=FnI-12; 16=FnI-16 (IgG Kapa)

+Kornblihtt et al., EMBO J 4:1755 (1985)

Os epítomos destes anticorpos monoclonais foram mapeados por expressão de vários fragmentos de fibronectina em bactérias que utilizam o vector de expressão procariota lambda GT11. A Tabela 2 apresenta as repetições de tipo III da fibronectina codificadas pelo ADNc. Todos os monoclonais reagiram com a proteína expressa pelo ADNc, completa, na qual a sequência RGDS na décima repetição de tipo III sofreu deleção (não mostrado). Eles reagiram também com um fragmento contendo os resíduos 1255-1456 que não contém RGDS (SEQ ID N° 12). Todos os anticorpos inibidores também reagiram com resíduos contendo deleção 1351-1456. Estes dados indicam que certos anticorpos monoclonais contra a fibronectina, que inibem a sua ligação a GPIIb-IIIa, reagem com um fragmento cujo terminal carboxilo começa pelo menos a 50 aminoácidos a montante da sequência RGDS.

Para determinar a região da fibronectina que contém os epítomos que interagem com GPIIb-IIIa e inibem a ligação da fibronectina, as bases contendo a construção que codificam o fragmento Fn 1255-1456 foi expressa como uma proteína de fusão como uma proteína de ligação de maltose num vector plasmídico. Esta proteína de fusão foi facilmente purificada numa coluna de amilose reticulada e foi avaliada a capacidade desta proteína de fusão para inibir a ligação da fibronectina à GPIIb-IIIa purificada.

Na Figura 6, uma proteína de fusão contendo os resíduos de fibronectina 1255-1456 (círculos a branco) inibiu a ligação da fibronectina ao GPIIb-IIIa purificado. Numa base ponderal, o material era cerca de quatro vezes menos potente do que a fibronectina intacta, mas tem numerosos contaminantes para além do polipéptido codificado inserido. Em comparação, a BSA ou a proteína de ligação de maltose sozinha carecem de actividade inibidora.

Para avaliar adicionalmente a natureza do material inibidor a mistura da proteína de fusão e dos produtos secundários de proteína de ligação de maltose foi passada através de uma coluna de imunoafinidade de FnI-16 monoclonal e eluída a pH baixo +



+ ureia 6 M. As fracções iniciais, de passagem através da coluna, ligada e eluída foram analisadas quanto à capacidade para inibirem a ligação da fibronectina à GPIIb-IIIa e analisadas por coloração com azul de Coomassie em SDS-PAGE e submetidas a transferência de Western com o anticorpo monoclonal FnI-16. A passagem da mistura de proteína de fusão através da coluna de anticorpo monoclonal anti-fibronectina resultou na remoção quantitativa de actividade inibidora que podia ser parcialmente recuperada no eluído de pH baixo + ureia. Em contraste, a passagem através de um anticorpo monoclonal irrelevante não teve tal efeito. A inspecção dos geles corados mostrou que o material de partida estava isento das duas bandas de maior massa molecular por passagem através da coluna de afinidade anti-fibronectina indicando que as bandas são reactivas com o anticorpo monoclonal.

Para determinar se a inserção codificava o polipéptido contendo os resíduos de fibronectina 1255-1456 ligado a GPIIb-IIIa, foi verificada a capacidade das cavidades de microtitulação revestidas com o GPIIb-IIIa purificado para ligarem preparação de proteína de fusão radiomarcada (Tabela 3). Adicionalmente, o material radiomarcado ligado à GPIIb-IIIa insolubilizada foi recuperado e analisado por SDS-PAGE seguido por radio-autografia. A proteína de fusão de Fn radiomarcada ligada à GPIIb-IIIa insolubilizada e a ligação foram específicas e inibidas pelos anticorpos monoclonais FnI-16 e EDTA. Em contraste, não houve tal ligação quando só foi empregue a proteína de ligação de maltose radiomarcada. Foi também observada a ligação específica da fibronectina, inimitável pelo anticorpo monoclonal (Mab 16.12) e EDTA (Tabela 3). Os produtos de proteína isolados eram uma mistura de polipéptidos codificados, inseridos, contendo proteína de fusão e de produtos de quebra proteína de ligação de maltose. Só aquelas bandas que continham o polipéptido codificado pelo inserido ligado à GPIIb-IIIa insolubilizada e aquela ligação foram inimitáveis por EDTA ou pelo anticorpo monoclonal FnI-16. Além disso, não foi observada qualquer ligação às cavidades revestidas com BSA. Em contraste, a proteína de ligação de maltose sózinha não conseguiu ligar-se especificamente às cavidades revestidas com GPIIb-IIIa.

Tabela 3

Interacção dos Ligandos Marcados com ^{125}I a GPIIb-IIIa

Ligando*	Inibidor	Contagens $\times 10^{-3}$
MBP/8-9	-	124
	Mab 16.12	18
	EDTA 2 mM	4
MBP	-	15
	Mab 16.12	9
	EDTA 2 mM	-4
Fibronectina	-	42
	Mab 16.12	12
	GDTA 2 mM	8

* MBP = Proteína de ligação de maltose

MBP/8-9 = Proteína de ligação de maltose/proteína de fusão 8-9

Foi também avaliada a capacidade da proteína de fusão para inibir a ligação do fibrinogénio a GPIIb-IIIa. Observou-se que a proteína de fusão era um inibidor eficaz da ligação do fibrinogénio à GPIIb-IIIa, ao passo que a proteína de ligação de maltose não era. Observou-se também que a proteína de fusão inibe a ligação do fibrinogénio (Fg) à GPIIb-IIIa (Figura 7).

Em suma, estes dados indicam directamente que o polipéptido codificado pelo inserido tem a capacidade de se ligar especificamente a GPIIb-IIIa, de inibir a ligação do fibrinogénio e da fibronectina e assim prevê-se ser um inibidor dos casos de aderência de células, tais como agregação de plaquetas. Para testar esta hipótese, foi examinada a interacção das células com a fibronectina na presença da proteína de fusão.

Assim, o facto do polipéptido codificado pelo inserido se ligar directamente ao GPIIb-IIIa indica que ele sózinho, ou em conjugação com uma sequência RGD podia ser utilizado para promover

a ligação de células em situações clínicas tais como cicatrização de feridas, implantação de próteses ou sementeira de enxertos endoteliais.

9. Caracterização dos Novos Inibidores Peptídicos da Ligação da Fibronectina e do Fibrinogénio ao Receptor da Integrina GPIIb-IIIa

Como se mostra no Exemplo 8, o fragmento de 202 resíduos de aminoácido na fibronectina (Fn) que começa num resíduo 1255 e que se prolonga até ao resíduo 1456 continha o sítio de ligação ao receptor da integrina GPIIb-IIIa. O fragmento inibiu competitivamente a ligação da fibronectina e do fibrinogénio ao receptor como mostrado no Exemplo 8. Para determinar a região de ligação de receptor mínima na sequência de 202 resíduos de aminoácido, foram gerados polipéptidos sintéticos e suas variantes e avaliados quanto à sua capacidade para se ligarem ao receptor e inibirem competitivamente a ligação do ligando marcado ao receptor. Descrevem-se abaixo as abordagens utilizadas na caracterização do sítio de ligação de receptor mínimo.

A. Preparação de Polipéptidos Sintéticos

Os polipéptidos sintéticos de vários comprimentos que abrangem a região da Fn humana que começa no resíduo de aminoácido 1255 e termina em 1456 foram preparadas na Scripps Clinic and Research Foundation Peptide Synthesis Core Facility (La Jolla, CA) utilizando a técnica em fase sólida clássica descrita por Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-296 (1969) como adaptado para utilização com um sintetizador de péptidos automático modelo 430 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Os polipéptidos-resina preparados foram clivados por fluoreto de hidrogénio, extractados e analisados quanto à pureza por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando uma coluna C18 de fase inversa fabricada por Waters Associates, Milford, MA.

B. Caracterização de um Polipéptido de Ligação ao Receptor Específico de GPIIb-IIIa

(1) Inibição da Ligação de Fn à GPIIb-IIIa Purificada por um Polipéptido Derivado de Fn

Os polipéptidos sintetizados no Exemplo 9a foram avaliados quanto à sua capacidade para inibirem competitivamente a ligação de Fn ao receptor da integrina GPIIb-IIIa purificada. Os ensaios de competição foram realizados como descrito por Charo et al., J. Biol. Chem., 266:1415-1421 (1991). O ensaio de competição foi realizado primeiro por mistura em cavidades individuais de uma placa de microtitulação de 96 cavidades (Immulon, Dynatech) de 10 μ l/ml de GPIIb-IIIa purificada, preparada no Exemplo 1, diluído em tampão de solução salina de HEPES, pH 7,4, consistindo em HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, CaCl_2 1 mM e MgCl_2 1 mM. As placas foram mantidas durante 16 horas a 4°C para permitir a adsorção do receptor purificado nas paredes das cavidades. As cavidades revestidas com receptor foram então lavadas duas vezes com tampão de Tyrode Modificado, preparado como descrito no Exemplo 1, para remover qualquer receptor não ligado a partir das cavidades revestidas com receptor. Os sítios não ocupados por receptores nas cavidades de microtitulação foram bloqueados por mistura em cada cavidade de BSA a 5% dissolvida em tampão de Tyrode Modificado e manutenção da placa durante 2 horas à temperatura ambiente.

Após remoção da solução de bloqueamento e lavagem das cavidades bloqueadas como descrito acima, foram misturados em cada cavidade 50 μ l de uma solução 10 nM de Fn biotinilada em tampão de Tyrode Modificado na presença dos polipéptidos preparados no Exemplo 9a com concentração variando de 0,1 μ M a 200 μ M de polipéptido para formar uma mistura de proteína-receptor de fase sólida-líquida. A Fn misturada na ausência dos polipéptidos serviu como um controlo positivo para o ensaio de competição. A Fn purificada foi preparada como descrito por Plow et al., J Biol Chem., 256:9477-9482 (1981) e na Patente U.S. N° 4 589 981.



Em resumo, a Fn foi isolada a partir do plasma humano citrado fresco por cromatografia de afinidade em gelatina-sepharose como descrito por Engvall et al., Int. J. Cancer, 20:1-5 (1977). A Fn ligada foi eluída com borato de sódio 1 M a pH 5,3 e o pico principal de proteína eluída foi dialisado contra NaCl 0,15 M, fosfato de sódio 0,01 M, pH 7,0. A Fn isolada originou uma única banda em SDS-PAGE sob condições não redutoras e um duplete pouco espaçado de massa molecular de 215 000 a 230 000 sob condições redutoras.

A Fn purificada, resultante, foi então biotinada como descrito por Dale et al., Blood, 77:1096-1099 (1991). Em resumo, para a biotinação, a Fn foi primeiro dialisada em NaHCO₃ 0,1 M contendo NaCl 0,1 M, pH 8,0 e centrifugada a 100 000 x g durante 30 minutos a 4°C para remover qualquer matéria em partículas. A concentração de proteína foi ajustada a 0,5 mg/ml em borato de sódio 50 mM a pH 8,5. A reacção de biotinação foi iniciada por mistura de N-hidroxissuccinimido-biotina (NHS-biotina; 0,5 mg/mg de proteína) (Pierce Biochemicals, Rockford, IL) seguida por manutenção da mistura durante 2 horas à temperatura ambiente para formar a Fn biotinada. A Fn biotinada resultante foi então dialisada contra Tris-HCl-solução salina para remover os sais remanescentes.

As misturas de Fn-péptido foram mantidas nas cavidades revestidas com GPIIb-IIIa durante 2 horas à temperatura ambiente, para permitir a ligação da Fn biotinada ao receptor. A seguir a este período de manutenção, as cavidades que reagiram foram lavadas como descrito acima e a quantidade de Fn biotinada ligada a GPIIb-IIIa foi determinada por mistura de 0,1 ml de avidina ligada à peroxidase H de rábano silvestre, biotinada, (Hrp) (Sigma, St. Louis, MO) a uma diluição de 1:2000 para formar uma mistura de avidina-Fn biotinada. A mistura foi mantida durante 60 minutos à temperatura ambiente para permitir a formação de um complexo de avidina Hrp-Fn biotinada. O excesso de avidina Hrp foi removido por lavagem como descrito e a presença de Fn biotinada ligada à GPIIb-IIIa purificada foi detectada por mistura de 50 µl de solução de substrato cromogénico,



recentemente preparada, contendo 4,0 mg/ml de O-fenilenodiamina e peróxido de hidrogénio a 0,012% (v/v) em tampão CP como descrito no Exemplo 3a. Após manutenção da mistura de reacção de revelação de cor durante 10 minutos a 20°C, a reacção foi parada com a mistura de H₂SO₄ 2 N e as reacções paradas foram medidas quanto à absorvância como descrito no Exemplo 3a.

A quantidade de Fn biotinada ligada à GPIIb-IIIa purificada na ausência de polipéptidos competidores medida a uma absorvância de 490 nm produziu uma absorvância de 2,70. O polipéptido designado por D-11-T que tem a sequência de resíduos de aminoácido DRVPHSRNSIT, SEQ ID N° 11, que corresponde à sequência de resíduos de aminoácido da Fn que começa no resíduo número 1394 e termina no resíduo número 1404, inibiu competitivamente a ligação da Fn à GPIIb-IIIa purificada como mostrado na Figura 8. A inibição máxima foi atingida com uma concentração do polipéptido de aproximadamente 200 µM. A curva de inibição era paralela à inibição da ligação da Fn ao receptor pelo polipéptido RGDS que efectuou a inibição máxima à concentração de 10 µM. Assim, o polipéptido sintético D-11-T derivado de uma região não contendo RGD da Fn inibiu competitivamente a ligação da Fn à GPIIb-IIIa.

Foi também preparado um polipéptido de acordo com a fórmula da SEQ ID N° 16 como no Exemplo 9a e que mostrou no ensaio anterior inibir a ligação da Fn à GPIIb-IIIa em cerca de 35-40% da ligação de controlo quando testado a 200 µM de polipéptido. Assim, o polipéptido DRVPHSR (SEQ ID N° 16) define o sítio não RGD na Fn deste invento que se inibe por ligação à GPIIb-IIIa.

(2) Inibição da Ligação da Fn à GPIIb-IIIa Purificada por Variantes do Polipéptido DRVPHSRNSIT

Para determinar a especificidade com a qual o polipéptido D-11-T (DRVPHSRNSIT) (SEQ ID N° 11) inibiu a ligação da Fn ao GPIIb-IIIa, foram realizados ensaios de competição como descrito no Exemplo 9b(1) na presença de um polipéptido combinado VHPDRNTISRS (SEQ ID N° 13) ou com 11 polipéptidos separados



contendo uma substituição alanina num dos 11 resíduos de aminoácido nas posições de 1394 a 1404. Os polipéptidos combinados e os 11 variantes foram preparados como descrito no Exemplo 9a para utilização neste ensaio.

Os ensaios foram realizados como descrito no Exemplo 9b(1) com a excepção de que foram utilizados polipéptidos sintéticos a uma concentração de 250 μ M. Os resultados dos ensaios de competição com polipéptidos combinados ou com polipéptidos variantes substituídos com alanina quando comparados com a inibição obtida pelo polipéptido D-11-T são mostrados na Figura 9. Os resultados mostrados no gráfico de barras representam a média mais/menos o desvio padrão das três determinações. Em contraste com o polipéptido D-11-T que inibiu a ligação da Fn biotinada ao GPIIb-IIIa em mais do que 80%, o polipéptido combinado foi ineficaz na inibição da ligação da Fn ao receptor. Além disso, os polipéptidos variantes substituídos com alanina para o resíduo de aminoácido de ácido aspártico na posição 1394 e para o resíduo de aminoácido de arginina na posição 1395 foram igualmente ineficazes na inibição da ligação da Fn à GPIIb-IIIa.

Vários outros polipéptidos contendo substituições de alanina não tiveram, também, efeito. Em especial, a arginina substituída por alanina na posição de resíduo 1400 tinha o segundo menor efeito inibidor seguido pela histidina no resíduo número 1398, depois pela prolina no resíduo número 1397, pela valina no resíduo número 1396 e finalmente pela serina no resíduo número 1399. As substituições com alanina da asparagina (1401), serina (1402), isoleucina (1403) ou treonina (1404) não resultaram numa diminuição da eficácia inibidora do polipéptido no impedimento da ligação da Fn ao GPIIb-IIIa. Assim, as substituições com alanina próximo da porção carboxi-terminal do polipéptido D-11-T não alteraram a actividade inibidora do polipéptido ao passo que as substituições próximo da extremidade amino-terminal alteraram a actividade inibidora.

(3) Inibição da Ligação da Fn ou do Fg à GPIIb-IIIa ou Alfa v/Beta 3 Purificadas pelo Polipéptido DRVPHSRNSIT

Para determinar a especificidade de receptor do polipéptido D-11-T, foram realizados ensaios de competição como descrito no Exemplo 9b(1) utilizando fibronectina (Fn) biotinada ou fibrinogénio (Fg) e ou GPIIb-IIIa ou alfav/beta3 ($\alpha V\beta_3$). O último é um outro receptor da integrina, também designado como receptor da vitronectina, que tem os sítios de ligação ao ligando dependentes de RGD para Fn e para Fg. Ver Charo et al., J. Cell Biol., 111:2795-2800 (1990). Estes ensaios foram realizados para fundamentar a verificação anterior de que o polipéptido D-11-T inibe a ligação dos ligandos aos seus receptores de uma forma independente de RGD.

O receptor $\alpha V\beta_3$ utilizado neste ensaio foi isolado como descrito por Smith et al., J. Biol. Chem., 263:18726-18731 (1988). Em resumo, o receptor da vitronectina foi purificado a partir da placenta humana, o tecido cortado cubos foi primeiro extractado com octilglucósido 100 mM, CaCl_2 2 mM, fluoreto de fenilmetilsulfonilo 1 mM em PBS durante 30 minutos à temperatura ambiente. O extracto foi filtrado e depois bombeado sobre um anticorpo monoclonal, LM 609, acoplado a Affi-gel (Bio-Rad, Richmond, CA). O receptor da vitronectina ligado foi eluído da coluna com ácido acético 0,01 M a pH 3,0 contendo Nonidet P-40 a 0,1% e CaCl_2 2mM. As fracções recolhidas que continham receptor da vitrinectina foram reunidas e dialisadas contra PBS. O receptor da vitronectina purificado por este processo era de 90% puro quando avaliado por Coloração com Azul de Coomassie da SDS-PAGE e os rendimentos típicos foram de 500-900 μg de receptor/placenta.

A Fg humana foi purificada pelo procedimento de precipitação com glicina descrito por Kazal et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 113:989-994 (1963) a partir do plasma recém congelado que foi tratado com 10 unidades/ml de heparina imediatamente após o descongelamento. A seguir à precipitação final com glicina. A Fg foi dialisada contra Tris-HCl 50 mM, NaCl 100 mM, NaN_3 a 0,02% a



pH 7,4 e armazenada a -80°C até ser utilizada. A Fg purificada foi biotinada como descrito para Fn no Exemplo 9o 9b(1). A Fn e a GPIIb-IIIa foram preparadas como descrito nos Exemplos 9b(1) e 1, respectivamente. O ensaio foi realizado essencialmente como descrito no Exemplo 9b(1) com excepção de que foram utilizados 5 nM de Fg biotinada e 10 nM de Fn biotinada. Os ensaios foram realizados em cavidades de microtitulação revestidas com GPIIb-IIIa ou com $\alpha\text{V}\beta_3$ na presença do polipéptido D-11-T ou do polipéptido combinado VHPDRNTISRS (SEQ ID N° 13). Os resultados dos ensaios de competição descritos acima são mostrados na Figura 10 nos dois quadros, 10A e 10B. A Figura 10A e 10B mostra, respectivamente, que o polipéptido D-11-T inibiu especificamente a ligação de Fg e Fn às cavidades revestidas com GPIIb-IIIa tal como indicado pela linha com quadrados a branco. O polipéptido combinado, indicado pela linha mostrada com quadrados a cheio, não conseguiu exibir um efeito inibidor na ligação quer de Fg quer de Fn à GPIIb-IIIa. Nas cavidades revestidas com $\alpha\text{V}\beta_3$, o polipéptido D-11-T assim como o polipéptido combinado não conseguiram exibir qualquer actividade inibidora como mostrado na Figura 10A pelas linhas indicadas por círculos a branco e a cheio, respectivamente. Esta ausência de inibição foi também mostrada nas cavidades revestidas com $\alpha\text{V}\beta_3$ pela Fn como mostrado na Figura 10B.

Estes resultados confirmam que o polipéptido D-11-T é específico para o receptor da integrina GPIIb-IIIa inibindo a ligação de Fn e de Fg ao receptor. A vantagem que este polipéptido tem, quando comparado com os polipéptidos RGD existentes, é a de que é específico para GPIIb-IIIa como determinado pela ausência de efeito inibidor ao impedir a Fn e a Fg de se ligarem ao receptor da vitronectina, $\alpha\text{V}\beta_3$. Assim, as vantagens específicas da sequência de resíduos de aminoácido do polipéptido D-11-T como modelo dos novos antitrombóticos são: 1) é um novo polipéptido inibidor de GPIIb-IIIa e 2) é específico para GPIIb-IIIa versus $\alpha\text{V}\beta_3$.

A actividade da sequência do polipéptido D-11-T pode ser aumentada, realizando modificações que incluem substituições ou a ciclização. Além disso, esta sequência de resíduos de aminoácido

ou os seus derivados pode ter outras propriedades que a podem tornar um antitrombótico mais desejável do que os polipéptidos RGD existentes.

Embora o presente invento tenha sido descrito com algum detalhe por meio de ilustração e exemplos com o fim da clareza e compreensão, é óbvio que podem ser praticadas certas modificações no âmbito das reivindicações apensas.

REGISTO DA SEQUÊNCIA

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) N°ME/CHAVE: Região
- (B) LOCALIZAÇÃO: 3
- (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x pode ser qualquer resíduo de aminoácido"

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOME/CHAVE: Região
- (B) LOCALIZAÇÃO: 6
- (D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x pode ser um qualquer resíduo de aminoácido"

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:1:

Asp Arg Xaa Pro His Xaa Arg

1

5

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 3

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser V ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser S ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 8

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser N ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 9

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser S ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 10

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que

pode ser I ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 11

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser T ou A."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:2:

Asp	Arg	Xaa	Pro	His	Xaa	Arg	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 3

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser V ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que

pode ser S ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 8

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser N ou A."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:3:

Asp	Arg	Xaa	Pro	His	Xaa	Arg	Xaa	Ser	Ile	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 3

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser V ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que



pode ser S ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 9

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser S ou A."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:4:

Asp	Arg	Xaa	Pro	His	Xaa	Arg	Asn	Xaa	Ile	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 3

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser V ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que

pode ser S ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 10

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser I ou A."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:5:

Asp	Arg	Xaa	Pro	His	Xaa	Arg	Asn	Ser	Xaa	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 3

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser V ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que

pode ser S ou A."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Região

(B) LOCALIZAÇÃO: 11

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /nota= "x é um aminoácido que pode ser T ou A."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:6:

Asp	Arg	Xaa	Pro	His	Xaa	Arg	Asn	Ser	Ile	Xaa
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 106 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:7:

Pro	Thr	Gly	Ile	Asp	Phe	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ser	Phe	Thr	Val
1				5					10					15	

His	Trp	Ile	Ala	Pro	Arg	Ala	Thr	Ile	Thr	Gly	Tyr	Arg	Ile	Arg	His
			20					25						30	

His	Pro	Glu	His	Phe	Ser	Gly	Arg	Pro	Arg	Glu	Asp	Arg	Val	Pro	His
			35					40					45		

Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr
 50 55 60

Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu
 65 70 75 80

Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val
 85 90 95

Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile
 100 105

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 202 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:8:

Pro Ala Val Pro Pro Pro Thr Asp Leu Arg Phe Thr Asn Ile Gly Pro
 1 5 10 15

Asp Thr Met Arg Val Thr Trp Ala Pro Pro Pro Ser Ile Asp Leu Thr
 20 25 30

Asn Phe Leu Val Arg Tyr Ser Pro Val Lys Asn Glu Glu Asp Val Ala
 35 40 45

Glu Leu Ser Ile Ser Pro Ser Asp Asn Ala Val Val Leu Thr Asn Leu
 50 55 60

Leu Pro Gly Thr Glu Tyr Val Val Ser Val Ser Ser Val Tyr Glu Gln
 65 70 75 80

His Glu Ser Thr Pro Leu Arg Gly Arg Gln Lys Thr Gly Leu Asp Ser
 85 90 95

Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val
 100 105 110

His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His
 115 120 125

His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His
 130 135 140

Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr
 145 150 155 160

Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu
 165 170 175

Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val
 180 185 190

Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile
 195 200

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 606 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(ix) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOME/CHAVE: CDS

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..606

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:9:

CCA	GCT	GTT	CCT	CCT	CCC	ACT	GAC	CTG	CGA	TTC	ACC	AAC	ATT	GGT	CCA	48
Pro	Ala	Val	Pro	Pro	Pro	Thr	Asp	Leu	Arg	Phe	Thr	Asn	Ile	Gly	Pro	
1				5					10					15		

GAC	ACC	ATG	CGT	GTC	ACC	TGG	GCT	CCA	CCC	CCA	TCC	ATT	GAT	TTA	ACC	96
Asp	Thr	Met	Arg	Val	Thr	Trp	Ala	Pro	Pro	Pro	Ser	Ile	Asp	Leu	Thr	
			20					25					30			

AAC	TTC	CTG	GTG	CGT	TAC	TCA	CCT	GTG	AAA	AAT	GAG	GAA	GAT	GTT	GCA	144
Asn	Phe	Leu	Val	Arg	Tyr	Ser	Pro	Val	Lys	Asn	Glu	Glu	Asp	Val	Ala	
		35					40					45				

GAG	TTG	TCA	ATT	TCT	CCT	TCA	GAC	AAT	GCA	GTG	GTC	TTA	ACA	AAT	CTC	192
Glu	Leu	Ser	Ile	Ser	Pro	Ser	Asp	Asn	Ala	Val	Val	Leu	Thr	Asn	Leu	
	50					55					60					

CTG	CCT	GGT	ACA	GAA	TAT	GTA	GTG	AGT	GTC	TCC	AGT	GTC	TAC	GAA	CAA	240
Leu	Pro	Gly	Thr	Glu	Tyr	Val	Val	Ser	Val	Ser	Ser	Val	Tyr	Glu	Gln	
65					70					75					80	

CAT	GAG	AGC	ACA	CCT	CTT	AGA	GGA	AGA	CAG	AAA	ACA	GGT	CTT	GAT	TCC	288
His	Glu	Ser	Thr	Pro	Leu	Arg	Gly	Arg	Gln	Lys	Thr	Gly	Leu	Asp	Ser	
				85				90						95		

CCA ACT GGC ATT GAC TTT TCT GAT ATT ACT GCC AAC TCT TTT ACT GTG 336
 Pro Thr Gly Ile Asp Phe Ser Asp Ile Thr Ala Asn Ser Phe Thr Val
 100 105 110

CAC TGG ATT GCT CCT CGA GCC ACC ATC ACT GGC TAC AGG ATC CGC CAT 384
 His Trp Ile Ala Pro Arg Ala Thr Ile Thr Gly Tyr Arg Ile Arg His
 115 120 125

CAT CCC GAG CAC TTC AGT GGG AGA CCT CGA GAA GAT CGG GTG CCC CAC 432
 His Pro Glu His Phe Ser Gly Arg Pro Arg Glu Asp Arg Val Pro His
 130 135 140

TCT CGG AAT TCC ATC ACC CTC ACC AAC CTC ACT CCA GGC ACA GAG TAT 480
 Ser Arg Asn Ser Ile Thr Leu Thr Asn Leu Thr Pro Gly Thr Glu Tyr
 145 150 155 160

GTG GTC AGC ATC GTT GCT CTT AAT GGC AGA GAG GAA AGT CCC TTA TTG 528
 Val Val Ser Ile Val Ala Leu Asn Gly Arg Glu Glu Ser Pro Leu Leu
 165 170 175

ATT GGC CAA CAA TCA ACA GTT TCT GAT GTT CCC AGG GAC CTG GAA GTT 576
 Ile Gly Gln Gln Ser Thr Val Ser Asp Val Pro Arg Asp Leu Glu Val
 180 185 190

GTT GCT GCG ACC CCC ACC AGC CTA CTG ATC 606
 Val Ala Ala Thr Pro Thr Ser Leu Leu Ile
 195 200

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 606 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:10:

GATCAGTAGG	CTGGTGGGGG	TCGCAGCAAC	AACTTCCAGG	TCCCTCGGAA	CATCAGAAAC	6
TGTTGATTGT	TGGCCAATCA	ATAAGGGACT	TTCCTCTCTG	CCATTAAGAG	CAACGATGCT	12
GACCACATAC	TCTGTGCCTG	GAGTGAGGTT	GGTGAGGGTG	ATGGAATTCC	GAGAGTGGGG	18
CACCCGATCT	TCTCGAGGTC	TCCCCTGAA	GTGCTCGGGA	TGATGGCGGA	TCCTGTAGCC	24
AGTGATGGTG	GCTCGAGGAG	CAATCCAGTG	CACAGTAAA	GAGTTGGCAG	TAATATCAGA	30
AAAGTCAATG	CCAGTTGGGG	AATCAAGACC	TGTTTTCTGT	CTTCCTCTAA	GAGGTGTGCT	36
CTCATGTTGT	TCGTAGACAC	TGGAGACACT	CACTACATAT	TCTGTACCAG	GCAGGAGATT	42
TGTTAAGACC	ACTGCATTGT	CTGAAGGAGA	AATTGACAAC	TCTGCAACAT	CTTCCTCATT	48
TTTCACAGGT	GAGTAACGCA	CCAGGAAGTT	GGTTAAATCA	ATGGATGGGG	GTGGAGCCCA	54
GGTGACACGC	ATGGTGTCTG	GACCAATGTT	GGTGAATCGC	AGGTCAGTGG	GAGGAGGAAC	60
AGCTGG						60

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:11:

Asp Arg Val Pro His Ser Arg Asn Ser Ile Thr

1

5

10



(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:12:

Gly Arg Gly Asp Ser Pro
1 5

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:13:

Val His Pro Asp Arg Asn Thr Ile Ser Arg Ser
1 5 10

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 96 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) CADEIA: dupla
- (D) TOPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADN (genómico)

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:14:

TCGAGCTCGG TACCCGGCCG GGGATCCATC GAGGGTAGGC CTGAATTCAG TAAAACCCTC 60

GATGGATCCT CTAGAGTCGA CCTGCAGGCA AGCTTG 96

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:15:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:15:

Lys Tyr Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:16:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:16:

Asp Arg Val Pro His Ser Arg
1 5

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:17:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

- (A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:17:

Asp	Arg	Ala	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:18:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:18:

Asp	Arg	Val	Pro	His	Ala	Arg	Asn	Ser	Ile	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:19:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:19:

Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Ala	Ser	Ile	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:20:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:20:

Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ala	Ile	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:21:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:21:

Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ala	Thr
1				5					10	

(1) INFORMAÇÃO PARA SEQ ID N°:22:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:22:

Asp	Arg	Val	Pro	His	Ser	Arg	Asn	Ser	Ile	Ala
1				5					10	



REIVINDICAÇÕES

1 - Processo de preparação de um polipéptido possuindo um comprimento de não mais de cerca de 100 resíduos de aminoácido, que se liga a GPIIb-IIIa e que inclui uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula: -Asp-Arg-X₁Pro-His-X₂R-, onde X₁ e X₂ são qualquer resíduo de aminoácido caracterizado por se proceder a uma síntese por técnicas de ácidos nucleicos recombinantes ou a uma síntese química em fase sólida por adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a uma cadeia polipeptídica em crescimento, sobre uma matriz.

2 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido polipéptido ter uma sequência de resíduos de aminoácido correspondendo à sequência de resíduos de aminoácido mostrada a seguir (Seq. Id. nº 7):

	<u>Res. #</u>
ProThrGlyIle	1354
AspPheSerAspIleThrAlaAsnSerPheThrValHisTrpIleAlaProArgAlaThr	1374
IleThrGlyTyrArgIleArgHisHisProGluHisPheSerGlyArgProArgGluAsp	1394
ArgValProHisSerArgAsnSerIleThrLeuThrAsnLeuThrProGlyThrGluTyr	1414
ValValSerIleValAlaLeuAsnGlyArgGluGluSerProLeuLeuIleGlyGlnGln	1434
SerThrValSerAspValProArgAspLeuGluValValAlaAlaThrProThrSerLeu	1454
LeuIle	1456

3 - Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por o referido polipéptido incluir uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula: -Asp-Arg-X₁-Pro-His-X₂-Arg-U-, onde X₁ é Val ou Ala, X₂ é uma sequência de resíduos de aminoácido seleccionada de entre o grupo consistindo

em: $-X_3-X_4-X_5-X_6-$, X_3 -Ser-Ile-Thr-, Asn- X_4 -Ile-Thr-, -Asn-Ser- X_5 -Thr- e -Asn-Ser-Ile- X_6- , respectivamente SEQ ID nº 2 a 6, onde X_3 é Asn ou Ala, X_4 é Ser ou Ala, X_5 é Ile ou Ala e X_6 é Thr ou Ala.

4 - Processo de acordo com a reivindicação 3, caracterizado por o referido polipéptido ter uma sequência de resíduos de aminoácido

Asp-Arg-Val-Pro-His-Ser-Arg,
Asp-Arg-Val-Pro-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Ile-Thr,
Asp-Arg-Ala-Pro-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Ile-Thr,
Asp-Arg-Val-Pro-His-Ala-Arg-Asn-Ser-Ile-Thr,
Asp-Arg-Val-Pro-His-Ser-Arg-Ala-Ser-Ile-Thr,
Asp-Arg-Val-Pro-His-Ser-Arg-Asn-Ala-Ile-Thr,
Asp-Arg-Val-Pro-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Ala-Thr, e
Asp-Arg-Val-Pro-His-Ser-Arg-Asn-Ser-Ile-Ala,

sendo o seu nº de SEQ ID, respectivamente, 16, 11, 17, 18, 19, 20, 21 e 22.

5 - Processo de preparação de um polipéptido que se liga a GPIIb-IIIa e que tem uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela fórmula: B-X-Z, onde

X é uma sequência de resíduos de aminoácido representada pela sequência representada na reivindicação 2;

B é um grupo amino-terminal ou uma sequência amino-terminal de resíduos de aminoácido; e

Z é um grupo carboxi-terminal ou uma sequência carboxi-terminal de resíduos de aminoácido, que tem um comprimento de não mais de 150 resíduos.

6 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por B ser um grupo amino-terminal NH_2 e Z ser um grupo carboxi-terminal $COOH$.

7 - Processo de acordo com a reivindicação 5, caracterizado por o polipéptido não incluir uma sequência RGD.

8 - Processo de preparação de uma proteína de fusão que

possui uma sequência de resíduos de aminoácido que corresponde à sequência mostrada a seguir

	<u>Res. #</u>
ProAlaValProProProThrAspLeuArgPheThrAsnIleGlyProAspThrMetArg	1274
ValThrTrpAlaProProProSerIleAspLeuThrAsnPheLeuValArgTyrSerPro	1294
ValLysAsnGluGluAspValAlaGluLeuSerIleSerProSerAspAsnAlaValVal	1314
LeuThrAsnLeuLeuProGlyThrGluTyrValValSerValSerSerValTyrGluGln	1334
HisGluSerThrProLeuArgGlyArgGlnLysThrGlyLeuAspSerProThrGlyIle	1354
AspPheSerAspIleThrAlaAsnSerPheThrValHisTrpIleAlaProArgAlaThr	1374
IleThrGlyTyrArgIleArgHisHisProGluHisPheSerGlyArgProArgGluAsp	1394
ArgValProHisSerArgAsnSerIleThrLeuThrAsnLeuThrProGlyThrGluTyr	1414
ValValSerIleValAlaLeuAsnGlyArgGluGluSerProLeuLeuIleGlyGlnGln	1434
SerThrValSerAspValProArgAspLeuGluValValAlaAlaThrProThrSerLeu	1454
LeuIle	1456

9 - Processo de preparação de um vector incluindo uma sequência de ácido nucleico que codifica um polipéptido de acordo com a reivindicação 1 ou 5, caracterizado por se ligar operativamente a referida sequência de ácido nucleico a um vector adequado via terminais coesivos complementares.

10 - Processo de acordo com a reivindicação 9, caracterizado por o vector incluir uma sequência de ácido nucleico seguinte

(segue sequência)

CCAGCTGTTCTCTCCCTCCCACTGACCTGCGATTACCAACATTGGTCCAGACACCATGCGT
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 GGTGACACAAGGAGGAGGGTGACTGGACGCTAAGTGATTGTAACCAAGTCTGTGGTACGCA
 ProAlaValProProProThrAspLeuArgPheThrAsnIleGlyProAspThrMetArg -
 GTCACCTGGGCTCCACCCCATCCATTGATTAAACCAACTTCCTGGTGCGTTACTCACCT
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 CAGTGGACCCGAGGTGGGGTAGGTAATAATTGGTTGAAGGACCACGCAATGAGTGGG
 ValThrTrpAlaProProProSerIleAspLeuThrAsnPheLeuValArgTyrSerPro -
 GTGAAAAATGAGGAAGATGTTGCAGAGTTGTCAATTTCTCCTTCAGACAATGCAGTGGTC
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 CACTTTTTACTCCTTCTACAACGTCTCAACAGTTAAAGAGGAAGTCTGTTACGTCACCAAG
 ValLysAsnGluGluAspValAlaGluLeuSerIleSerProSerAspAsnAlaValVal -
 TTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAGAATATGTAGTGAGTGCTCCAGTGCTACGAACAA
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 AATTGTTTAGAGGACGGACCATGTCTTATACATCACTCACAGAGGTCACAGATGCTTGTT
 LeuThrAsnLeuLeuProGlyThrGluTyrValValSerValSerSerValTyrGluGln -
 CATGAGAGCACACCTCTTAGAGGAAGACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCAACTGGCATT
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 GTACTCTCGTGTGGAGAATCTCCTTCTGTCTTTGTCCAGAACTAAGGGGTGACCGTAA
 HisGluSerThrProLeuArgGlyArgGlnLysThrGlyLeuAspSerProThrGlyIle -
 GACTTTTCTGATATTACTGCCAACTCTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCCTCGAGCCACC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 CTGAAAAGACTATAATGACGGTTGAGAAAATGACACGTGACCTAACGAGGAGCTCGGTGG
 AspPheSerAspIleThrAlaAsnSerPheThrValHisTrpIleAlaProArgAlaThr -
 ATCACTGGCTACAGGATCCGCCATCATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTCGAGAAGAT
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 TAGTGACCGATGTCTAGGCGGTAGTAGGGCTCGTGAAGTACCCTCTGGAAGCTCTTCTA
 IleThrGlyTyrArgIleArgHisHisProGluHisPheSerGlyArgProArgGluAsp -
 CGGGTGCCCCACTCTCGGAATTCATCACCCCTACCAACCTCACTCCAGGCACAGAGTAT
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 GCCCACGGGGTGAGAGCCTTAAGGTAGTGGGAGTGATTGGAGTGAGGTCCGTGTCTCATA
 ArgValProHisSerArgAsnSerIleThrLeuThrAsnLeuThrProGlyThrGluTyr -
 GTGGTCAGCATCGTTGCTCTTAATGGCAGAGAGGAAAGTCCCTTATTGATTGGCCAACAA
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 CACCAGTCGTAGCAACGAGAATTACCGTCTCTCCTTTGAGGGAATAACTAACCGGTTGTT
 ValValSerIleValAlaLeuAsnGlyArgGluGluSerProLeuLeuIleGlyGlnGln -
 TCAACAGTTTCTGATGTTCCGAGGGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCCAACAGCCTA
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 AGTTGTCAAAGACTACAAGGCTCCCTGGACCTTCAACAACGACGCTGGGGGTGATCGGAT
 SerThrValSerAspValProArgAspLeuGluValValAlaAlaThrProThrSerLeu -
 CTGATC
 1501 -----
 GACTAG
 LeuIle

11 - Processo de ligação de células a um substrato, caracterizado por compreender:

(a) o contacto de células, que expressam GPIIb-IIIa nas suas superfícies, com um substrato compreendendo um polipéptido preparado de acordo com a reivindicação 1 ou 5, fixado numa matriz sólida; e

(b) a manutenção do referido contacto durante um período de tempo predeterminado, suficiente para que a referida GPIIb-IIIa se ligue ao referido polipéptido.

12 - Processo de acordo com a reivindicação 11, caracterizado por incluir ainda a fixação do referido polipéptido à referida matriz sólida.

13 - Processo de produção de um dispositivo prostético, caracterizado por se revestir o referido dispositivo com uma composição de revestimento compreendendo os polipéptidos preparados de acordo com as reivindicações 1 a 5.

14 - Processo de produção de uma composição de anticorpo monoclonal que imunorreage com a fibronectina e com um polipéptido preparado de acordo com as reivindicações 1 a 5, caracterizado por se misturar o referido anticorpo com veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis.

15 - Processo de inibição da ligação da fibronectina ou do fibrinogénio a células caracterizado por compreender sujeitar as células a uma quantidade suficiente de uma composição de anticorpo preparada de acordo com a reivindicação 14, de modo que a ligação às células seja inibida.

Lisboa, 3. DF 1991

Por THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

=O AGENTE OFICIAL=




Res. #

P A V P P P T D L R F T N I G P D T M R 1274

V T W A P P P S I D L T N F L V R Y S P 1294

V K N E E D V A E L S I S P S D N A V V 1314

L T N L L P G T E Y V V S V S S V Y E Q 1334

H E S T P L R G R Q K T G L D S P T G I 1354

D F S D I T A N S F T V H W I A P R A T 1374

I T G Y R I R H H P E H F S G R P R E D 1394

R V P H S R N S I T L T N L T P G T E Y 1414

V V S I V A L N G R E E S P L L I G Q Q 1434

S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L 1454

L I 1456

FIGURA 2

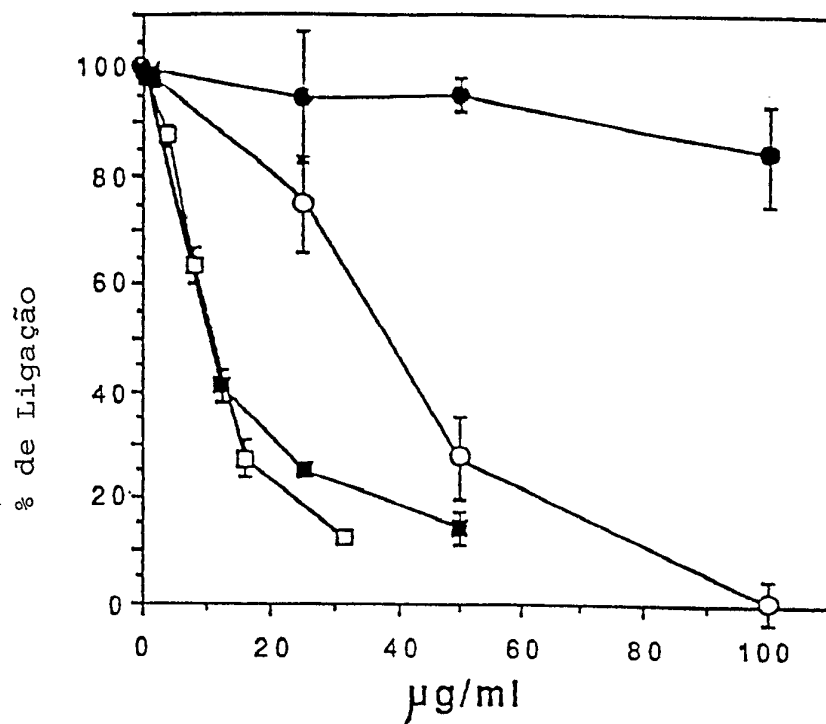
CCA'GCTGTTCTCTCTCCCACTGACCTGGGATTACCAACATTGGTCCAGACACCAATGCGT
 901 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 960
 GGTGACAAGGAGGAGGGGTGACTGGACGCTAAGTGGTTGTAACCAGGTCTGTGQTACGCA
 P A V P P P T D L R F T N I G P D T M R -
 GTCACCTGGGCTCCACCCCCATCCATTGATTTAACCACCTTCCTGGTGGTACTACCT
 961 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020
 CAGTGGACCCGAGGTGGGGGTAGGTAATAATTGGTTGAAGGACCACGCAATGAGTGA
 V T W A P P P S I D L T N F L V R Y S P -
 GTGAAAAATGAGGAAGATGTTGCAGAGTTGTCAATTTCTCCTTCAGACAATGCAGTGGTC
 1021 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080
 CACTTTTTACTCCTTCTACAACGTCTCAACAGTTAAAGAGGAAGTCTGTTACGTCACCAG
 V K N E E D V A E L S I S P S D N A V V -
 TTAACAAATCTCCTGCCTGGTACAGAATATGTAGTGAGTGTCTCCAGTGTCTACGAACAA
 1081 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140
 AATTGTTTAGAGGACGGACCATGTCTTATACATCACTCACAGAGGTCACAGATGCTTGT
 L T N L L P G T E Y V V S V S S V Y E Q -
 CATGAGAGCACACCTCTTAGAGGAAGACAGAAAACAGGTCTTGATTCCCCAACTGGCATT
 1141 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200
 GTACTCTCGTGTGGAGAATCTCCTTCTGTCTTTTGTCCAGAACTAAGGGGTTGACCGTAA
 H E S T P L R G R Q K T I G L D S P T G I -
 GACTTTTCTGATATTACTGCCAACTCTTTTACTGTGCACTGGATTGCTCCTCGAGCCACC
 1201 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260
 CTGAAAAGACTATAATGACGCTTGAGAAAATGACACGTGACCTAACGAGGAGCTCGGTGG
 D F S D I T A N S F T V H W I A P R A T -
 ATCACTGGCTACAGGATCCGCCATCATCCCGAGCACTTCAGTGGGAGACCTCGAGAAGAT
 1261 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320
 TAGTGACCGATGTCCTAGGCGGTAGTAGGGCTCGTGAAGTCACCCTCTGGAGCTCTTCTA
 I T G Y R I R H H P E H F S G R P R E D -
 CGGGTGCCCCACTCTCGGCTTCCATGACQCTCACCAACCTCACTCCAGGCACAGAGTAT
 1321 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380
 GCCCACGGGGTGAGAGCCTTAAGTAGTGGGAGTGGTTGGAGTGAGGTCCGTGTCTCATA
 R. V P H S R N S I T L T N L T P G T E Y -
 GTGGTCAGCATCGTTGCTCTTAATGGCAGAGAGGAAAGTCCCTTATTGATTGGCCAACAA
 1381 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440
 CACCAGTCGTAGCAACGAGAATTACCGTCTCTCCTTTCAGGGAATAACTAACCGTGTGTT
 V V S I V A L N G R E E S P L L I G Q Q -
 TCAACAGTTTCTGATGTTCCGAGGGACCTGGAAGTTGTTGCTGCGACCCCCACCAGCCTA
 1441 -----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1500
 AGTTGTCAAAGACTACAAGGCTCCCTGGACCTTCAACAACGACGCTGGGGGTGGTCCGGAT
 S T V S D V P R D L E V V A A T P T S L -
 CTGATC.
 1501 -----
 GACTAG'

L I

FIGURA 3



a)



b)

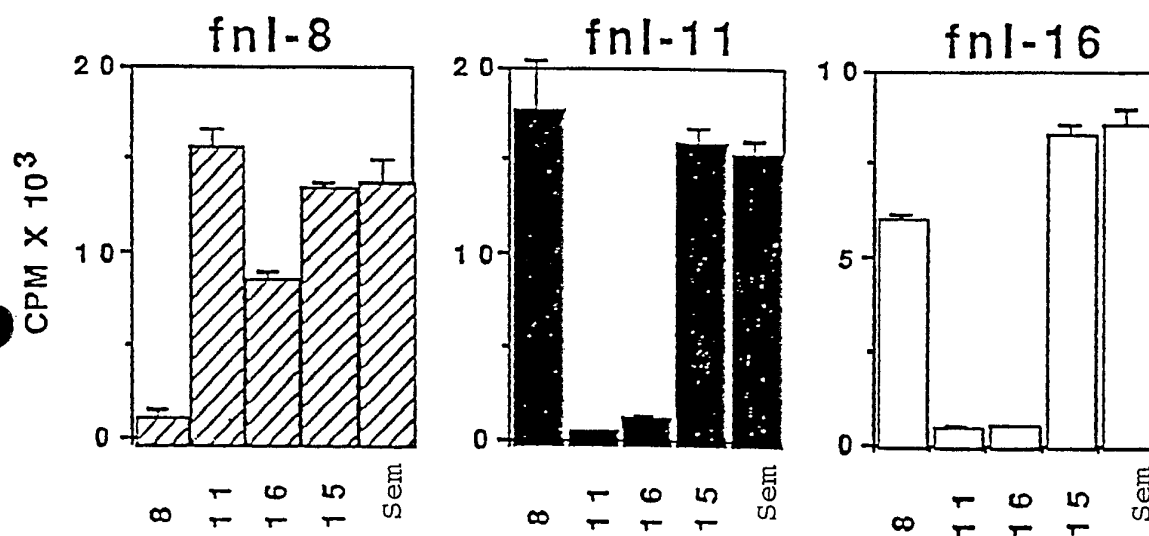
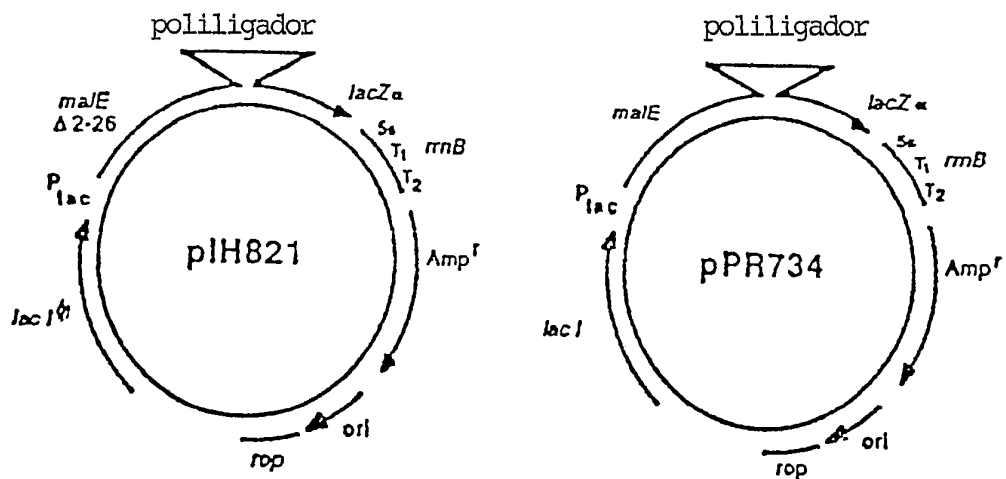


Fig. 4

- Mab 8
- Mab 16
- Mab 11,10
- Mab 15



Poliligador:

malE... TCG AGC TCG GTA CCC GGC CGG GGA TCC ATC GAG GGT AGG CCT

Sítio de clivagem de Factor Xa

Ile Glu Gly Arg

GAA TTC AGT AAA ACC CTC GAT GGA TCC TCT AGA GTC GAC CTG CAG GCA AGC TTG... lacZα

Enzymes: Sac I, Kpn I, Eag I, BamH I, Stu I, EcoRI, BamH I, Xba I, Sal I, Pst I, Hind III

Detalhe da deleção da sequência de sinal de pIH821:

codão de início malE deleção dos codões 2-26 (sequência de sinal)

ATG (Δ2-26) AAA ATC malE...

Fig. 5

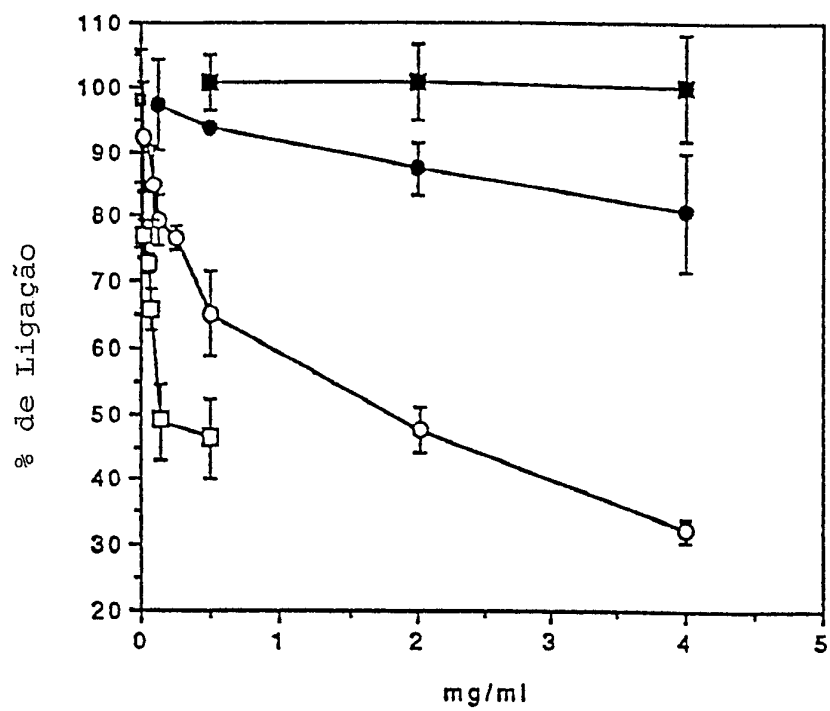


Fig. 6

□ fn
○ MBP/III8+9
● MBP
■ BSA

[Handwritten signature]

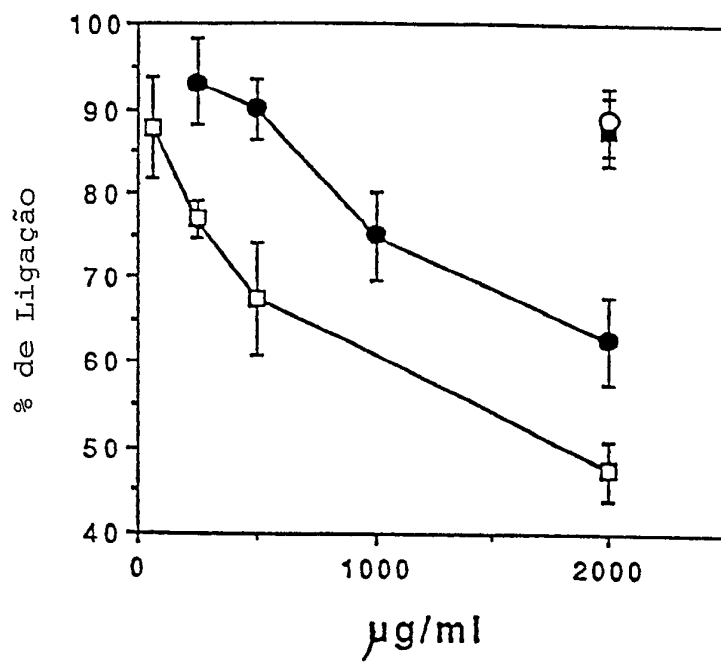


Fig. 7

Ligando 50 nM

- FG + fusão
- FN + fusão
- FG + MBP
- FN + MBP

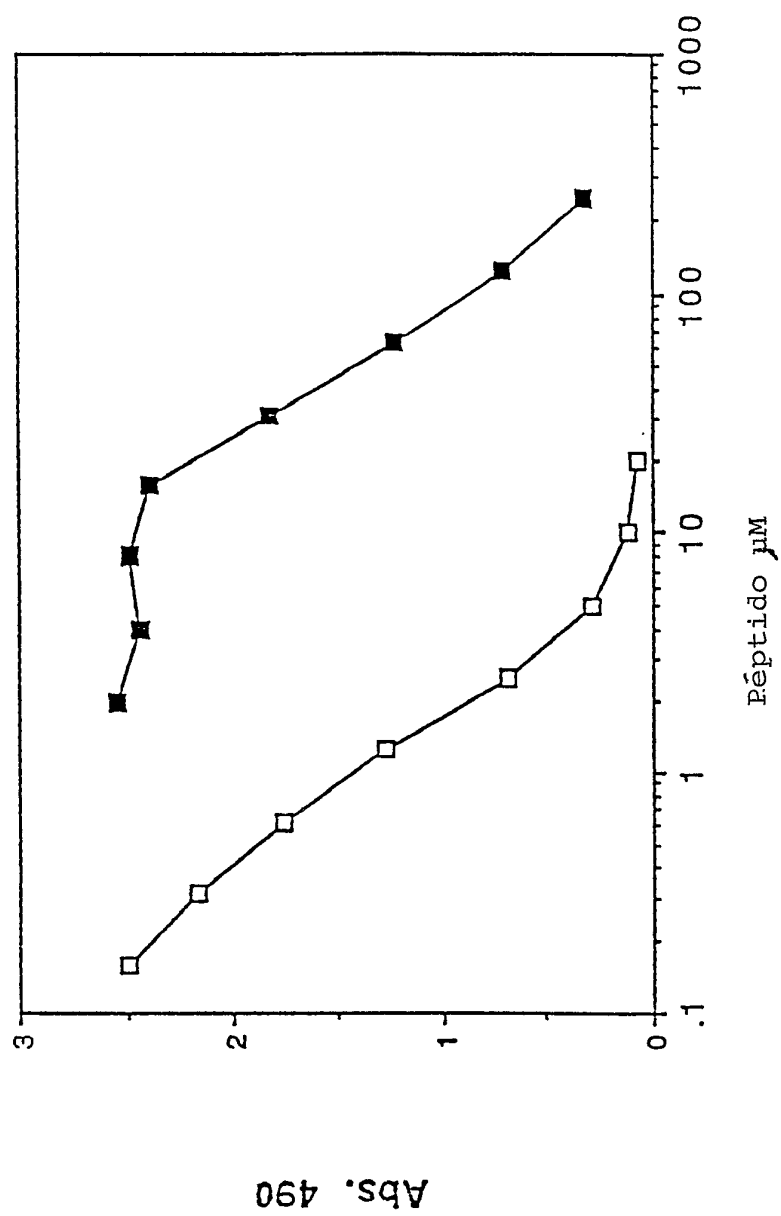


Figura 8

Percentagem de Inibição

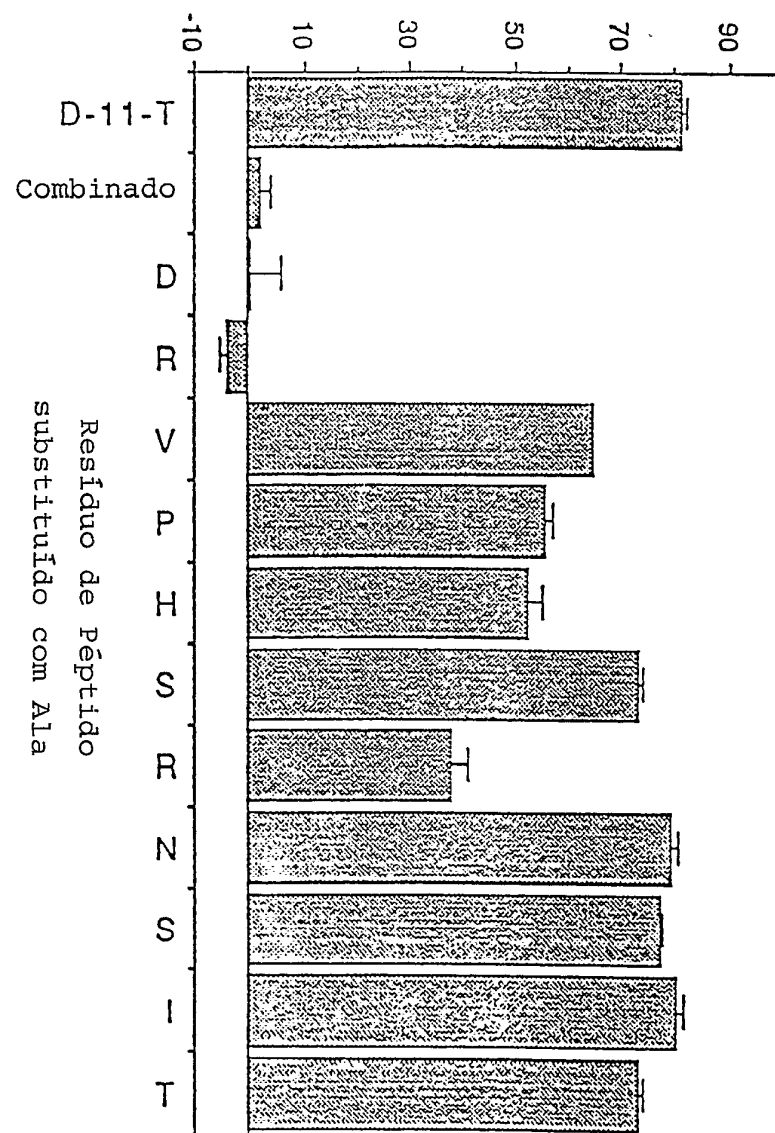


Figura 9

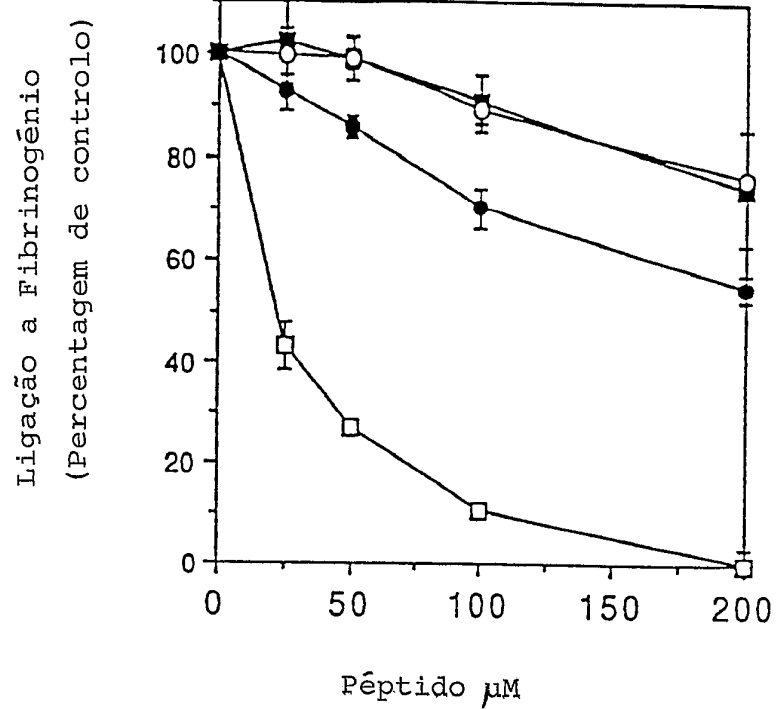


Figura 10A

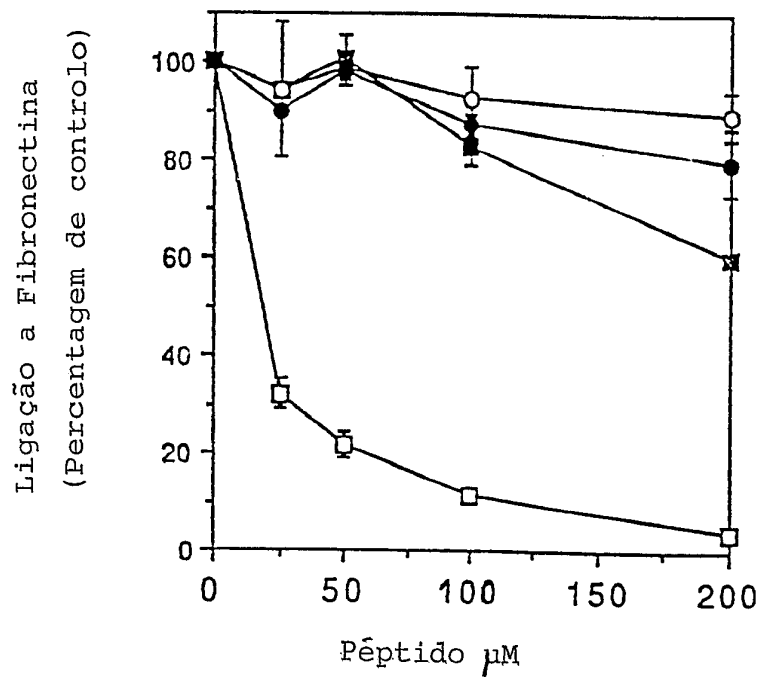


Figura 10B